

00591

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

"IDENTIFICACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO QUE
PARTICIPAN EN LA MOVILIDAD DEL
ESPERMATOZOIDE DE HUMANO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A
LAURA EDITH CASTELLANO TORRES

BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. CLAUDIA TREVIÑO SANTA CRUZ

CUERNAVACA, MOR.

2005



m347776

2005

CASTELLANO TORRES, LAURA EDITH



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

... a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM e difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Laura Edith
Castellano Torres

FECHA: 12 de sep. 2005

FIRMA: Laura E. Castellano

Con mucho cariño a mis padres

María y Felipe

A mis hermanos

Ernesto
Felipe
Claudia
Diego

A mis dos grandes amores, mis sobrinos

Sofía y Héctor

A mi amiga Paty que siempre me ha apoyado y ha estado conmigo en la buenas y en las malas, mil gracias por tu amistad.

• PRESENTACIÓN

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Claudia Treviño Santa Cruz, con apoyo de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM.

Parte de los estudios de movilidad se hicieron en colaboración con el laboratorio de Biogenética, Eugenio Sue (Laboratorio privado, México, DF).

Algunos de los resultados de este trabajo de investigación se presentaron en los siguientes congresos:

Castellano, L.E., Darszon, A. y Treviño, C. (2002). Identificación de los canales de calcio que participan en la movilidad del espermatozoide de humano. XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Puerto Vallarta, Jalisco, México.

Castellano, L.E., Rodríguez, E., Treviño, C.L., y Darszon, A. (2004). El ZD7288 induce la hiperactivación de la movilidad en el espermatozoide de humano. XXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Ixtapa-Zihuatanejo, Guerrero, México.

Castellano, L.E., Treviño, C.L., González-Martínez, M.T. and Darszon, A. (2005). ZD7288 induces human sperm hyperactivation. 2005 Gordon Research Conference on fertilization and the Activation of Development. Holderness School, Plymouth, NH, USA.

La tesis se presenta en dos secciones: el manuscrito principal y los artículos (Apéndice II).

1. **Castellano, L.E.**, Treviño, C.L., Rodríguez, Delany, Serrano, C.J., Pacheco, J., Tsutsumi, V., Felix, R. and Darszon A. (2003). Transient receptor potencial (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett.* **541**:69-74.
2. Treviño, C.L., Felix, R., **Castellano, L.E.**, Gutiérrez, C., Rodríguez, D., Pacheco, J. López-González, I., Gomora, J.C., Tsutsumi, V., Hernández-Cruz, A., Fiordelasio, T., Scaling, A. and Darszon, A. (2004). Expresión and differential cell distribution of lowthreshold Ca^{2+} channels in mammalian male germ cell and sperm. *FEBS lett.* **563**, 87-92.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Alberto Darszon por permitirme incorporarme a su grupo y por sus valiosos comentarios para mejorar mi formación académica.

A la Dra. Claudia Treviño un agradecimiento muy especial por sus invaluable enseñanzas que han contribuido en mi formación académica y por su ayuda incondicional.

A los miembros del Comité Tutoral: Dr. Marco González y Dr. Ricardo Félix, por su apoyo en el seguimiento de mi formación académica.

A los miembros del jurado de revisión de esta tesis por sus sugerencias: Dra. Hilda Lomelí, Dr. Carlos Garay, Dr. Juan Carlos Gómora, Dr. Gustavo Pedraza, Dr. Lourival Possani y Dr. Arturo Hernández.

A la QFB Xóchitl Alvarado y al M.C. Andrés Saralegui por apoyo en el manejo del microscopio de Confocal.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Yuri, Gisela, Doña Francis, José Luis, Harumi, Gabriel, Enrique, Takuya, Chris, Carmen, Nacho, Daniel, Délany, Caro, Lucía, Sr. Juan, Esme, Mary Paz, Pablo, Priscila, Juan José, Penélope.

A mis amigos de Cuernavaca y de México: Jacobo, Juan Pablo, Laura y Susy

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
I.INTRODUCCIÓN	
I.1 Morfología del espermatozoide.....	5
I.2 Fisiología del espermatozoide	
A) La movilidad del espermatozoide.....	10
B) Capacitación y reacción acrosomal.....	12
1.3 Canales de calcio	
1.3.1 Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.....	16
1.3.2 Los canales Ca_v y su participación en la movilidad del espermatozoide.....	21
1.3.3 Canales tipo TRPC.....	23
1.3.4 Los canales tipo TRPC y su participación en la movilidad del espermatozoide.....	27
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	30
Objetivos específicos.....	30
II.MATERIALES Y MÉTODOS	
II.1 Reactivos.....	31
II.2 Separación de los espermatozoides móviles.....	31
II.3 Inmunolocalización de los canales de Ca^{2+}	32
II.4 Evaluación de la movilidad y estudios farmacológicos.....	34

III.RESULTADOS

III.1 Inmunolocalización de los canales de Ca²⁺ en el espermatozoide

A) Inmunodetección de los canales Ca_v..... 37

B) Inmunodetección de los canales tipo TRPC..... 50

III.3 Resultados de movilidad

A) Participación del Ca²⁺ externo en la movilidad..... 54

B) Participación de los canales Ca_v en la movilidad activada..... 57

C) Participación de los canales tipo TRPC en la movilidad activada..... 58

D) Participación de los canales Ca_v y TRPC en la movilidad hiperactivada..... 65

E) Efecto del ZD7288 sobre la movilidad..... 70

IV. DISCUSIÓN..... 74

V. CONCLUSIONES..... 85

VI. PERSPECTIVAS..... 86

VII. BIBLIOGRAFÍA..... 87

APÉNDICE I

Inmunolocalización de Cav3.2 en células HEK 99

Inmunolocalización de Cav3.3 en células HEK102

APÉNDICE II (Artículos)..... 105

ABREVIATURAS

ATP	Adenosina-5'-trifosfato
EGTA	Acido etilenglicol-bis(-aminoacetil eter) –N-N'-treta-acético
BSA	Albúmina Sérica Bovina
DMSO	Dimetilsulfóxido
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
TRP	Canales tipo TRP (Transient Receptor Potential)
SOC	Canales activados por el vaciamientos de pozas internas (Store Operated Channels)
Ca_v	Canales de calcio dependientes de voltaje
LVA	Canales Ca_v de bajo umbral de activación (Low-voltage-activated)
HVA	Canales Ca_v de alto umbral de activación (High-voltage-activated)
CASA	Sistema utilizado para medir la movilidad del espermatozoide (Computer-Assited Semen Análisis)
ZP	Zona Pelúcida
TM	Transmembranal
RA	Reacción Acrosomal
FDEs	Fibras Densas Externas
VM	Vaina Mitocondrial
VF	Vaina Fibrosa
MP	Membrana Plasmática
AC	Adenilato Ciclasa
IP₃R	Receptor a IP₃
DAG	Diacilglicerol
DHP	Dihidropiridinas
EGF	Factor de Crecimiento Epitelial
CNG	Canales activados por nucleótidos cíclicos
HCN	Canales activados por hiperpolarización y por nucleótidos cíclicos

2-APB	2-aminoetoxidifenil borato
RNE	Envoltura nuclear redundante (Redundant Nuclear Envelope)
CE	Células espermatoogénicas
VCL	Velocidad Curvilínea
VSL	Velocidad Progresiva
VAP	Velocidad Promedio
ALH	Desplazamiento lateral de la cabeza
LIN	Linearidad
STR	Dirección resta

RESUMEN

La fecundación es un evento fundamental en la generación de un nuevo individuo implicando la participación de dos células altamente diferenciadas: el óvulo y el espermatozoide. Los canales iónicos son un instrumento de dialogo entre el espermatozoide, su medio ambiente y el óvulo. En particular, el Ca^{2+} es un segundo mensajero que participa en la regulación de varios procesos fisiológicos del espermatozoide, tales como la movilidad, la capacitación y la reacción acrosomal. La entrada de Ca^{2+} a la célula puede producirse a través de canales de Ca^{2+} como son los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_V), canales de Ca^{2+} activados por el vaciamiento de pozas internas y/o segundos mensajeros (SOCs, TRPs), entre otros. Aunque la caracterización electrofisiológica de las corrientes de Ca^{2+} en el espermatozoide es difícil, estudios funcionales revelaron la presencia de corrientes de Ca^{2+} de bajo umbral de activación (Tipo T) en células espermátogénicas de ratón. Sin embargo, poco se sabe de la identidad molecular de las proteínas responsables de esa corriente. En este trabajo, se identificó por primera vez a nivel de proteína la presencia de varias subunidades de los canales Ca_V ($\text{Ca}_V1.2$, $\text{Ca}_V2.3$, $\text{Ca}_V3.1$, $\text{Ca}_V3.2$ y $\text{Ca}_V3.3$) y de los canales tipo TRP (TRPC1, 3, 4, 5 y 6) en el espermatozoide de humano. La localización de los canales Ca_V y tipo TRPC en el flagelo sugieren su participación en la movilidad. El uso de antagonistas para los canales Ca_V y tipo TRPC nos sugieren que los canales de Ca_V no participan significativamente en la movilidad activada e hiperactivada del espermatozoide de humano, mientras que los canales tipo TRPC contribuyen en la movilidad activada de manera parcial sin participar notablemente en la movilidad hiperactivada del espermatozoide de humano.

ABSTRACT

Fertilization is the process of combining the male gamete, or “sperm”, with the female gamete, or “egg”; the resulting zygote develops into a new individual. This process requires fully mature and competent male and female gametes, and the appropriate communication between them. Ion channels are instrumental in the dialogue between sperm, its environment, and the egg. In particular, numerous sperm functions including motility, capacitation and the acrosome reaction are associated with Ca^{2+} influx through voltage-gated (Ca_v) channels. In addition, capacitative Ca^{2+} entry is a process whereby the activation of Ca^{2+} influx through the plasma membrane is triggered by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. Some transient receptor potential (TRPC) proteins have been proposed as candidates for being considerate capacitative Ca^{2+} channels. Although the electrophysiological characterization of Ca^{2+} currents in mature sperm has proven difficult, functional studies have revealed the presence of low-threshold (Ca_v3) channels in mouse spermatogenic cells. However, the molecular identity of these proteins remains undefined. In this project, we identified by immunoconfocal microscopy the presence of three Ca_v3 and antibodies to HVA channels detected $\text{Ca}_v1.3$ and $\text{Ca}_v2.3$ and the presence of TRPC1, 3, 4, 5 and 6 differentially localized in the human sperm. Because all of them were detected in the flagellum, Ca_v and TRPC channel antagonists were tested in sperm motility using a computer-assisted assay. Our results provide evidence that TRPC channels may influence human sperm motility, whereas Ca_v channels did not significantly influence human sperm motility.

I. INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual involucra la recombinación del genoma de dos individuos de la misma especie para producir otro con características genéticas similares a sus progenitores. Para que la fecundación se lleve a cabo deben participar los dos gametos, el masculino o espermatozoide y el femenino u óvulo. En los mamíferos, esta interacción comprende una serie de eventos secuenciales, que comienza en el tracto reproductor femenino con la unión del espermatozoide a la capa extracelular del óvulo, llamada *zona pelúcida* (ZP), y termina con la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y del óvulo para dar origen al cigoto (Wassarman, 1999). El espermatozoide para encontrar al óvulo tiene que desplazarse dentro del tracto genital femenino y está admirablemente seleccionado para esta función. Para que el espermatozoide de mamíferos sea capaz de fecundar al óvulo debe llevar a cabo tres eventos básicos: la movilidad, la capacitación y la reacción acrosomal (RA)(Wassarman, 1999).

I.1 MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide en los mamíferos está formado por dos componentes anatómicos principales, la cabeza y el flagelo, los cuales están unidos por la pieza de conexión (Fig. 1A).

La cabeza está formada por el acrosoma, el núcleo, el citoesqueleto y una pequeña cantidad de citoplasma (Fig. 2A). El núcleo del espermatozoide contiene cromatina altamente condensada. El acrosoma se origina del aparato de Golgi en las espermátidas y contiene las enzimas líticas necesarias para penetrar las diferentes capas del óvulo y fecundarlo. Está formado por la membrana acrosomal interna y externa y cubre al núcleo en la parte anterior de la cabeza (Yanagimachi, 1994)(Fig. 2A).

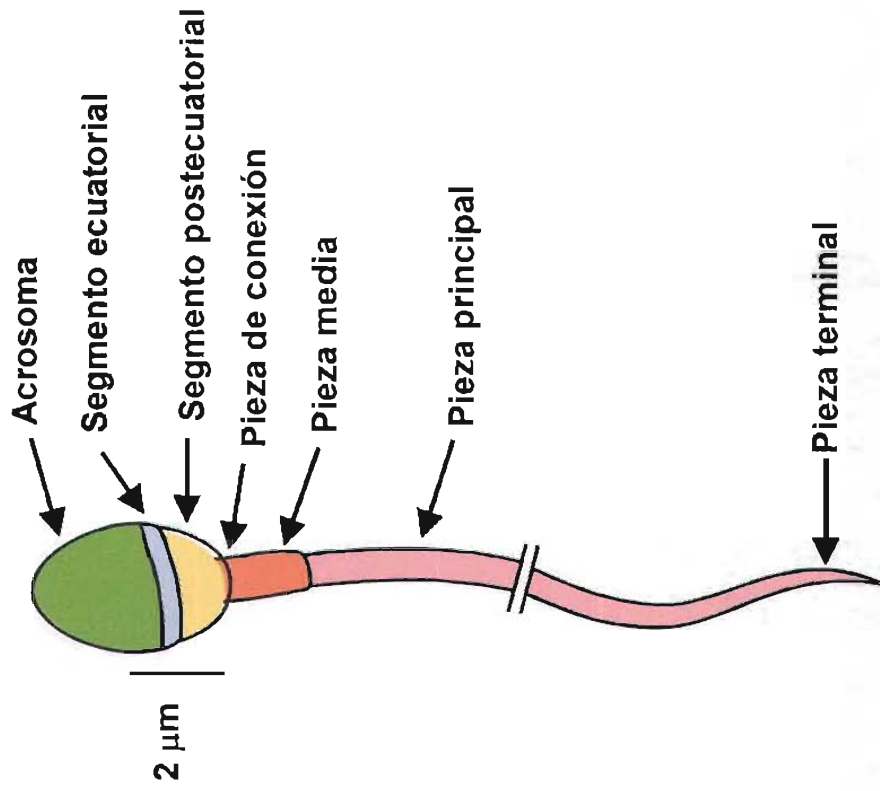
Por su parte, el flagelo es el responsable de proporcionarle movimiento al espermatozoide y su longitud varía considerablemente entre las diferentes especies (50-200 μm). El movimiento del flagelo se genera por una estructura interna llamada axonema (Fig. 1B). Esta estructura consiste de un par central de microtúbulos rodeado de 9 pares externos de microtúbulos (Cosson, 1996) y tiene la función de impulsar el movimiento del espermatozoide. Del 10 al 15% de la proteína global del axonema la constituye una ATPasa, conocida como dineína. Esta proteína es la responsable de la producción de la energía mediante la hidrólisis de ATP produciendo ADP y fosfato inorgánico, para transformar la energía química en trabajo mecánico que le permite al axonema mover al flagelo. Adicionalmente, hay 9 espigas radiales, cada una de las cuales se origina de los 9 pares de microtúbulos y se proyectan hacia el par central de manera helicoidal (Fig. 1B). Se ha postulado que son precisamente estas estructuras las que regulan la asimetría del batimiento flagelar (Cosson, 1996).

El flagelo del espermatozoide de los mamíferos se divide en 4 partes o piezas principales: de conexión, media, principal y terminal (Fig. 1A). La pieza de conexión es la porción del flagelo que se une a la fosa de implantación del núcleo en la cabeza del espermatozoide. La pieza media comienza en la pieza de conexión y se caracteriza por la presencia de 9 fibras densas externas (FDEs) que se localizan en la parte externa de los 9 pares de microtúbulos, y por la presencia de una vaina de mitocondrias (VM) que cubre a las FDEs y al axonema (Fig. 2A, B). La pieza media abarca la cuarta parte del total del flagelo hasta llegar al anillo (annulus), el cual marca el comienzo de la pieza principal. En este punto, la VM termina y las FDEs asociadas con los pares externos 3 y 8 del axonema son reemplazados por 2 columnas longitudinales de las vainas fibrosas (VFs). La pieza principal se caracteriza por la presencia de las VFs y de únicamente 7 (en lugar de 9) de

las FDEs que cubren al axonema. Esta pieza abarca aproximadamente dos tercios de la longitud del flagelo (Fig. 1A). Cerca de la región distal de la pieza principal, las VFs y las FDEs se afilan y terminan donde comienza la pieza terminal (Fig. 1A), la cual es una región pequeña formada únicamente por el axonema que se encuentra cubierto por la membrana plasmática (MP) (Turner, 2003).



A



B

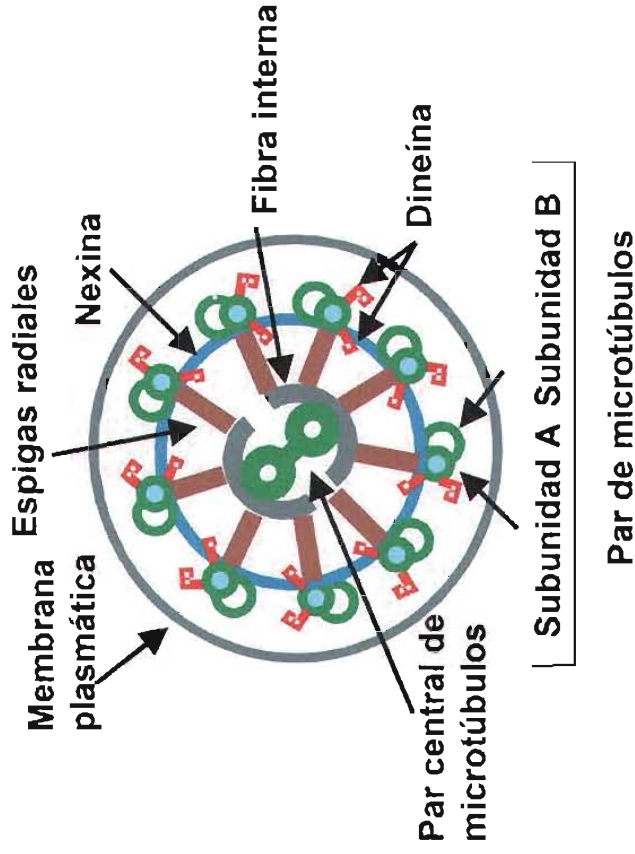


Figura 1. Representación esquemática de un espermatozoide de humano (A) y del corte transversal del axonema (B). Modificado de Darszon et al., 2005. *Int Rev Cytol.* 243: 79-172.

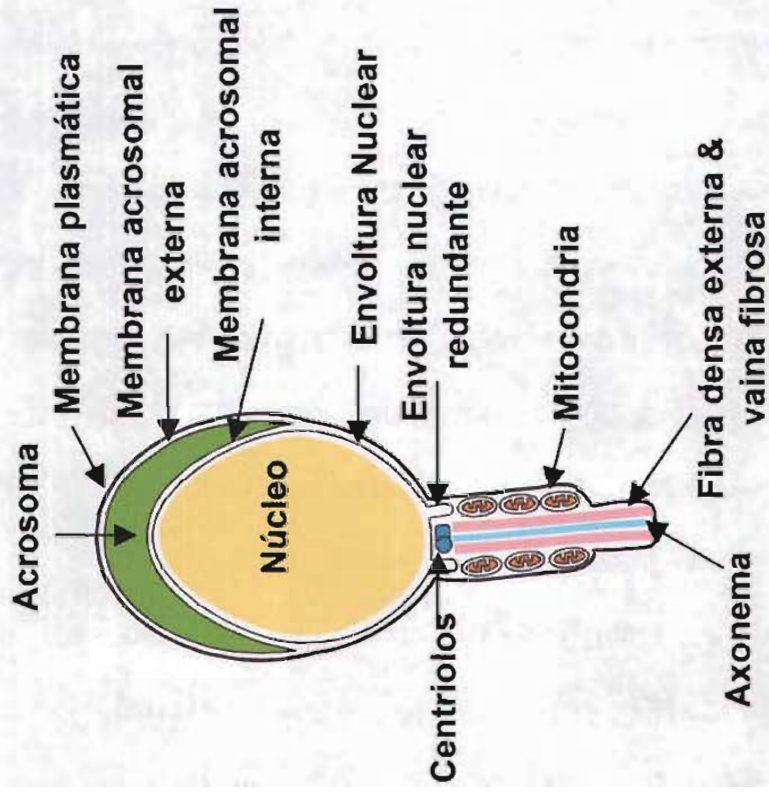
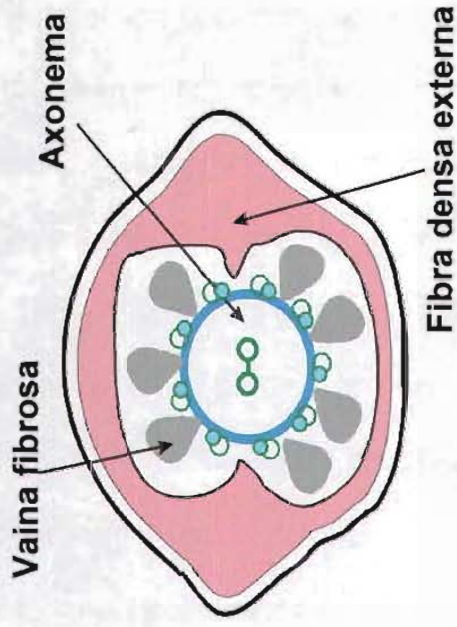
A**B**

Figura 2. Representación esquemática de la cabeza del espermatozoide de humano (A) y del corte transversal de la pieza principal del flagelo (B). Darszon et al., 2005. *Int Rev Cytol.* 243: 79-172.

I.2 FISIOLÓGÍA DEL ESPERMATOZOIDE

A) Movilidad del espermatozoide

Los espermatozoides se producen en el testículo y son transportados a la cabeza y al cuerpo del epidídimo y son almacenados en la cauda proximal de éste. En los mamíferos, la mayor parte de los espermatozoides en el testículo no tienen movimiento y sólo unos cuantos muestran movimiento no progresivo, de baja frecuencia y con una agitación flagelar de amplitud reducida. Estas células adquieren la capacidad de nadar durante su trayecto por el epidídimo. En esta región, su movimiento es lento y al ser liberados al líquido seminal su movilidad se activa (Fig. 3). Para asegurar este proceso, el espermatozoide necesita madurar en el epidídimo. Las bases moleculares de la maduración del espermatozoide en esta región aún se desconocen. Recientemente se encontró que Bin 1b (un péptido antimicrobiano, miembro de la familia de las β defensinas) se expresa en el epidídimo de rata y participa en la adquisición de la movilidad de los espermatozoides durante el proceso de maduración en el epidídimo. Esta inducción de la movilidad es mediada por la entrada de Ca^{2+} inducida por Bin 1b (Zhou et al., 2004). Una vez que los espermatozoides están maduros se pueden liberar al exterior (Fig. 3). En el humano, se depositan en la vagina, cerca del cérvix o cuello uterino y nadan a través del moco cervical, atraviesan el útero, entran al oviducto y alcanzan la región del ámpula donde ocurre la fecundación. El patrón de movimiento de los espermatozoides durante su trayecto por el tracto reproductor femenino cambia en cada región debido a la composición química del microambiente al que se enfrenta (Fig. 3).

En la mayoría de los mamíferos los espermatozoides muestran dos tipos de movilidad: movilidad activada (Fig. 4A), la cual se observa en los espermatozoides recién eyaculados; y la movilidad hiperactivada (Fig. 4B), que es la que presentan los

espermatozoides que se obtienen del sitio de la fecundación (Suarez et al., 1987; Suarez y Ho, 2003; Turner, 2003). Los espermatozoides activados se caracterizan por tener un movimiento vigoroso con una trayectoria casi recta (Fig. 4A). Cuando los espermatozoides se hiperactivan, la curvatura del flagelo es más pronunciada y su agitación es menos simétrica que cuando están activados (Fig. 4B). Se considera a la hiperactivación como un proceso bifásico, ya que los espermatozoides experimentan patrones de nado entre el estado activado y el estado hiperactivado (Ho y Suarez, 2001). La movilidad hiperactivada se describió inicialmente en espermatozoides de hámster bajo condiciones de capacitación (Yanagimachi, 1994). A la fecha de las 15 especies de mamíferos estudiadas todas presentan hiperactivación (hámster, cobayo, perro, ratón, conejo, cabra, murciélago, delfín, bovino, mono, caballo, puerco, rata, gato y humano) (Kay y Robertson, 1998). Aunque la hiperactivación es un cambio funcional que ocurre durante la capacitación, las vías de señalización de estos dos eventos no están acopladas completamente. Por ejemplo, en espermatozoides de hámster el bicarbonato es esencial para la capacitación y la hiperactivación *in vitro*, pero la hiperactivación requiere de una concentración mayor de la que necesita la capacitación (Boatman y Robbins, 1991). Poco se conoce acerca del mecanismo de regulación de la hiperactivación. Se sabe que el Ca^{2+} tiene un papel muy importante en la regulación de la movilidad hiperactivada (Yanagimachi, 1994). La señal que inicia la hiperactivación en el oviducto aún no se ha identificado; no obstante, el Ca^{2+} es un elemento importante en la vía de señalización para convertir la agitación simétrica en una agitación asimétrica que es la característica principal de la hiperactivación, esto se ha observado en espermatozoides de toro sin membrana, ya que la hiperactivación aumenta al incrementar la concentración de Ca^{2+} libre (50 a 500 nM) (Ho et al., 2002). En espermatozoides de hámster (Yanagimachi,

1982) y de ratón (White y Aitken, 1989) se requiere de Ca^{2+} y K^+ (Fraser, 1983) externos para que ésta se lleve a cabo. Por su parte, el espermatozoide de humano presenta dos tipos de movilidad hiperactivada: una fase de transición o movilidad hiperactivada progresiva y un movimiento errático o movilidad hiperactivada no progresiva. La movilidad hiperactivada es crítica en el proceso de fecundación *in vivo* ya que le permite al espermatozoide llegar al óvulo a través del lumen del oviducto y penetrar el cumulus oophorus (células de la granulosa) y la ZP del óvulo.

B) Capacitación y Reacción Acrosomal

Para adquirir la capacidad de fecundar al óvulo, los espermatozoides en los mamíferos deben llevar a cabo un proceso de maduración que ocurre en el tracto reproductor femenino, llamado capacitación. Durante este evento se produce una disminución de la rigidez de la MP asociada con la reducción del contenido de colesterol, rearrreglos y/o modificaciones en el contenido de fosfolípidos y proteínas de la MP. Además, el pHi y los niveles de Ca^{2+} aumentan, así como la permeabilidad a K^+ y los niveles de segundos mensajeros como AMPc, IP_3 y diacilglicerol (DAG) (Darszon et al., 2005). Estos cambios en la fluidez de la MP pueden modular la entrada de Ca^{2+} y HCO_3^- que produce la activación de la adenilato ciclasa (AC) (Litvin et al., 2003) y cambios en los niveles de AMPc (Visconti et al., 2002). Además de activar a la AC, la entrada de HCO_3^- hiperpolariza la MP del espermatozoide de ratón de manera dependiente de la $[\text{Na}^+]_e$ (Demarco et al., 2003) y también contribuye al aumento del pHi durante la capacitación (Zeng et al., 1996). La capacitación se puede llevar a cabo *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) (Yanagimachi, 1994).

La RA es un requisito fundamental que el espermatozoide debe llevar a cabo para fecundar al óvulo. Este proceso consiste en la exocitosis del acrosoma, liberando enzimas líticas que le permitirán al espermatozoide penetrar las distintas capas del óvulo, además en la RA, se exponen nuevas proteínas de membrana en su superficie. El principal mediador fisiológico de la RA en mamíferos es la ZP (matriz extracelular del óvulo). La ZP está constituida por 4 glicoproteínas (ZP1-ZP4) dependiendo de la especie (Wassarman, 2002; Dean, 2004). ZP3 es la glicoproteína responsable de inducir la RA (Bleil and Wassarman, 1983; Lee et al., 1987). Se han propuesto varios candidatos como receptores de la ZP3, entre ellos la β 1,4-galactosiltransferasa 1 (Shi et al., 2001) y recientemente SED1, un homólogo de la p47 (proteína de secreción) en ratón (Ensslin y Shur, 2003). Además de ZP3, existen otros ligandos que inducen la RA como: la progesterona (Osman et al., 1989), el ionóforo de Ca^{2+} A-23187, la *p*-aminofenil- α -D-manopiranoideo bovina (D-manosa-BSA), γ -ácido aminobutírico (GABA), glicina, EGF, ATP, acetilcolina (Darszon et al., 2005).

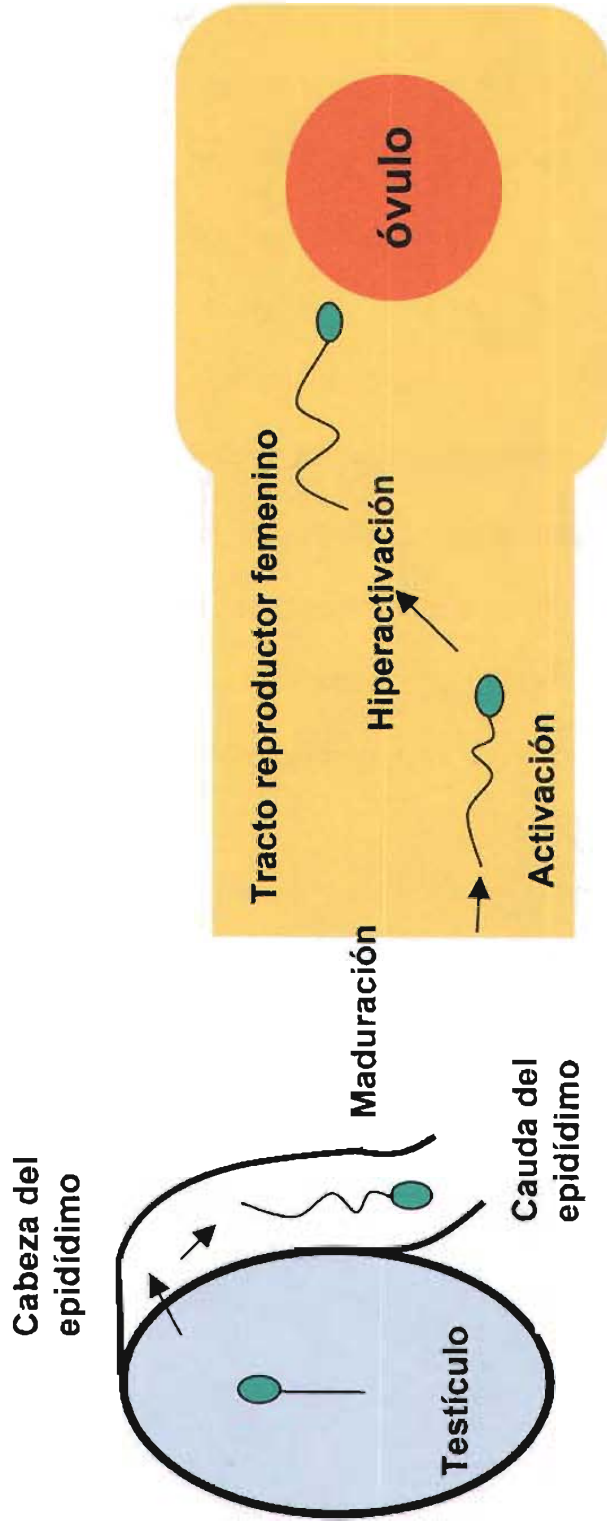
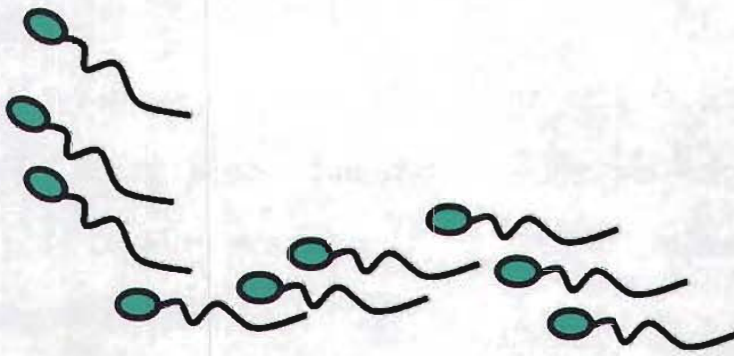


Figura 3. Cambios en la movilidad del espermatozoide de mamífero previos a la fecundación. Modificado de Inaba, 2003. *Zool. Sc.* 20: 1043-1056.

A



B

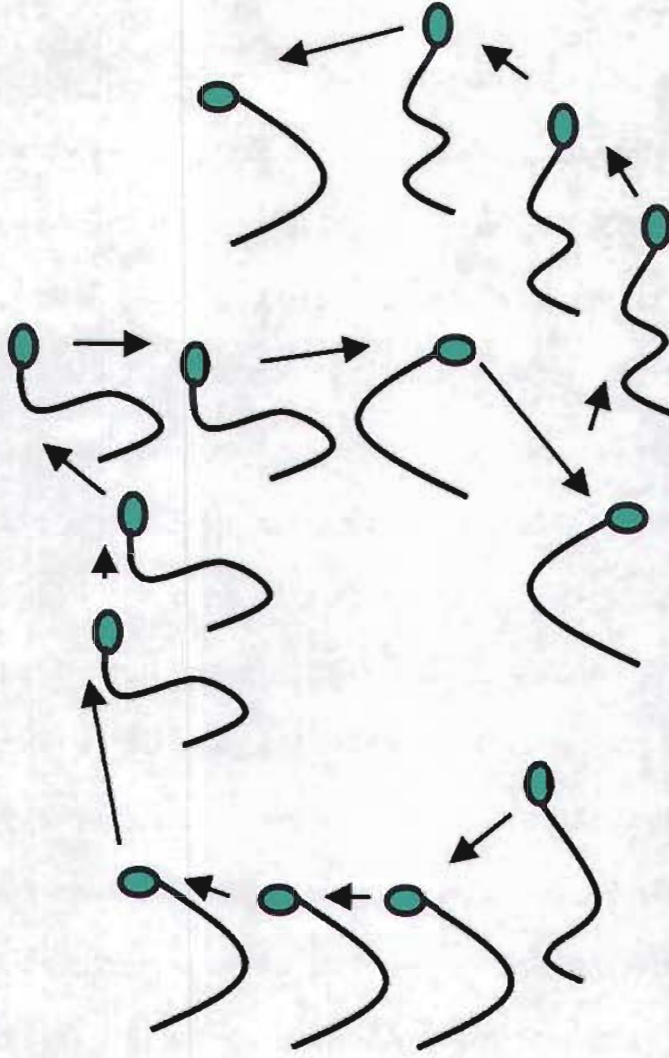


Figura 4. Comparación de las trayectorias de los espermatozoides activados (A) y los espermatozoides hiperactivados (B). Modificado de Mortimer, 1997. *Human Rep.* 3: 403-439.

I.3 CANALES DE CALCIO

I.3.1 Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v)

El Ca^{2+} es un regulador fundamental en la fisiología del espermatozoide (Baldi et al., 2000; Carlson et al., 2003). El aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) puede ocurrir por la entrada de Ca^{2+} a la célula a través de la MP o mediante su liberación de pozas internas (como el retículo endo/sarcoplásmico en las células somáticas). La entrada de Ca^{2+} externo a la célula puede llevarse a cabo a través de varios tipos de canales de Ca^{2+} como son los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v), canales de Ca^{2+} activados por el vaciamiento de pozas internas y/o segundos mensajeros (SOCs, TRPs), canales de Ca^{2+} activados por nucleótidos cíclicos (CNG), canales de Ca^{2+} regulados por ligandos, intercambiadores de Ca^{2+} y bombas de Ca^{2+} . Los espermatozoides de los mamíferos expresan canales Ca_v y canales tipo TRPC, entre otros (Darszon et al., 2005). Sin embargo, el papel que cada uno de estos canales tiene en la fisiología del espermatozoide aún no es claro, en parte porque es difícil estudiar los canales iónicos presentes en el espermatozoide mediante las técnicas convencionales de registro electrofisiológico como la de fijación de voltaje en áreas restringidas de membrana ("*patch clamp*"), una de las metodologías centrales para el estudio de los canales iónicos en otros tipos celulares.

Los canales Ca_v se clasificaron inicialmente de acuerdo a sus propiedades biofísicas y farmacológicas en canales de alto umbral de activación (HVA) y canales de bajo umbral de activación (LVA)(Tabla 1). Los canales HVA se abren a potenciales despolarizantes relativamente altos (≥ -30 mV). Según sus características biofísicas y farmacológicas, los canales HVA se dividen en: L (Long-lasting), N (Neuronal), P (inicialmente registrados en neuronas de Purkinje), Q y R (Resistentes a la gran mayoría

de bloqueadores orgánicos de canales Ca_v). Por otro lado, los canales LVA se activan en respuesta a potenciales despolarizantes relativamente bajos (≥ -70 mV), se inactivan rápidamente, se desactivan lentamente y poseen una conductancia unitaria pequeña. Se les conoce como canales de bajo umbral de activación por su dependencia a voltajes negativos (Carbone y Lux, 1984) o tipo T por su inactivación (Nowycky et al., 1985; Catterall, 2000).

Los canales Ca_v son proteínas transmembranales (TMs) que regulan la entrada de Ca^{2+} a la célula en respuesta a una despolarización de la MP. Estas proteínas conforman una superfamilia de canales iónicos TMs a la que también pertenecen los canales de K^+ y Na^+ dependientes de voltaje (Catterall et al., 2003). Los canales Ca_v tipo HVA son complejos de proteínas compuestos por al menos 4 subunidades (α_1 , β , γ , y $\alpha_2\delta$) (Fig. 5) (Catterall, 2000). En los mamíferos a las subunidades $Ca_v\alpha_1$ las codifican al menos 10 genes. La subunidad $Ca_v\alpha_1$ (190- 250 kDa) es la responsable de la conducción de los iones, posee la entidad molecular encargada de detectar los cambios en el voltaje transmembranal (también llamada "sensor" de voltaje), las compuertas de apertura, cierre e inactivación del canal, así como diversos sitios de regulación. Está organizada en 4 dominios homólogos repetidos (I-IV) con seis segmentos TMs (S1-S6) cada uno. Los aminoácidos cargados positivamente del segmento S4 son parte esencial del "sensor" de voltaje. El asa del poro se encuentra entre el segmento TM S5 y S6 de cada dominio repetido, y determina la conductancia y la selectividad al ión Ca^{2+} . La subunidad $Ca_v\beta$ es intracelular y tiene un PM de ~55-65 kDa (Ruth et al., 1989). La subunidad $Ca_v\gamma$ es una glicoproteína con cuatro segmentos TMs y tiene un PM de ~30 kDa (Takahashi et al., 1987; Jay et al., 1990). Por último, la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta$ (~170 kDa) posee diversos sitios de glicosilación y varias regiones hidrofóbicas (Ellis et al., 1988; Catterall, 2000); es una

proteína extrínseca de membrana anclada a ésta a través de la subunidad δ (Gurnett et al., 1996; Catterall, 2000). Aunque estas subunidades auxiliares modulan las propiedades de todo el complejo del canal, la diversidad farmacológica y electrofisiológica de los canales de Ca^{2+} surge principalmente de la existencia de múltiples subunidades $\text{Ca}_v\alpha_1$ (Hofmann et al., 1999a) (Fig. 5).

Los canales Ca_v también se clasificaron de acuerdo a los diferentes genes que codifican las subunidades α_1 : α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} , α_{1A} , α_{1B} , α_{1E} , α_{1G} , α_{1H} , α_{1I} (Tabla 1) (Catterall, 2000; Carlson et al., 2003). Sin embargo, en el 2000 se adoptó una nomenclatura más sistemática y los canales de Ca^{2+} se nombraron combinando el símbolo químico del Ca^{2+} (Ca) con el principal regulador fisiológico del canal (voltaje) indicado como subíndice (Ca_v). El número corresponde a la familia de la subunidad α_1 de los canales Ca_v (1 a 3) y el orden en que se descubrieron las subunidades α_1 de cada una de las familias. De acuerdo con esta nomenclatura, la familia Ca_v1 ($\text{Ca}_v1.1$ - $\text{Ca}_v1.4$) comprende a las subunidades α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} y α_{1F} , las cuales son responsables de las corrientes de Ca^{2+} tipo L. La familia Ca_v2 ($\text{Ca}_v2.1$ - $\text{Ca}_v2.3$) incluye a las subunidades α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} , las cuales son responsables de las corrientes de Ca^{2+} tipo P/Q, N y R, respectivamente. Por último, la familia Ca_v3 ($\text{Ca}_v3.1$ - $\text{Ca}_v3.3$) incluye las subunidades α_{1G} , α_{1H} , α_{1I} , responsables de las corrientes de Ca^{2+} tipo T (Tabla 1) (Catterall, 2000; Catterall et al., 2003).

Los canales Ca_v1 (Tipo L) son inhibidos por fenilalquilaminas (verapamil), dihidropiridinas (DHPs) y benzotiazepinas (diltiazem). Las fenilalquilaminas bloquean al poro por el lado intracelular. Las DHPs pueden ser activadores o inhibidores, actúan alostéricamente cambiando al canal del estado abierto al estado cerrado, en lugar de ocluir al poro.

Los canales Ca_v2 son relativamente insensibles a DHPs pero se bloquean específicamente por toxinas peptídicas (Miljanich y Ramachandran, 1995; Catterall et al., 2003). Los canales $Ca_v2.1$ (tipo P/Q) son bloqueados específicamente con ω -Agatoxina IVA, un péptido presente en el veneno de la araña australiana *Atrax robustus* (con IC_{50} s de ~2 y ~200 nM para canales P y Q, respectivamente). Los canales $Ca_v2.2$ (tipo N) son bloqueados por ω -conotoxina GVIA (proveniente del veneno del caracol marino *Conus geographus*) y toxinas relacionadas. Los canales $Ca_v2.3$ (tipo R) son bloqueados por SNX-482, un péptido sintético derivado del veneno de la tarántula *Hysteroocrates gigas* (Bourinet et al., 2001; Catterall et al., 2003).

Los canales de la familia Ca_v3 (Tipo T) son inhibidos por mibefradil ($IC_{50} \sim 5 \mu M$) (Todorovic y Lingle, 1998). Sin embargo, a concentraciones más elevadas, el mibefradil puede actuar como un antagonista de las corrientes tipo HVA (Martín et al., 2000; Wu et al., 2000). Existen asimismo algunos agentes de uso clínico que bloquean de manera más a menos selectiva a los canales tipo T entre los que destacan la etosuximida, la pimozida, la amilorida, y la nifedipina (Darszon et al., 2005).

Tabla 1. Clasificación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

Tipo de canal de Ca^{2+}	Nombre del canal	Tipo de corriente	Nombre del gen
De alto umbral de activación (HVA)	$Ca_v1.1$	L	α_{1S}
	$Ca_v1.2$	L	α_{1C}
	$Ca_v1.3$	L	α_{1D}
	$Ca_v1.4$	L	α_{1F}
	$Ca_v2.1$	P/Q	α_{1A}
	$Ca_v2.2$	N	α_{1B}
	$Ca_v2.3$	R	α_{1E}
De bajo umbral de activación (LVA)	$Ca_v3.1$	T	α_{1G}
	$Ca_v3.2$	T	α_{1H}
	$Ca_v3.3$	T	α_{1I}

Modificado de (Catterall, 2000)

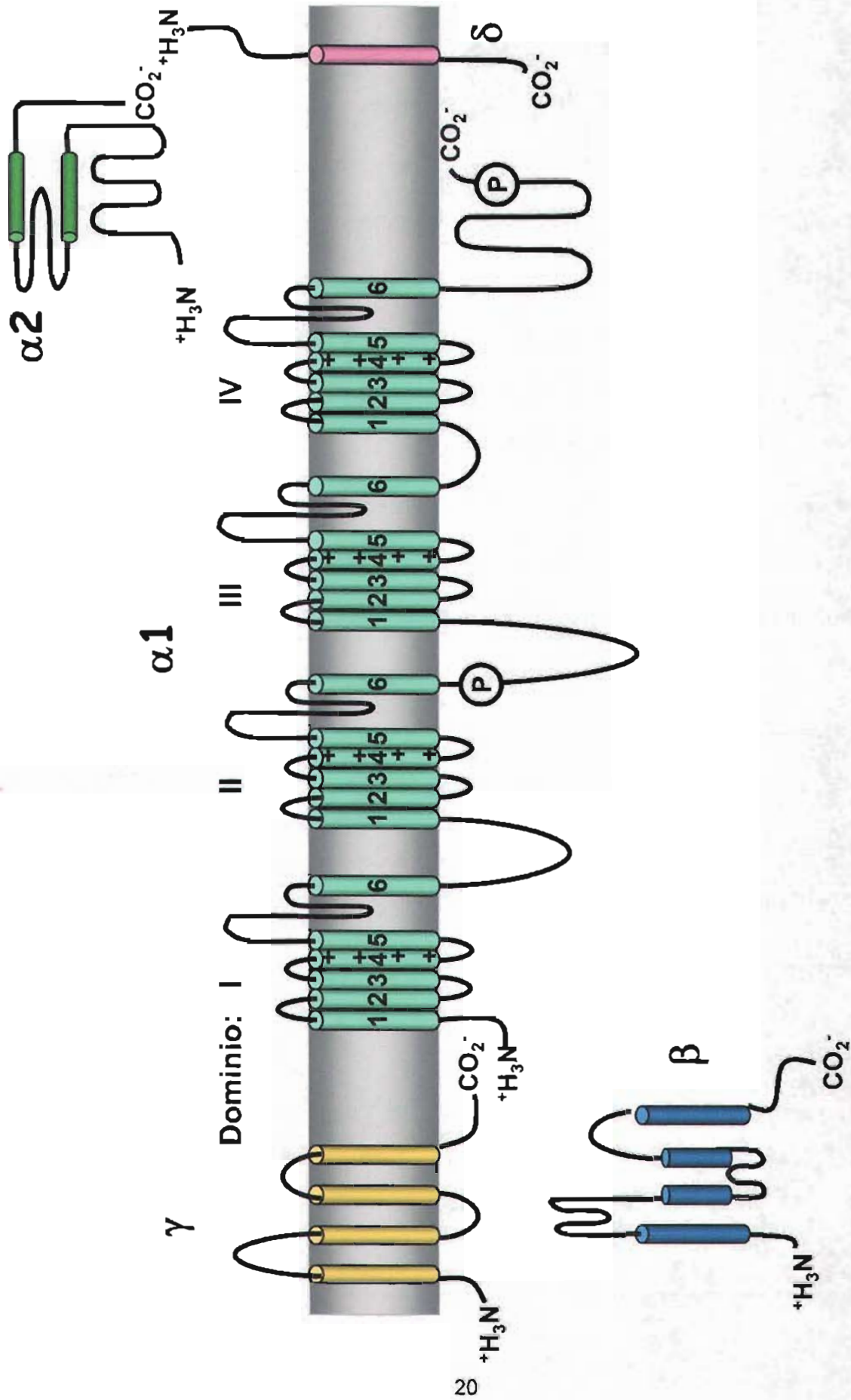


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de los canales Cav. P, sitios de fosforilación. Modificado de Catterall, 2000. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16: 521-55.

I.3.2 Los canales Ca_v y su participación en la movilidad del espermatozoide

Existen evidencias de la participación del Ca^{2+} en la regulación de la movilidad del espermatozoide (Tash and Means, 1987; Catterall et al., 2003). Este catión podría ser uno de los elementos clave en el mecanismo inicial por el cual se induce la movilidad hiperactivada (Suarez et al., 1987; Yanagimachi, 1994; Ho et al., 2002; Carlson et al., 2003). En el caso de los espermatozoides de humano los requerimientos de Ca^{2+} varían para cada una de las funciones fisiológicas. *In vitro*, para que se lleve a cabo tanto la capacitación como la movilidad hiperactivada se requiere de aproximadamente 0.2 mM de Ca^{2+} externo, pero para la RA y la interacción ZP-espermatozoide se necesita niveles alrededor de 0.6 mM de Ca^{2+} (Marin-Briggiler et al., 2003). En espermatozoides de mamífero se ha detectado la presencia de varias subunidades α_1 de los canales Ca_v en espermatozoides de mamíferos (Lievano et al., 1996; Goodwin et al., 1997; Goodwin et al., 1998; Serrano et al., 1999; Westenbroek and Babcock, 1999; Wennemuth et al., 2000). En espermatozoides de humano se detectaron los RNAm de la mayoría de los canales Ca_v : $Ca_v1.2$, $Ca_v2.2$, $Ca_v2.3$, $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$ excepto $Ca_v1.3$ y $Ca_v2.1$ (Goodwin et al., 2000; Jagannathan et al., 2002; Park et al., 2003). En células espermátogénicas y en testículo de humano se detectaron los mensajeros de los canales Ca_v tipo LVA: $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$. Ambos canales están presentes en múltiples isoformas (Jagannathan et al., 2002). Adicionalmente, un ratón con una supresión de $Ca_v2.3$ (α_{1E}), aunque fértil, tiene espermatozoides que nadan con una linealidad aumentada con respecto a los silvestres. Lo anterior sugiere que el canal $Ca_v2.3$ también juega un papel en el control del movimiento flagelar (Sakata et al., 2002).

Por otro lado se identificó una nueva familia de canales de Ca^{2+} (Ren et al., 2001) conocida como CatSper (Cation channels of Sperm). A la fecha esta familia está

constituida por 4 miembros: CatSper1 (Ren et al., 2001), CatSper2, (Quill et al., 2003), CatSper3 (Arias et al., 2003) y CatSper4 (Lobley et al., 2003). Estos canales se expresan preferencialmente en el testículo y cuando están presentes en otros tejidos, los niveles de los transcritos son muy bajos. Su estructura es similar a la de los canales de K^+ dependientes de voltaje o a un dominio de 6 segmentos TMs de los canales Ca_v . El segmento TM S4 de esta familia posee una secuencia similar al dominio del sensor de voltaje de los canales Ca_v y el asa que une S5 y S6 tiene similitud al dominio formador del poro de los canales Ca_v . La expresión específica en testículo de los miembros de la familia CatSper sugiere que pueden tener un papel en la fertilidad. CatSper1 (Quill et al., 2001; Ren et al., 2001) y CatSper2 (Quill et al., 2001) se localizan en el flagelo del espermatozoide. Los espermatozoides de ratón CatSper1^{-/-} muestran una disminución de la movilidad y no son capaces de fecundar a óvulos intactos. Los detalles moleculares de cómo CatSper funciona aún se desconocen ya que no se ha podido expresar heterológamente en forma funcional (Ren et al., 2001).

Los espermatozoides de hámster requieren de Ca^{2+} extracelular para mantener la hiperactivación *in vitro* (Yanagimachi, 1994). El tratamiento de espermatozoides de ratón con el ionóforo de Ca^{2+} A23187 rápidamente induce la hiperactivación de la movilidad (Suarez et al., 1987). También se observó un aumento en la concentración de AMPc intracelular que está asociado con la inducción de la hiperactivación de la movilidad (White and Aitken, 1989; Aoki et al., 1999). Un aumento en la fosforilación de proteínas en tirosina en el flagelo del espermatozoide de hámster también está asociada con la hiperactivación (Si y Okuno, 1999). En espermatozoides de hámster durante la movilidad hiperactivada se detectan fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ tanto en la pieza media distal y proximal del flagelo como en el acrosoma y en la región postacrosomal (Suarez et al.,

al., 1993). Recientemente se propuso que CatSper1 regula la movilidad hiperactivada, ya que los espermatozoides CatSper^{-/-} no son capaces de llevar a cabo esta función. Además se observó que la ausencia de CatSper1 y 2 no afecta la distribución de otros canales iónicos como Cav1.2, Cav2.2 y Cav2.3, tampoco se afecta la activación de la movilidad inducida por HCO₃⁻, ni la cascada de fosforilación que ocurre durante la capacitación (Carlson et al., 2003; Quill et al., 2003).

1.3.3 Canales tipo TRPC

Los canales TRP (por sus siglas en inglés *transient receptor potential*) comprenden una superfamilia de canales catiónicos que en condiciones fisiológicas son permeables a Ca²⁺ y participan en diversas funciones. Estos canales se identificaron inicialmente en *Drosophila* como una mutación (*trp*) que causa ceguera a la luz brillante, debido a un defecto de los canales TRP que median la transducción de señales de la visión (Cosens and Manning, 1969). La manera de activación y la selectividad iónica de los canales TRP es muy distinta. Algunos son activados por ligandos, mientras que otros lo son por estímulos físicos (por ejemplo calor, osmolaridad, etc.) y otros más por mecanismos aún desconocidos. Todos los canales TRP son selectivos a cationes, pero la relación Ca²⁺ versus Na⁺ (P_{Ca}/P_{Na}) varía de >100:1, a <0.05:1 (Huang, 2004).

La superfamilia de los 33 genes TRP se divide en 7 subfamilias, con base a la similitud de su secuencia (Wissenbach et al., 2004): 1) TRPC (canónicos), es la que está relacionada con los TRP de *Drosophila* y está formado por siete miembros; 2) TRPV (Vaniloide), llamada así por su primer miembro, el receptor a vaniloide, y está constituida por seis miembros; 3) TRPM (melastatina), llamada así por el gen de melastatina, constituida por 8 miembros (Minke and Cook, 2002; Clapham et al., 2003; Wissenbach et

al., 2004); 4) TRPP, que incluye a las proteínas ADPKD (proteína implicada en la enfermedad policística de riñón), policistina-2 (PC-2) y dos proteínas tipo-PC, 5) TRPML formada por 3 proteínas relacionadas a la proteína tipo IV de las mucolipinas (los productos de estos genes están mutados en pacientes con mucolipidosis e induce sordera y defectos de pigmentación); 6) TRPA está compuesta por un solo miembro, que se identificó en mamíferos y 7) TRPN, esta subfamilia no se ha identificado en mamíferos, y está formada por el canal de transducción mecanosensorial (NompC) en *Drosophila*, y canales relacionados en *C. elegans* y *Danio rerio*.

Estructuralmente los canales TRP son proteínas de 6 segmentos TM, el poro se encuentra entre los segmentos S5 y S6 (Fig.6). La región carboxilo y amino terminal se localizan del lado citoplásmico. Su estructura es similar a la de los canales Ca_v y a la de los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG), excepto que el segmento TM S4 no posee aminoácidos cargados positivamente, por ello los canales TRP son poco sensibles al voltaje. Sin embargo, recientemente se reportaron canales TRP (tres miembros de la familia TRPM4, 5 y 8) sensibles a voltaje (Fleig and Penner, 2004). Para formar un canal funcional los canales TRP se ensamblan como homo o heterotetrámeros, también se ha reportado la asociación entre proteínas de los diferentes subgrupos (PKD2 y TRPC1) (Tsiokas et al., 1999). Los TRPs de mamíferos pueden agruparse por la homología estructural de sus dominios TMs. Poseen un motivo de 25 aminoácidos (dominio TRP) que contiene la caja TRP (EWKFAR) en la región carboxilo terminal del segmento S6. El dominio y la caja TRP están presentes en la mayoría de los genes de los canales TRPC pero no en todos los genes TRP. La región amino terminal citoplásmica de TRPC, TRPV y TRPA (ANKTM) contiene repetidos de anquirina, mientras que el TRPC y el TRPM contienen segmentos ricos en prolina en la región carboxilo terminal del segmento S6. Los

canales TRP funcionan como canales de Ca^{2+} no selectivos ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \leq 10$), excepto los TRPM4 y TRPM5 que son selectivos a cationes monovalentes, y los TRPV5 y V6 que son selectivos a Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$) (Clapham et al., 2003).

En algunos tipos celulares de mamíferos la entrada de Ca^{2+} conocida como capacitativa contribuye a mantener los niveles de Ca^{2+} en las pozas internas. La entrada de este ión a través de esta vía también genera señales de Ca^{2+} importantes en diferentes funciones celulares (Montell et al., 2002). Evidencias recientes sugieren que los canales de Ca^{2+} capacitativos en mamíferos están codificados por algunos miembros de la superfamilia de canales TRPC, usualmente conocidos como canales operados por pozas internas (SOCs) (por sus siglas en inglés *store operated channels*). Hasta la fecha, no se conocen compuestos que directamente activen la entrada de Ca^{2+} capacitativa. Sin embargo, existen agentes que activan esta vía al propiciar el vaciamiento de pozas internas de Ca^{2+} . La tapsigargina y el ácido ciclopiazónico son inhibidores de la ATPasa de Ca^{2+} microsomal que bombean Ca^{2+} del citosol al retículo endoplásmico/sarcoplásmico (SERCA) (Zitt et al., 2002). Debido a este modo de acción, las pozas de Ca^{2+} en presencia de tapsigargina se vacían por una fuga de Ca^{2+} al citosol. Esta liberación de Ca^{2+} de las pozas promueve la activación de los canales tipo SOCs. Los inhibidores más simples de la entrada de Ca^{2+} capacitativa son los lantánidos trivalentes (Weiss et al., 1974). Uno de los mejor caracterizados, es el gadolinio (Gd^{3+}) (Parekh y Penner, 1993). El SKF96365 bloquea específicamente la fase de entrada de la respuesta (entrada de Ca^{2+} a través de la MP) en lugar de la fase de liberación (liberación de Ca^{2+} de las pozas internas) (Putney, 2001). Un inhibidor de los canales de Ca^{2+} capacitativos que recientemente se ha descrito es el 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB). Este compuesto entra libremente por la MP, originalmente se describió como un inhibidor del receptor a IP_3

(Ma et al., 2000). Se sugiere que el 2-APB puede actuar directamente sobre los canales de Ca^{2+} capacitativos y no sobre los receptores a IP_3 aunque no está totalmente comprobado.

El mecanismo por el cual el vaciamiento de las pozas regula la apertura de los canales de Ca^{2+} en la MP no es claro, sin embargo, existen al menos tres hipótesis para explicarla (Zitt et al., 2002): 1) Presencia de un factor activador citosólico (**CIF** por sus siglas en inglés Cytosolic Influx Factor). En esta hipótesis una molécula difusible no identificada se libera cuando ocurre el vaciamiento de las pozas internas de Ca^{2+} , y actúa directamente como activador de los canales SOCs (Parekh et al., 1993; Randriamampita and Tsien, 1993). Recientemente, se propuso un nuevo mecanismo de regulación de la entrada de Ca^{2+} capacitativa que involucra la participación del CIF. Se sugiere que el CIF desplaza a la calmodulina (CaM) de la fosfolipasa A_2 independiente de Ca^{2+} , esto permite su activación y se producen lisofosfolípidos que directamente activarían a los canales SOCs (Smani et al., 2004). 2) Interacción proteína-proteína. Esta hipótesis plantea una interacción física entre el canal TRP localizado en la MP y el receptor a IP_3 (IP_3Rs) presente en las pozas de Ca^{2+} (Kiselyov et al., 1998). 3) Vesículas secretoras. En esta hipótesis las vesículas que contienen los canales se fusionarían con la MP después de una señal apropiada y darían origen a la entrada capacitativa de Ca^{2+} (Yao et al., 1999). No obstante, se sabe que no todos los canales TRPC son activados por el vaciamiento de pozas internas de Ca^{2+} . Los canales TRPC que no son SOCs se pueden activar de distintas maneras como por ejemplo mediante lípidos como el DAG.

1.3.4 Los canales tipo TRPC y su participación en la movilidad del espermatozoide

En el espermatozoide la regulación de los canales tipo SOCs es controversial ya que estas células carecen de los organelos que funcionan como pozas internas de Ca^{2+} . En el espermatozoide de ratón el receptor a IP_3 se localiza en el acrosoma, indicando que el Ca^{2+} puede almacenarse y ser liberado de este organelo (Walensky et al., 1995; Trevino et al., 1998; Herrick et al., 2005). También se describió la presencia de una estructura llamada RNE en el espermatozoide de toro (por sus siglas en inglés Redundant Nuclear Envelope), que en otros tipos celulares funciona como poza interna de Ca^{2+} . Esta estructura también se encuentra en los espermatozoides de ratón, hámster, mono, murciélago, toro y humano (Ho y Suarez, 2003). Este grupo de investigación sugiere que la poza interna que almacena Ca^{2+} en el espermatozoide de toro es el RNE y que libera Ca^{2+} directamente al axonema para disparar la hiperactivación (Ho and Suarez, 2003). Sin embargo, también se ha reportado la apertura de diversos canales TRPC de manera independiente al vaciamiento de pozas internas (Chyb et al., 1999). En humano los canales TRPC6 y TRPC3 se activan por DAG (Hofmann et al., 1999b). La presencia de canales TRPCs se han reportado en células espermátogénicas y en el espermatozoide de ratón. Treviño y cols. detectaron los mensajeros de los TRPC (TRPC1-7) en células espermátogénicas (CE) de ratón y la presencia de las proteínas TRPC1, 3, 5 y 6 en el espermatozoide (Trevino et al., 2001; Sutton et al., 2004). TRPC1 y TRPC3 se localizan en el flagelo (Trevino et al., 2001). En ratón, TRPC2 se localiza en la cabeza del espermatozoide (Jungnickel et al., 2001). En testículo de bovino se detectó la presencia de RNAm de *btrpc2* (Wissenbach et al., 1998).

En ratón la ZP3, una glicoproteína de la ZP del óvulo, dispara la RA, causando una entrada de Ca^{2+} transitoria en el espermatozoide probablemente a través de los canales

Ca_v tipo T. Esta respuesta inicial promueve un aumento de Ca²⁺ sostenido que lleva a la RA (O'Toole et al., 2000). Se propone que el TRPC2 participa en la entrada de Ca²⁺ sostenida inducida por ZP3 (Jungnickel et al., 2001). Dado que el ratón mutante TRPC2^{-/-} es fértil, se sugiere que tal vez otros TRPCs o subunidades desconocidas puedan sustituir a TRPC2 (Leypold et al., 2002). Es importante mencionar que el gen TRPC2 en humano es un pseudogen, porque tiene codones de terminación tempranos (Zhu et al., 1996).

La distribución de los canales TRPC en el espermatozoide es heterogénea, ya que se localiza en la cabeza y en el flagelo. Aunque la función de los diferentes canales TRPC en el flagelo del espermatozoide es desconocida, se especula que ellos pueden participar en eventos de fecundación tal como iniciación de la movilidad (activada e hiperactivada). Sin embargo, el mecanismo por el cual el Ca²⁺ llega al axonema para modular la movilidad no se ha identificado.

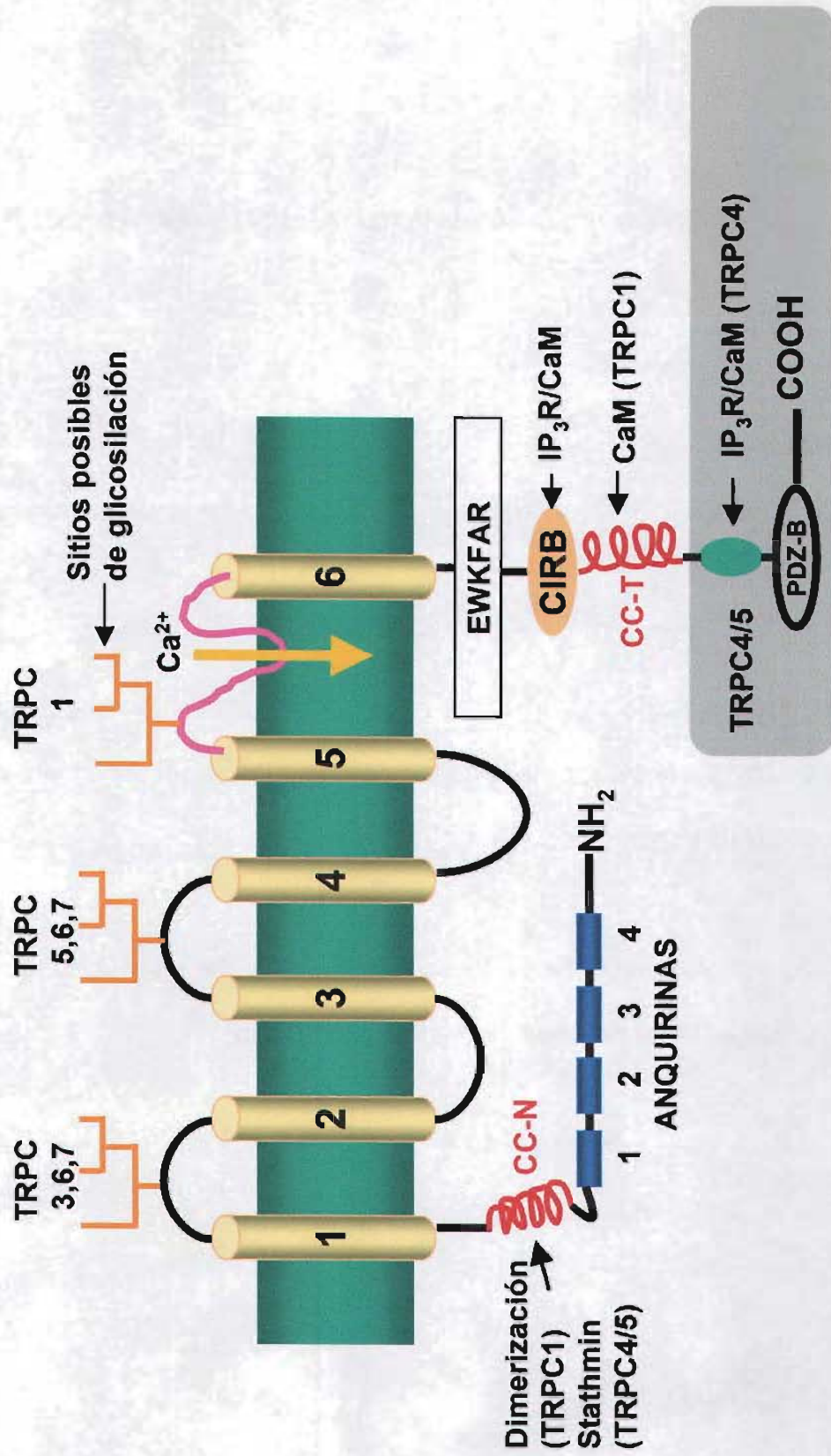


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de los canales tipo TRPC. CC-N y CC-C son dominios N-terminal y C-terminal superenrollados, respectivamente. La región en gris en el extremo C-terminal es específica para TRPC4 y 5.

HIPÓTESIS

Los canales de Ca^{2+} participan en la regulación de la movilidad del espermatozoide de humano.

OBJETIVO GENERAL

Identificar los canales de Ca^{2+} que participan en la movilidad del espermatozoide de humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Estudiar la localización subcelular de los canales de Ca^{2+} que participan en la movilidad del espermatozoide de humano.
- 2.- Estudiar el efecto de bloqueadores de los canales Ca_v y de los SOCs sobre la movilidad activada e hiperactivada del espermatozoide de humano.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Reactivos

Los reactivos utilizados se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: Ham's F-10 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), anticuerpos contra los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA), anticuerpos contra los canales TRPC, calciseptina, nimodipina y nifedipina (Alomone labs, Jerusalén, Israel), anticuerpos secundarios acoplados a Alexa (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) albúmina sérica bovina (BSA), NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HP0}_4$, KH_2PO_4 , paraformaldehído, tritón X-100, NiCl_2 , GdCl_3 , mibefradil, gopipol, EGTA (Sigma-Aldrich), portaobjetos multi-pozos cubiertos con bioadhesivo (Erie Scientific Company, Portsmouth, NH), leche baja en grasa (Svelty, Nestle), citifluor (Ted Pella Inc., Redding, CA), SKF96365 (Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA), 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB) (Calbiochem), ZD7288 (Tocris Cookson Inc., Ellisville, MO). Los bloqueadores fueron preparados a partir de una solución 100 mM en agua destilada (Ni^{2+} , Gd^{3+} , ZD7288, mibefradil, calciseptina y SKF96365) o dimetilsulfóxido (DMSO) (2-APB, nifedipina, nimodipina). Composición del medio BWB (En mM, NaCl 95, KCl 4.8, CaCl_2 1.7, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, glucosa 5.6, ácido pirúvico 0.25, HEPES 20, NaHCO_3 15 y ácido láctico 20).

II.2 Separación de los espermatozoides móviles

Las muestras de semen se colectaron de donadores sanos mediante masturbación, las cuales cumplieron con los parámetros establecidos (licuefacción positiva, densidad espermática >20 millones de células/ml, movilidad >50%, 14% de espermatozoides normales) por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Los espermatozoides móviles se separaron del semen mediante la técnica de “*swim up*” (Yunes et al., 2000). Para que ocurra la licuefacción, la muestra de semen se dejó de 20 a 30 minutos a 37°C, 5% CO₂. Un ml de semen se transfirió a un tubo de ensayo y se adicionó lentamente 1 ml del medio de cultivo Ham’s F-10 (contiene 0.3 mM de CaCl₂) en ausencia o en presencia de 5 mg/ml de BSA (medio Ham’s F-10 modificado) y se incubó durante 1 h a 37°C, 5% de CO₂, colocando el tubo en una gradilla con una inclinación de 45°. Los espermatozoides móviles se recuperaron tomando cuidadosamente 750 µl de la parte superior del tubo (90-95% de los espermatozoide recuperados estaban móviles). Para eliminar los restos de fluido seminal, las células se lavaron (2 x 10 min.) a 700 x g con el medio Ham’s F-10.

II.3 Inmunolocalización de los canales de Ca²⁺

Los espermatozoides de humano móviles recuperados mediante la técnica del “*swim up*”, se lavaron (2 X 5 min.) a 700 x g con el amortiguador salino de fosfatos (PBS), pH 7.4 y se fijaron durante 10 min. con paraformaldehído a una concentración final del 5%, se lavaron con PBS (2 X 5 min.) y se ajustaron a 1 X 10⁶ células/ml. Después se colocaron alícuotas de 100 µl en portaobjetos de vidrio cubiertos con bioadhesivo® para aumentar el pegado de las células y se dejaron sedimentar por al menos 90 min. Las células sedimentadas se lavaron adicionando 200 µl de PBS (3 X 10 min.), se permeabilizaron con tritón al 0.1% durante 10 min., se lavaron con PBS (3 X 10 min.) y se bloquearon mínimo por 1 h con leche baja en grasa a una concentración final de 5% disuelta en PBS o con BSA al 2%. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario contra los diferentes canales de Ca²⁺ diluidos en leche al 5% (ver Tabla 2). Los controles se procesaron de la misma manera, solo que los

anticuerpos primarios se preincubaron durante hora y media con su respectivo péptido antigénico. Después de lavar con PBS (3 X 10 min.), las muestras se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 o Alexa 594 diluido (ver Tabla 2) en PBS y se lavaron nuevamente con PBS (3 X 10 min.). Las preparaciones se montaron con Citifluor que ayuda a mantener la fluorescencia. Las imágenes fluorescentes se adquirieron con un microscopio confocal Biorad MRC-600 Kr-Ar y se analizaron con el “software Confocal Assistant”. Las imágenes que se muestran son representativas de al menos 3 experimentos.

Tabla 2. Anticuerpos contra los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y los TRPC.

Anticuerpo primario	Fuente	Dilución anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Dilución anticuerpo secundario	Relación anticuerpo/péptido
Ca _v 1.2	Conejo ^a	1:100	Alexa	1:100	1:2
Ca _v 1.3	Conejo ^a	1:100	Alexa	1:100	1:8
Ca _v 2.1	Conejo ^a	1:25	Alexa	1:100	1:8
Ca _v 2.2	Conejo ^a	1:50	Alexa	1:100	1:4
Ca _v 2.3	Conejo ^a	1:100	Alexa	1:100	1:2
Ca _v 3.1 (N- y C-Terminal)	Cabra ^{a, b}	1:100	Alexa	1:100	1:4
Ca _v 3.2 (N- y C-Terminal)	Cabra ^b	1:100	Alexa	1:100	1:2
Ca _v 3.3 (N- y C-Terminal)	Cabra ^b	1:100	Alexa	1:100	1:8
TRPC5	Conejo ^a	1:100	Alexa	1:100	1:4
TRPC6	Conejo ^a	1:50	Alexa	1:100	1:8

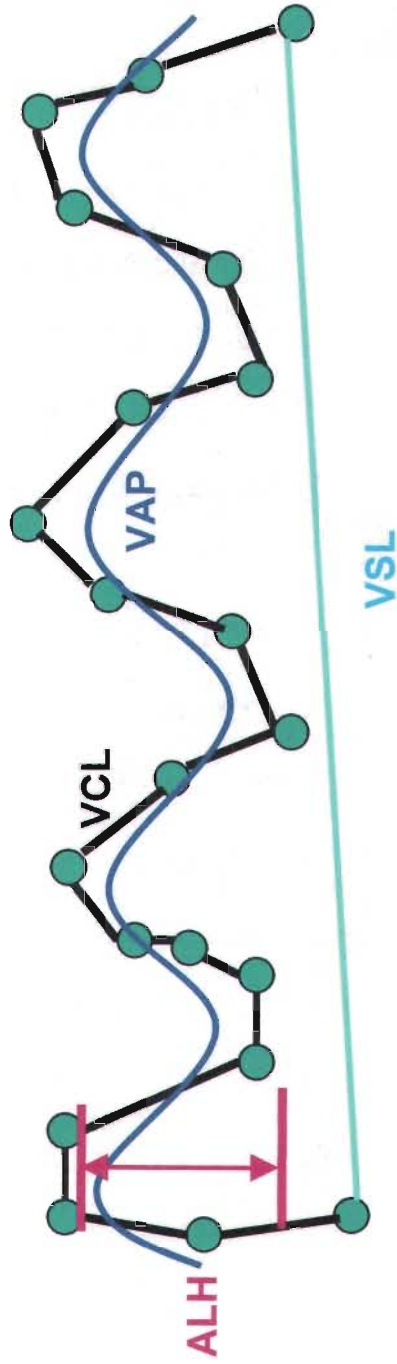
^a Alomone labs (Jerusalén, Israel)

^b Santa Cruz Biotechnology, Inc.

II.4 Evaluación de la movilidad del espermatozoide y estudios farmacológicos

Después de separar los espermatozoides móviles, la suspensión de espermatozoides se ajustó a una concentración de $8-15 \times 10^6$ células/ml. La evaluación de la movilidad se llevó a cabo utilizando el equipo Hamilton–Thorne HTM-IVOS-12 y el equipo Hobson Tracker System (Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) system). Estos equipos son utilizados en clínicas de fertilización, y una vez analizadas las muestras permiten determinar si los individuos tienen problemas de fertilidad. Se ha observado que poblaciones de espermatozoides con bajo porcentaje de hiperactivación tienen poco éxito de fecundar *in vitro*. La velocidad de adquisición de los dos equipos es de 60 Hz. Ambos instrumentos miden el porcentaje de espermatozoides móviles y los siguientes parámetros de movilidad (Fig. 7): la velocidad curvilínea (VCL; es la distancia total que recorre el espermatozoide dividida por el tiempo, en $\mu\text{m/s}$), este tipo de velocidad es muy importante para determinar si el espermatozoide está hiperactivado, si el valor de la VCL disminuye ($<150 \mu\text{m/s}$), indica que el espermatozoide tiene un movimiento progresivo; la velocidad promedio (VAP; es la distancia total a lo largo de una trayectoria promedio dividida por el tiempo, en $\mu\text{m/s}$), la velocidad progresiva (VSL; se determina de la distancia en línea recta entre el primero y el último punto de la trayectoria del espermatozoide dividida por el tiempo, en $\mu\text{m/s}$). Estos valores permiten determinar la linearidad (LIN) y la dirección recta (STR), que se derivan como sigue: $\text{LIN} = (\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$, $\text{ST} = (\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$, estos dos parámetros se expresan en porcentaje e indican si el espermatozoide tiene una trayectoria progresiva o errática. Si el espermatozoide tiene una trayectoria progresiva el valor de la LIN es mayor al 50% y si su movimiento es errático su valor es menor del 50%. La amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) es la amplitud total de la trayectoria de la cabeza y está expresada en μm , valores mayores a $7 \mu\text{m}$ indican que el

espermatozoide puede estar hiperactivado y valores menores a 7 μm indican que el espermatozoide tiene un movimiento activado o progresivo. La frecuencia de cruce del bateo (BCF) es el número de veces que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección del movimiento, y está relacionada con el desarrollo de otra onda flagelar, se expresa en hertz. El BCF es útil para hacer una estimación gruesa del patrón del bateo flagelar. A diferencia del equipo Hamilton, el equipo Hobson determina de manera automatizada el porcentaje de espermatozoides hiperactivados (considerando los siguientes parámetros $\text{LIN} < 50\%$, $\text{VCL} > 150 \mu\text{m/s}$, $\text{ALH} > 7 \mu\text{m}$), lo cual nos permitió hacer estudios de hiperactivación. La hiperactivación puede ser considerada como un biomarcador de la capacitación, la cual es fundamental para que el espermatozoide lleve a cabo la RA y pueda fecundar al óvulo. Esto lo hace muy útil para aplicaciones clínicas. Los estudios de movilidad se llevaron a cabo en espermatozoides activados e hiperactivados. En el caso de los espermatozoides activados el "swim up" se realizó en el medio Ham's en ausencia de BSA, y para la hiperactivación (evento que ocurre durante la capacitación y que requiere de albúmina) en presencia de 5 mg/ml de BSA. Los espermatozoides se capacitaron mediante incubación, durante 6 h, a 37°C, 5% CO_2 . El efecto de los diferentes bloqueadores de los canales de Ca^{2+} sobre la movilidad activada, se estudió adicionando los inhibidores, después de recuperar los espermatozoides móviles, a diferentes concentraciones e incubando durante 10 minutos para el caso del mibefradil, SKF96365, ZD7288, 2-APB, nifedipina y calsiceptina. Para el caso del Ni^{2+} y Gd^{3+} la lectura se hizo inmediatamente después de la adición. Para la movilidad hiperactivada se incubaron los bloqueadores tanto después de la capacitación como durante el tiempo de la capacitación y en este último caso se hicieron lecturas a diferentes tiempos de incubación con la droga.



$$STR = (VSL/VAP) \times 100$$

$$LIN = (VSL/VCL) \times 100$$

● = Célula por cuadro

Figura 7. Representación esquemática de los parámetros CASA de los espermatozoides de humano. VCL (Velocidad curvilínea), VAP (Velocidad curvilínea), VSL (Velocidad promedio), VSL (Velocidad promedio), ALH (Desplazamiento lateral de la cabeza), LIN (Linealidad), STR (Dirección recta).

III. RESULTADOS

III.1 Inmunolocalización de los canales de Ca^{2+} en el espermatozoide de humano

A) Inmunolocalización de los canales Ca_v

Al inicio de este trabajo se sabía que tanto el RNAm como la proteína de $Ca_v1.2$ (HVA) están presentes en los espermatozoides de humano (Goodwin et al., 1997; Goodwin et al., 2000). Además, recientemente también se detectaron los RNAm en el siguiente orden de abundancia: $Ca_v3.2 \geq Ca_v3.1 \geq Ca_v2.3 \geq Ca_v2.1 > Ca_v1.2 > Ca_v3.3$, pero no se detectaron los mensajeros de $Ca_v1.3$ y $Ca_v2.1$ (Park et al., 2003). Sin embargo, no se tenía evidencia de estos canales a nivel de proteína en el espermatozoide maduro de humano. Con el objeto de identificar y determinar la distribución subcelular de los canales Ca_v que podrían estar participando en la movilidad del espermatozoide de humano, se llevaron a cabo experimentos de inmunolocalización con anticuerpos comerciales contra los canales HVA ($Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$) y los LVA ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$). Cuando se inicio este proyecto no se sabía que los mensajeros de $Ca_v1.3$ y $Ca_v2.1$ no estaban presentes en el espermatozoide de humano, fue por ello que se llevó a cabo la inmunolocalización.

En el caso de los canales de Ca^{2+} HVA, identificamos a $Ca_v1.2$ y $Ca_v2.3$. Previamente se había reportado la presencia de $Ca_v1.2$ en la región del acrosoma del espermatozoide de humano (Goodwin et al., 1998). En el presente trabajo, $Ca_v1.2$ da una señal positiva en la región postacrosomal, en la pieza media del flagelo, a lo largo de la pieza principal y la pieza terminal, siendo un poco más fuerte la señal en esta última región (Fig. 8), pero no observamos tinción en el acrosoma. El anticuerpo contra $Ca_v2.3$ reconoce la pieza principal del flagelo y la región del acrosoma (Fig. 9). Los experimentos control usando anticuerpos bloqueados por la exposición previa al péptido antigénico no

mostraron fluorescencia residual, indicando la especificidad de la señal (Fig. 8D y 9D). Los anticuerpos $Ca_v1.3$, $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ (HVA) no dieron resultados concluyentes, debido a que la preincubación de los anticuerpos con sus respectivos péptidos antigénicos dieron una señal residual, lo cual dificultó poder determinar si la señal es específica.

Identificamos a los tres miembros del grupo LVA hasta ahora reportados ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$). La imagen de microscopía confocal obtenida con el anticuerpo anti- $Ca_v3.1$ de Alomone Labs, muestra una señal específica en la cabeza y en la pieza media y principal del flagelo (Fig. 10). Sin embargo, los resultados obtenidos con anti- $Ca_v3.1$ de Santa Cruz Biotechnologies no son concluyentes debido a que la inmunotinción no se bloqueó por su péptido antigénico. El anticuerpo $Ca_v3.2$ reconoce la pieza principal del flagelo con una intensa señal punteada y excluye la pieza media y terminal del flagelo. (Fig. 11). La tinción para $Ca_v3.3$ está restringida a la pieza media (Fig. 12). Para los tres anticuerpos la señal se elimina en los experimentos de preincubación con el péptido antigénico, por lo que se considera que esta señal es específica (Fig. 10D, 11D y 12D).

Para corroborar la especificidad de los anticuerpos, se repitieron los experimentos de inmunolocalización preincubando los anticuerpos con péptidos antigénicos diferentes a los usados para producir el anticuerpo. Para ambos anticuerpos ($Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$) la señal se elimina únicamente en los experimentos de preincubación con su correspondiente péptido antigénico (Fig. 13D y 14D) y no así con otros péptidos (Fig. 13F, 13H y 14F, 14H), con esto se confirma nuevamente que esta señal es específica.

Realizamos controles de especificidad adicionales mediante experimentos de inmunolocalización utilizando células HEK-293 (por sus siglas en inglés **H**uman **E**mbrionic **K**idney), en las cuales se expresaron heterológicamente e independientemente cada uno de los canales tipo T ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$). Estas células no expresan endógenamente

este tipo de canales. Las células HEK-293 que expresan heterológicamente $Ca_v3.1$ se incubaron con cada uno de los anticuerpos. Como era de esperarse, solo se observó señal con el anticuerpo contra $Ca_v3.1$ (Fig. 15B) y no con los otros dos anticuerpos ($Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$) (Apéndice I). El experimento control usando el anticuerpo bloqueado por la exposición previa al péptido antigénico no mostró fluorescencia residual, esto nuevamente indica la especificidad de la señal (Fig. 15D). Lo mismo se hizo con las células HEK-293 que expresan heterológicamente $Ca_v3.2$, se incubaron con el anticuerpo anti- $Ca_v3.1$ (Fig. 16B) y anti- $Ca_v3.3$ (Apéndice I) y como se anticipó, no hubo tinción y solo se observó señal con el anticuerpo contra $Ca_v3.2$ (Apéndice I). Al incubar las células HEK-293 que expresan heterológicamente $Ca_v3.3$ con el anticuerpo anti- $Ca_v3.1$ (Fig. 17B) y anti- $Ca_v3.2$ (Apéndice I) tampoco se observó señal, únicamente con el anticuerpo anti- $Ca_v3.3$ (Apéndice I). Estos controles se hicieron para cada uno de los anticuerpos ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$) con cada una de las células que expresan heterológicamente los diferentes canales tipo T (Apéndice I).

La expresión y localización de estos canales en el espermatozoide se confirmó usando microscopía electrónica de transmisión (los experimentos se realizaron en el grupo del Dr. Víctor Tsutsumi, CINVESTAV, México). Las partículas de oro se localizaron preferencialmente en la membrana plasmática del flagelo y en menor proporción en la cabeza (Trevino et al., 2004). La baja abundancia de Ca_v en la cabeza nos ayuda a explicar la dificultad de detectar estos canales en esta parte de la célula por inmunofluorescencia (Fig. 15-17).

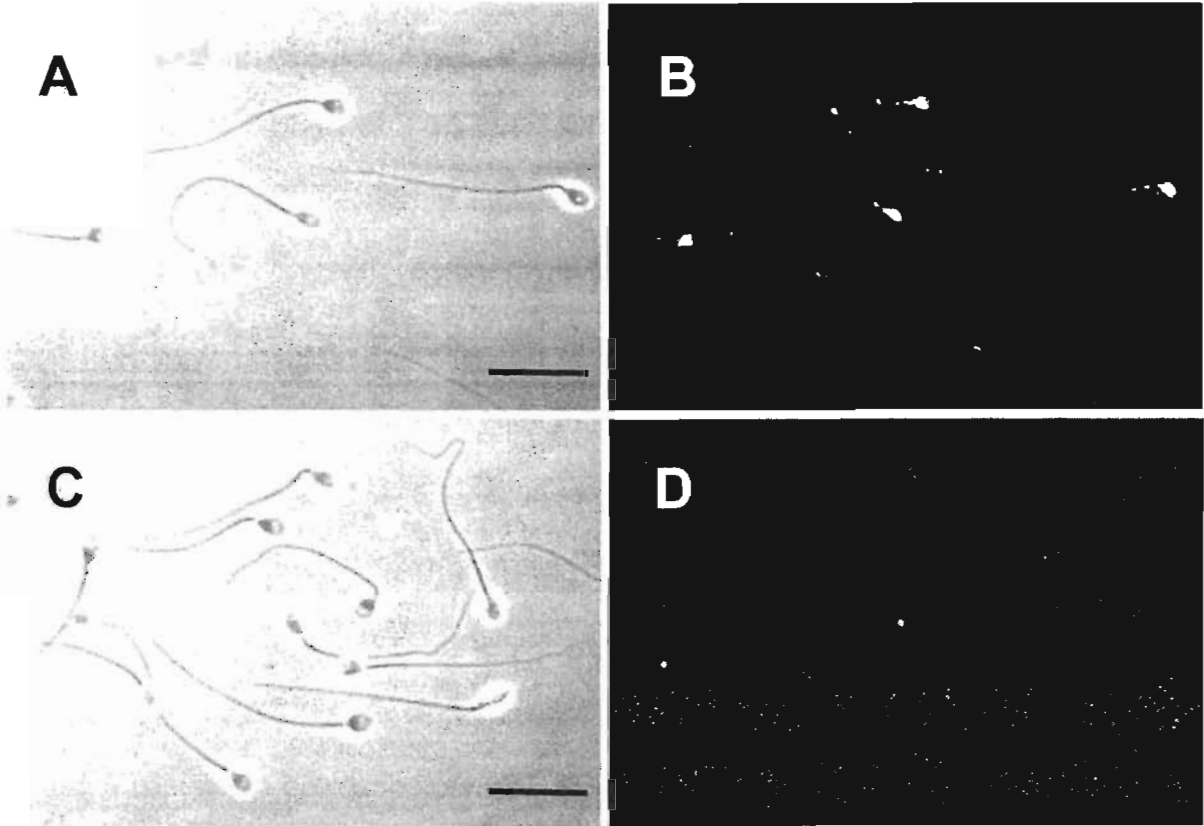


Figura 8. Inmunolocalización del canal $Ca_v1.2$ en los espermatozoides de humano. (A y C) Imágenes de los espermatozoides en contraste de fases. (B) La imagen de microscopía confocal muestra una tinción en la región postacrosomal, en la pieza media, principal y terminal del flagelo del espermatozoide. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:2) correspondiente, lo que indica que la señal es específica (n = 5). Barra de escala = 20 μ m.

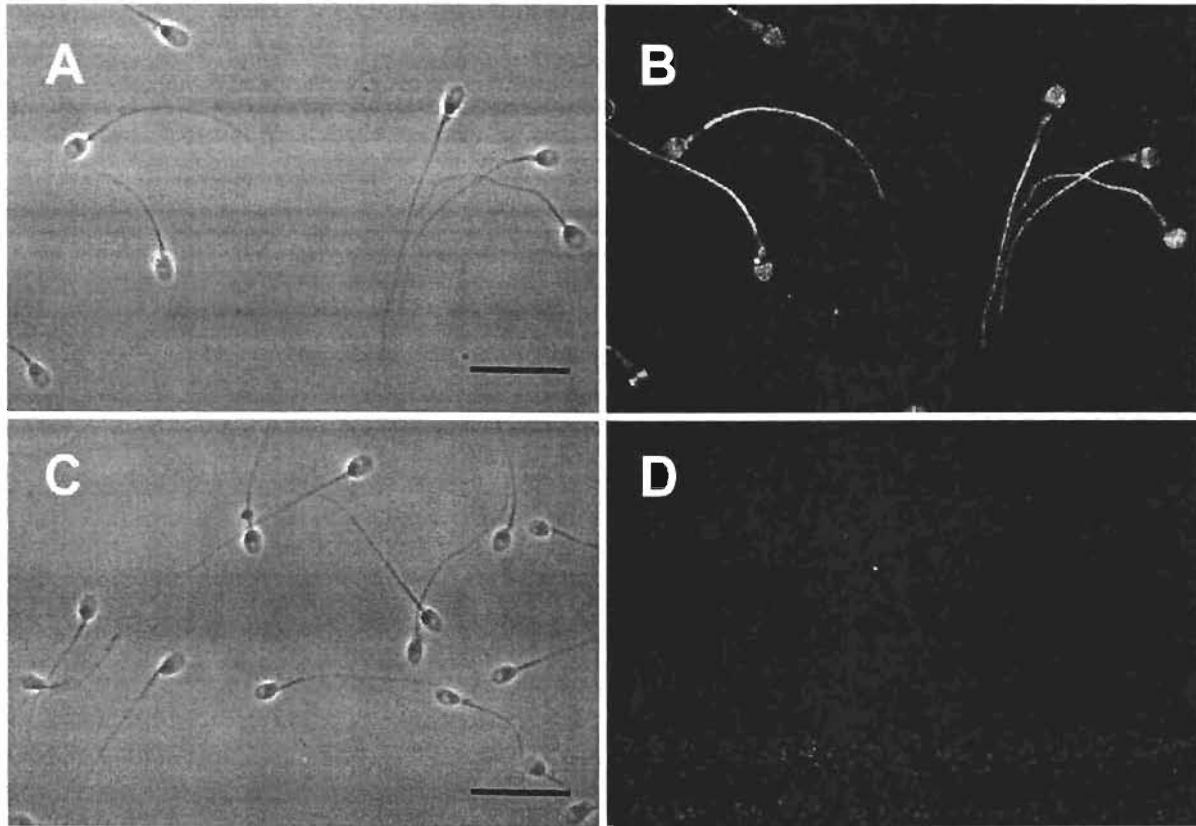


Figura 9. Inmunolocalización del canal $Ca_v2.3$ en los espermatozoides de humano. (A y C) Imágenes de los espermatozoides en contraste de fases. (B) La imagen de microscopía confocal muestra que el anticuerpo $Ca_v2.3$ reconoce el segmento ecuatorial de la cabeza, el acrosoma y la pieza principal del flagelo del espermatozoide. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:2) correspondiente, lo que indica que la señal es específica (n = 4). Barra de escala = 20 μ m.

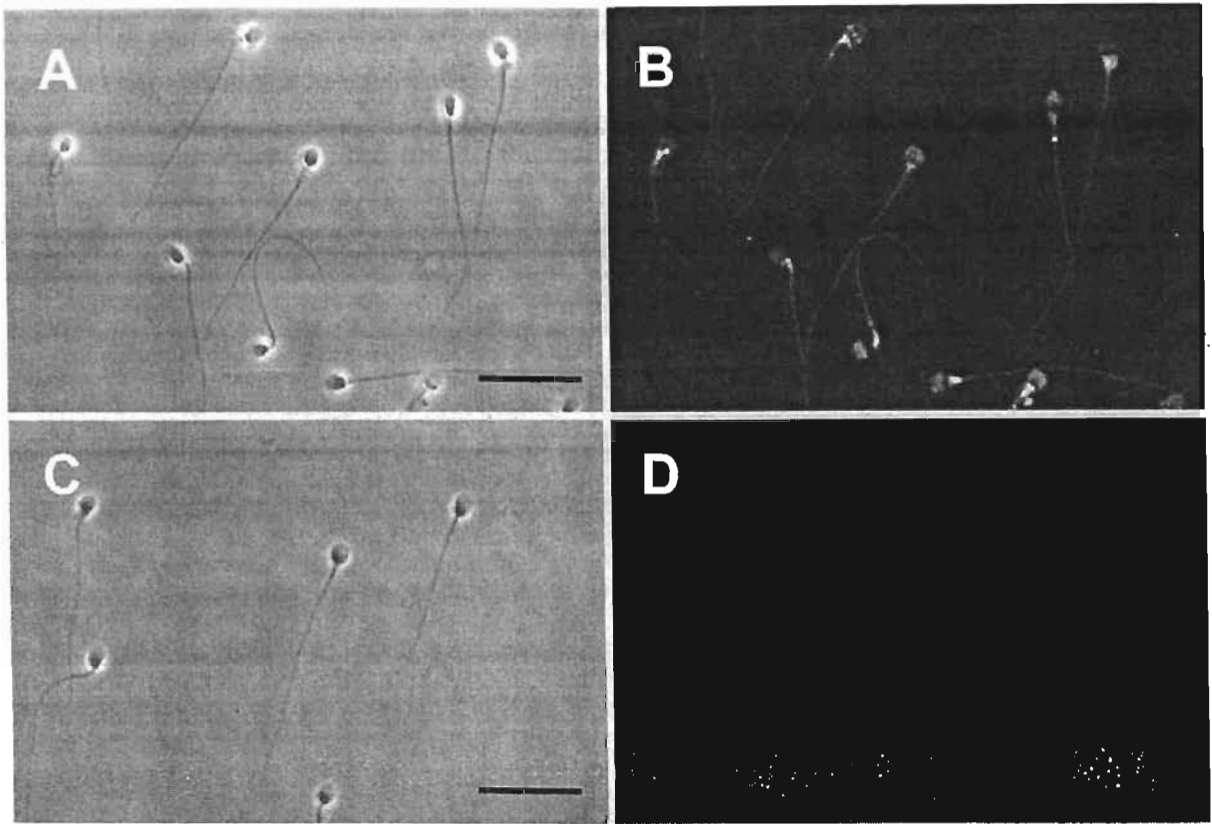


Figura 10. Inmunolocalización del canal $Ca_v3.1$ en los espermatozoides de humano. (A y C) Imágenes de los espermatozoides en contraste de fases. (B) La imagen de microscopía confocal muestra que anticuerpo $Ca_v3.1$ reconoce la cabeza, la pieza media y la principal del flagelo. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:4) correspondiente, lo que indica que la señal es específica (n = 4). Barra de escala = $20\mu\text{m}$.

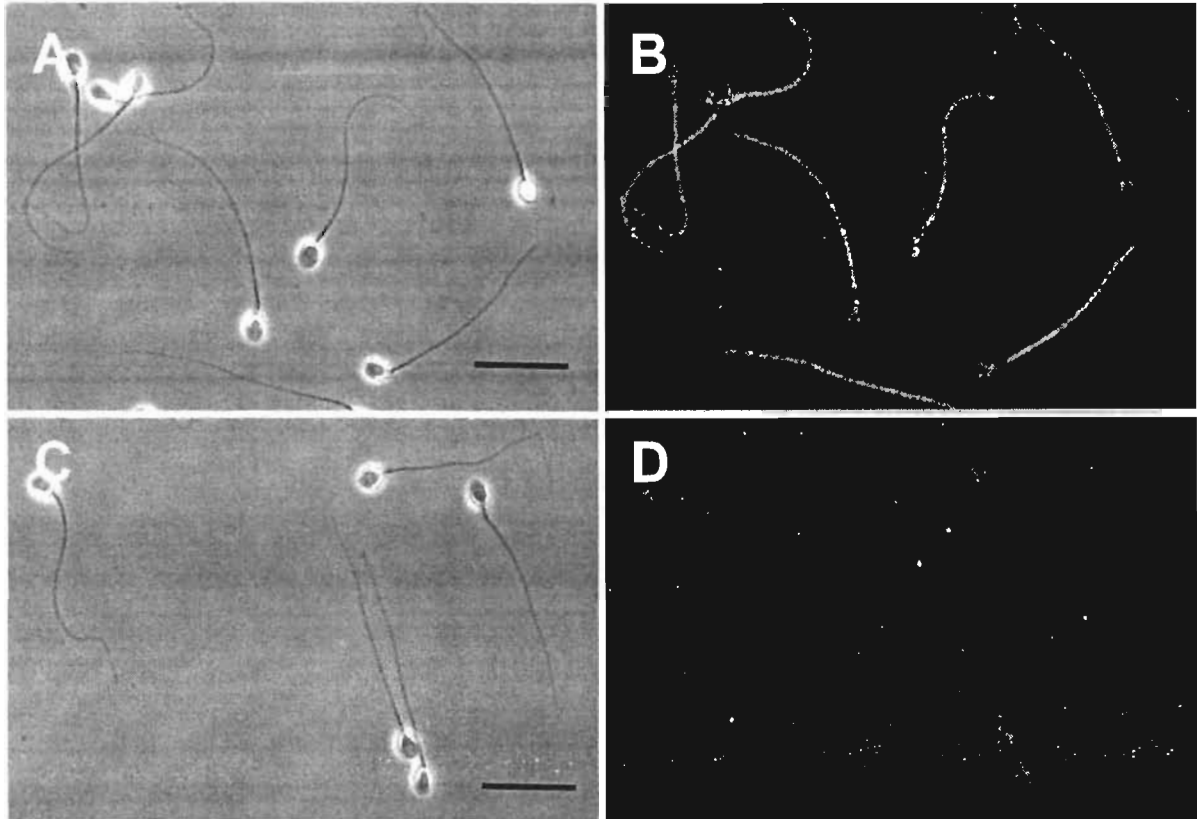


Figura 11. Inmunolocalización del canal $Ca_v3.2$ en los espermatozoides de humano. (A y C) Imágenes de los espermatozoides en contraste de fases. (B) La imagen de microscopía confocal muestra que el anticuerpo $Ca_v3.2$ reconoce la pieza principal del flagelo. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:2) correspondiente, lo que indica que la señal es específica (n = 6). Barra de escala = 20 μ m.

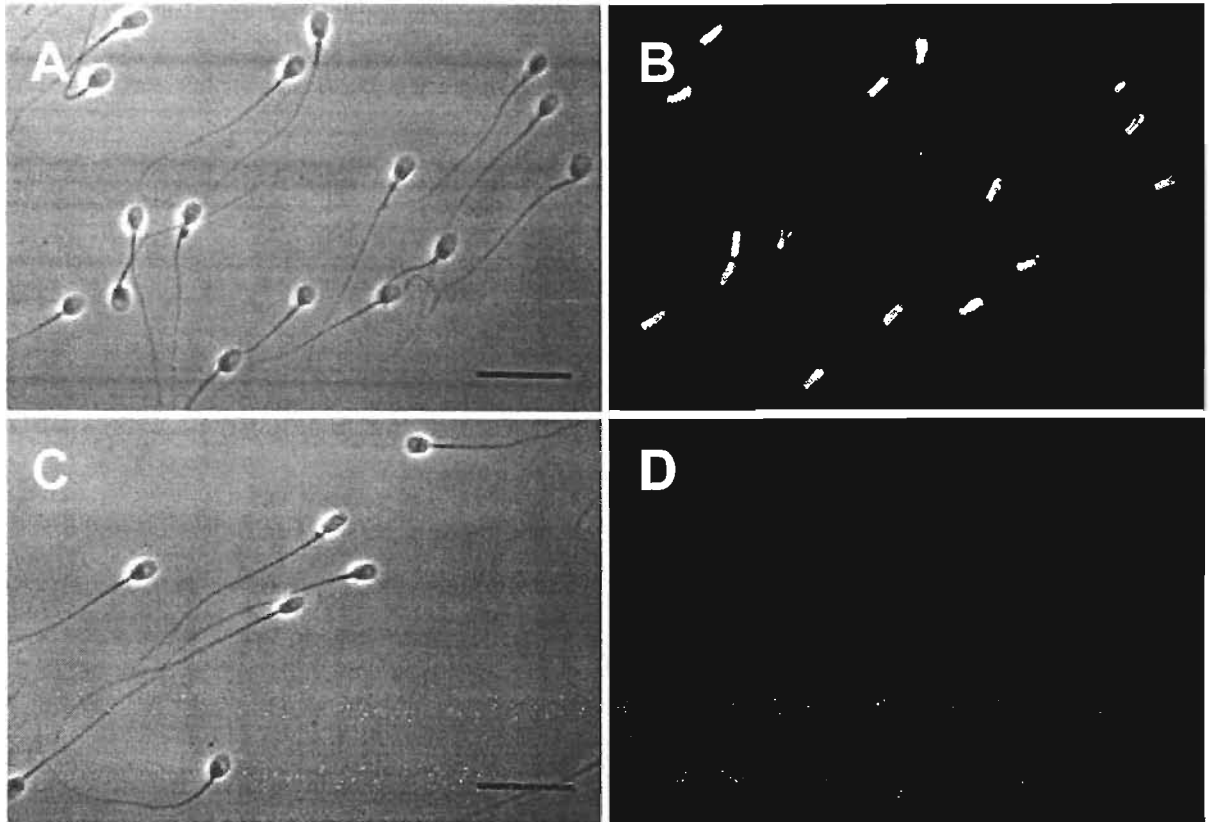


Figura 12. Inmunolocalización del canal $Ca_v3.3$ en los espermatozoides de humano. (A y C) Imágenes de los espermatozoides en contraste de fases. (B) La imagen de microscopía confocal muestra una tinción restringida en la pieza media del flagelo. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:8) correspondiente, lo que indica que la señal es específica (n = 6). Barra de escala = 20 μm .

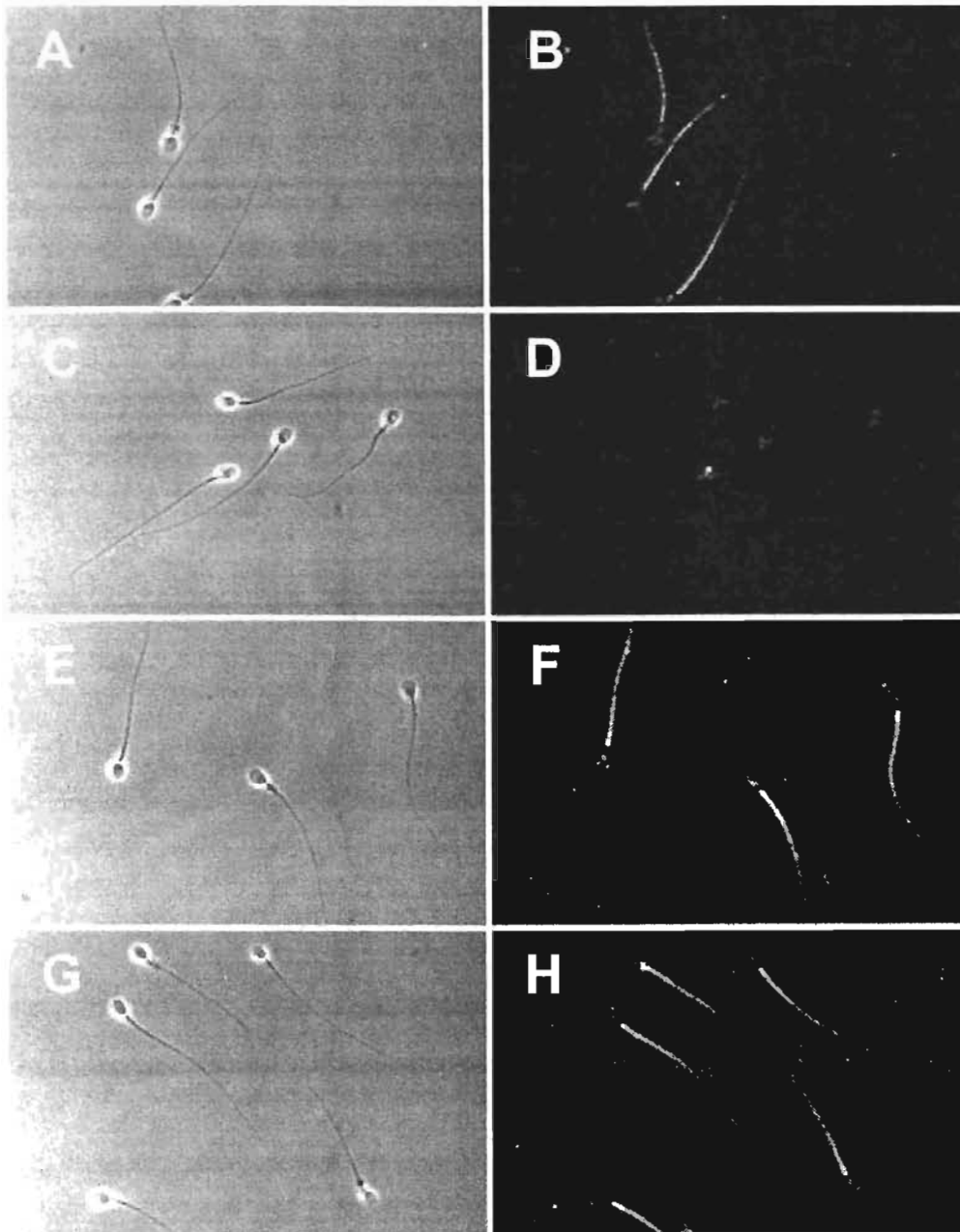


Figura 13. Inmunolocalización del canal $Ca_v3.2$ en los espermatozoides de humano. (A, C, E, y G) Imágenes de los espermatozoides en contraste de fases. (B) El anticuerpo $Ca_v3.2$ reconoce la pieza principal del flagelo. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:2) correspondiente. Al preincubar el anticuerpo con un péptido distinto al antigénico la señal no se elimina, péptido para (F) $Ca_v3.3$ (1:2) y (H) péptido para TRPC3 (1:2). Confirma que la tinción es específica ya que únicamente se eliminó la señal al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (n = 3).

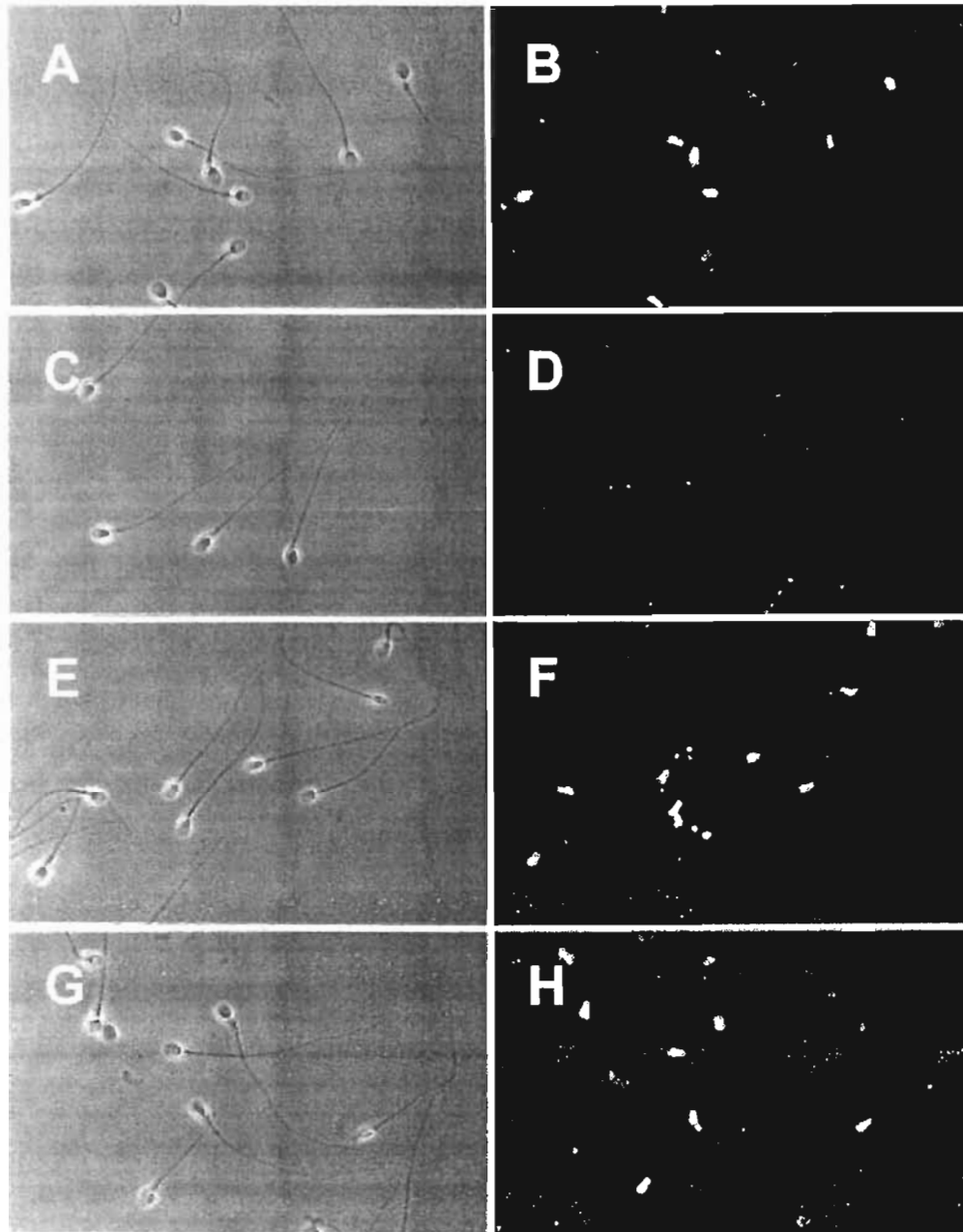


Figura 14. Inmunolocalización del canal $Ca_v3.3$ en los espermatozoides de humano. (A, C, E, y G) Imágenes de los espermatozoides en contraste de fases. (B) La imagen de microscopía confocal muestra que el anticuerpo $Ca_v3.3$ reconoce la pieza principal del flagelo. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:8) correspondiente. Al preincubar el anticuerpo con un péptido distinto al antigénico la señal no se elimina, péptido para (F) $Ca_v3.2$ (1:8) y (H) péptido para TRPC3 (1:8), lo que indica que la tinción es específica ya que únicamente se eliminó la señal al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (n = 3).

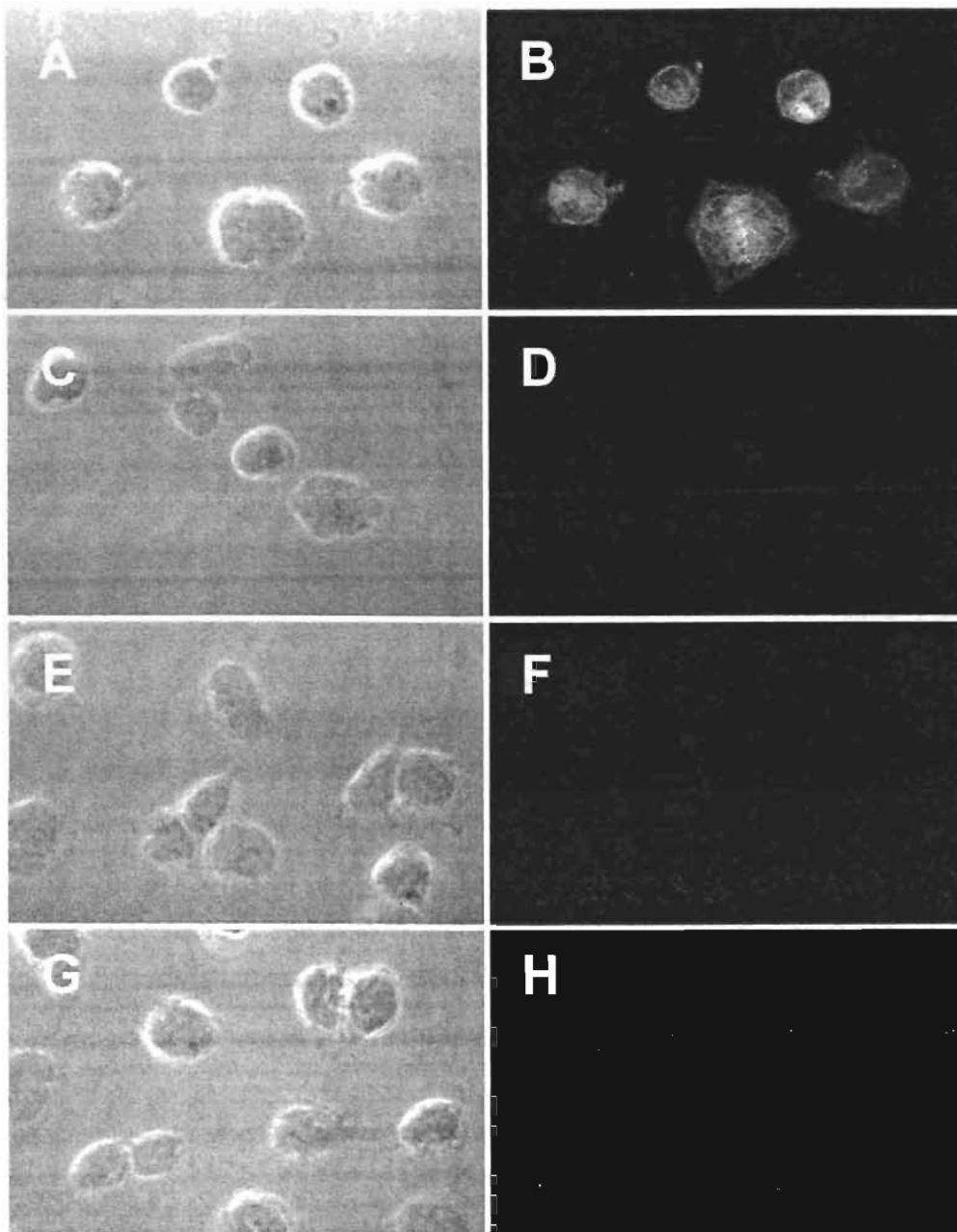


Figura 15. Inmunolocalización de $Ca_v3.1$ en las células HEK-293 que expresan heterológamente $Ca_v3.1$. (A, C, E, y G) Imágenes de las células HEK-293 en contraste de fases. (B) Imagen de inmunofluorescencia confocal de las células HEK-293 teñidas con el anticuerpo anti- $Ca_v3.1$. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:5) correspondiente. (F) Células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario. (H) Autofluorescencia ($n = 3$).

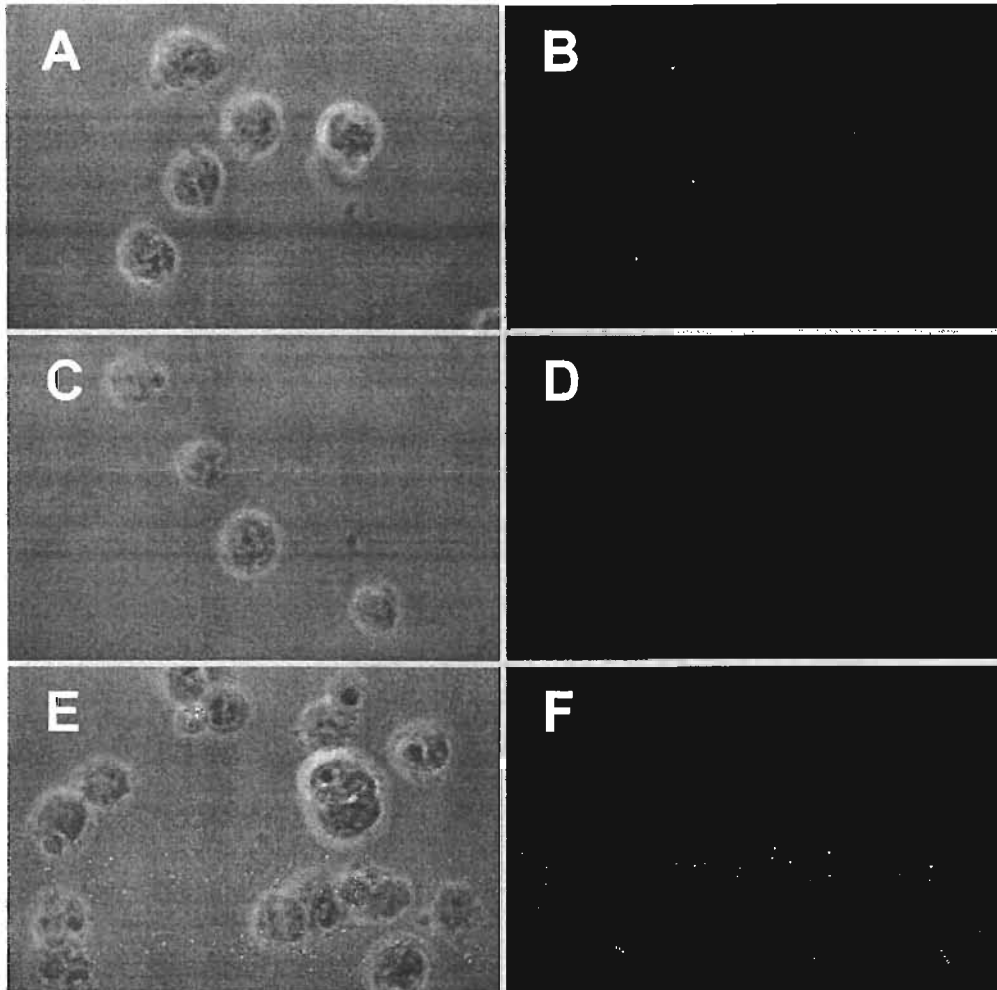


Figura 16. Inmunolocalización de $Ca_v3.1$ en las células HEK-293 que expresan heterológamente $Ca_v3.2$. (A, C y E) Imágenes de las células HEK – 293 en contraste de fases. (B) La imagen de inmunofluorescencia confocal de las células HEK-293 no muestra tinción con el anticuerpo anti- $Ca_v3.1$. (D) Células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario. (F) Autofluorescencia (n = 3).

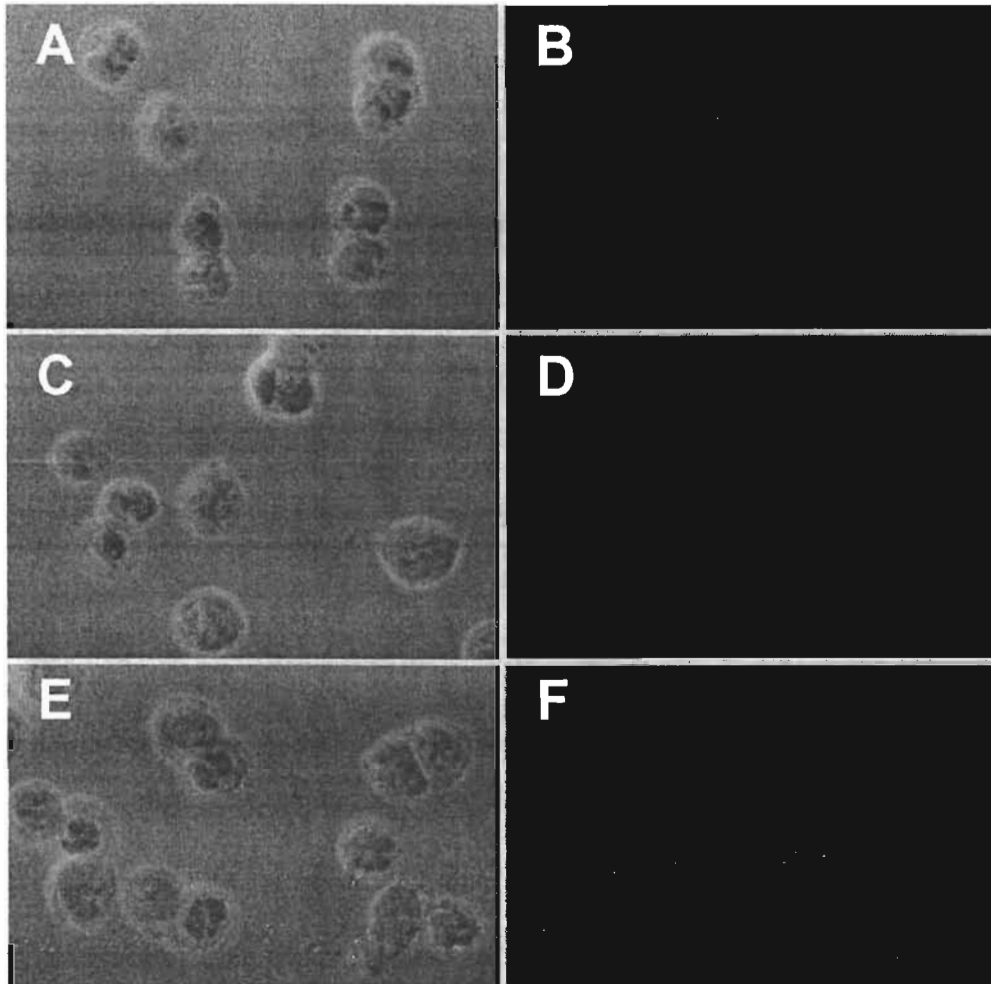


Figura 17. Inmunolocalización de $Ca_v3.1$ en las células HEK-293 que expresan heterológamente $Ca_v3.3$. (A, C y E) Imágenes de las células HEK-293 en contraste de fases. (B) La imagen de inmunofluorescencia confocal de las células HEK-293 no muestra tinción con el anticuerpo anti- $Ca_v3.1$. (D) Células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario. (F) Autofluorescencia (n = 3).

B) Inmunolocalización de canales tipo TRPC

Al inicio de este trabajo se sabía que en células espermatogénicas de ratón se expresan los 7 genes *trpc* y en el espermatozoide maduro se identificaron en el flagelo las proteínas TRPC1, TRPC3 y TRPC6 (Trevino et al., 2001). En otros estudios llevados a cabo en el laboratorio empleando espermatozoides de humano se encontraron los mensajeros para TRPC1, TRPC3, TRPC6 y TRPC7. Para investigar la expresión a nivel de proteína de los TRPC en espermatozoide de humano, utilizamos anticuerpos contra TRPC1, 3, 4, 5 y 6. Datos previos del laboratorio indican que TRPC1 se localiza en la pieza principal del flagelo y algunos espermatozoides muestran señal en la región ecuatorial de la cabeza. Además, se encontró que TRPC3 tiñe la región del acrosoma, la pieza media y principal del flagelo y TRPC4 se localiza en la pieza principal del flagelo y también da una señal difusa en la cabeza (Castellano et al., 2003). El canal TRPC5 se localiza en la cabeza, en la pieza media y en la principal del flagelo (Fig. 18B). Los espermatozoides teñidos con TRPC6 muestran una fuerte tinción en la pieza media, y un patrón punteado en la pieza principal y una señal difusa en la cabeza (Fig. 19B). Los experimentos control usando anticuerpos bloqueados por la exposición previa al péptido antigénico no mostraron fluorescencia residual, indicando la especificidad de la señal (Figura 18D y 19D). Para el caso del TRPC2 y TRPC7 no se hicieron las inmunolocalizaciones, ya que no existen los anticuerpos comerciales. La localización de los canales TRPC se confirmó por microscopía electrónica de transmisión (experimentos realizados con la colaboración del Dr. Víctor Tsutsumi, CINVESTAV, México). Al igual que por microscopía confocal, TRPC1, 3 y 4 se detectaron tanto en la cabeza como en el flagelo. En el caso del TRPC6, la señal no se compitió con su péptido antigénico.

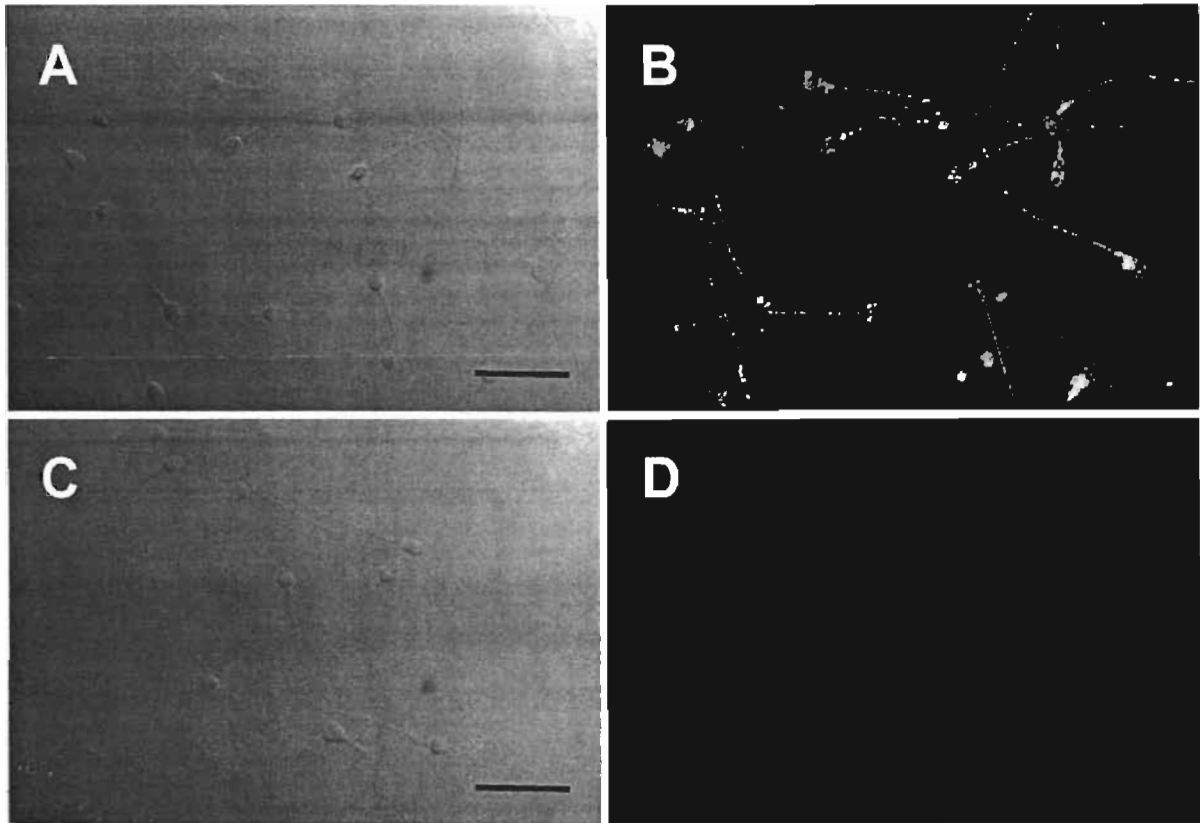


Figura 18. Inmunolocalización del canal TRPC5 en los espermatozoides de humano. (A y C) Imágenes de los espermatozoides en contraste de fases. (B) La imagen de microscopía confocal muestra una tinción en la cabeza, en la pieza media y en la principal del flagelo. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:4) correspondiente, lo que indica que la señal es específica (n = 5). Barra de escala = 20 μ m

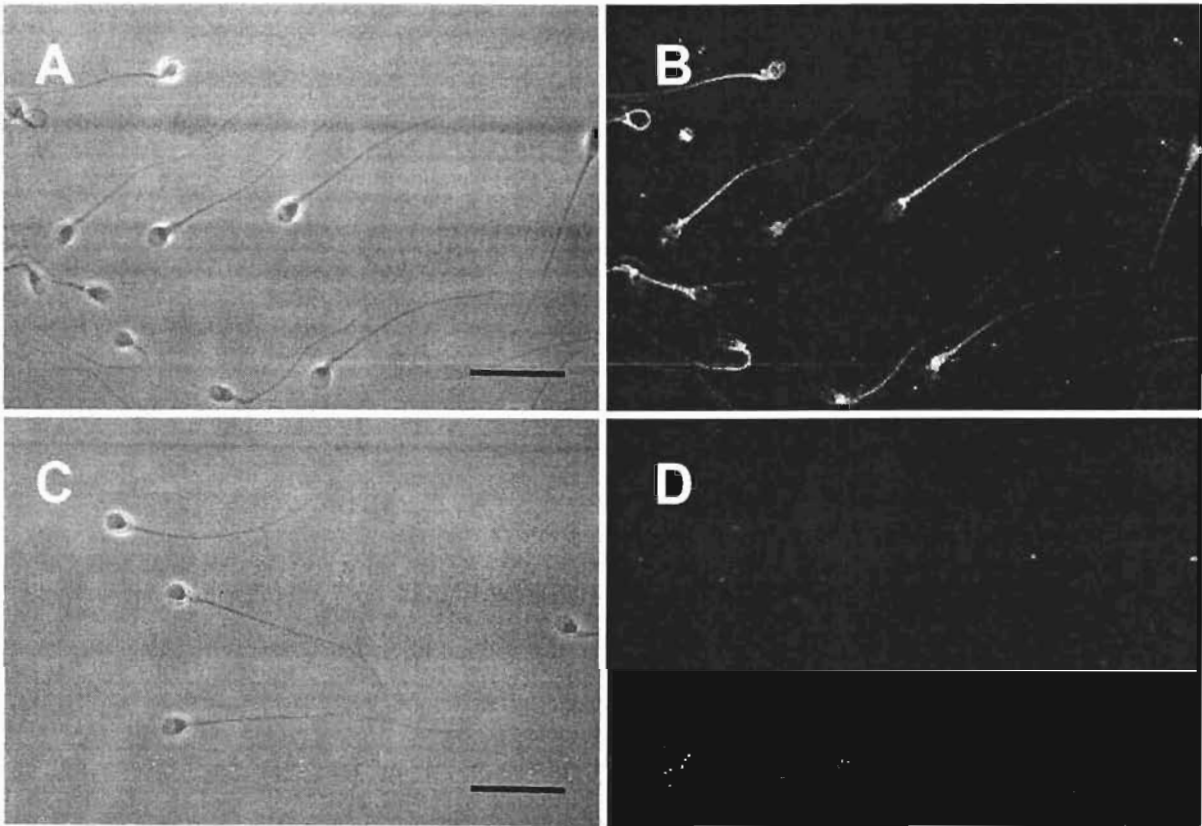


Figura 19. Inmunolocalización del canal TRPC6 en los espermatozoides de humano. (A y C) Imágenes de los espermatozoides en contraste de fases. (B) La imagen de microscopía confocal muestra una tinción en la cabeza y en la pieza media y principal del flagelo. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:8) correspondiente, lo que indica que la señal es específica (n = 5). Barra de escala = 20 μ m

Tabla 3. Resumen de la inmunolocalización de los canales Cav

TIPO DE CANAL	LOCALIZACIÓN
Cav1.1	No determinada
Cav1.2	Pieza media, terminal y principal
Cav1.3	Señal no específica
Cav1.4	No determinada
Cav2.1	Señal no específica
Cav2.2	Señal no específica
Cav2.3	Acrosoma y pieza principal
Cav3.1	Cabeza, pieza media y principal
Cav3.2	Cabeza (Por ME), pieza media y principal
Cav3.3	Pieza media y cabeza (Por ME)

ME= Microscopía Electrónica

Tabla 4. Resumen de la inmunolocalización de los canales tipo TRPC

TIPO DE CANAL	LOCALIZACIÓN
TRPC1	Cabeza y pieza principal
TRPC2	En un humano es un pseudogen
TRPC3	Pieza media y principal y región acrosomal
TRPC4	Pieza media y principal y cabeza
TRPC5	Cabeza, pieza media y principal
TRPC6	Cabeza, pieza media y principal
TRPC7	No determinada

III.3 RESULTADOS DE MOVILIDAD

A) Participación del Ca^{2+} externo en la movilidad del espermatozoide de humano

El hecho de que varias subunidades de los canales Ca_v y los canales tipo TRPCs se encuentran en el flagelo sugiere su posible participación en la movilidad del espermatozoide de humano. Esto se exploró mediante estudios farmacológicos, utilizando bloqueadores específicos para los canales identificados.

Existe evidencia que muestra que el Ca^{2+} externo es necesario en la movilidad basal del espermatozoide de humano y de hámster (Gorus et al., 1982; Serres et al., 1991; Ahmad et al., 1995; Si y Okuno, 1999). Sin embargo, Luconi y Baldi, observaron que la movilidad basal del espermatozoide no se ve afectada en un medio sin Ca^{2+} en presencia de EGTA (0.3 – 3 mM) (Luconi y Baldi, 2003). Por tal motivo, se decidió estudiar el efecto del Ca^{2+} externo sobre la movilidad basal de los espermatozoides de humano. Una vez que los espermatozoides móviles se separaron mediante la técnica del “swim up”, una parte se lavó con el medio BWW que contenía 1.7 mM de Ca^{2+} y otra con BWW sin Ca^{2+} en presencia de 0.5 mM de EGTA y la movilidad se analizó en el sistema CASA. El porcentaje de espermatozoides móviles recuperados después del “swim up” oscila entre el 90-95 %. Los resultados obtenidos muestran que el patrón de movimiento de los espermatozoides cambia en ausencia de Ca^{2+} , disminuye el porcentaje de espermatozoides móviles en un 40% (normalizado con respecto al control) y altera los parámetros de la movilidad. Mientras que VCL, VSL, VAP y ALH disminuyen (Fig. 20), LIN, STR y BCF aumentan (no mostrado). Esto indica que el espermatozoide tiene un movimiento progresivo. Además, nos indica que el Ca^{2+} externo sí participa en la regulación de la movilidad.

La eliminación total del Ca^{2+} que se obtiene en los experimentos en presencia de EGTA, no mimetiza el efecto que se puede tener al añadir los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} , por esta razón se decidió incubar a los espermatozoides en el medio BWW con 1/10 (0.17 mM) de la concentración de Ca^{2+} del medio normal (1.7 mM). En estas condiciones no se observó ningún efecto sobre la movilidad del espermatozoide de humano. Recientemente se ha reportado que $\sim 0.22 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} externo es suficiente para inducir la movilidad hiperactivada (Marin-Briggiler et al., 2003) y es aproximadamente la misma concentración de Ca^{2+} que usamos para ver el efecto del Ca^{2+} externo sobre la movilidad. Sería importante estudiar el efecto de concentraciones más bajas de Ca^{2+} externo sobre la movilidad activada para determinar cual es la concentración mínima de Ca^{2+} necesaria para mantener la movilidad en el espermatozoide de humano. Y en estas condiciones repetir las aproximaciones realizadas en el presente estudio.

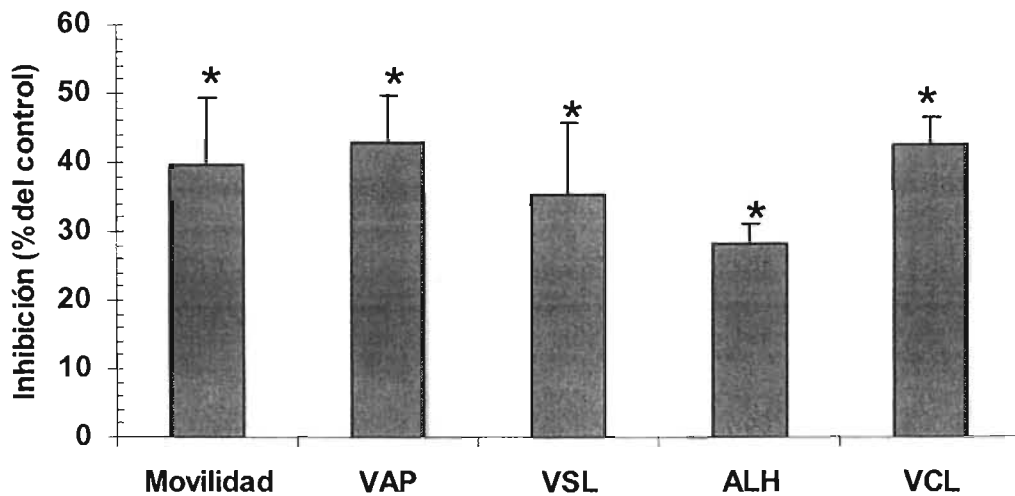


Figura 20. La remoción del Ca^{2+} externo disminuye la movilidad activa y algunos de los parámetros de la movilidad en el espermatozoide de humano. Los espermatozoides se incubaron a 37°C en presencia de 0.5 mM de EGTA, las barras representan el porcentaje de inhibición (promedio \pm error estandar, EE). La movilidad se inhibe en un 40% y también hay inhibición de la VAP, VSL, VCL y ALH ($n = 4$). El porcentaje de inhibición es estadísticamente significativo ($*P < 0.05$).

B) Participación de los canales Ca_v en la movilidad activada del espermatozoide

El efecto del Ca^{2+} externo observado sobre la movilidad de los espermatozoides de humano y la presencia de canales de Ca_v tanto HVA como LVA, sugiere la participación de estos canales en la movilidad. Para probar esta posibilidad se determinó el efecto de bloqueadores para ambos tipos de canales: mibefradil y ZD7288 para LVA, rifedipina y calciseptina para HVA, sobre la movilidad de los espermatozoides. Estos estudios se llevaron a cabo en el medio Ham's F-10, el cual tiene una concentración de 0.3 mM de Ca^{2+} . El mibefradil es un bloqueador que permite diferenciar a los canales LVA de los HVA, ya que inhibe a los primeros a concentraciones bajas ($\sim 5 \mu\text{M}$) y a los segundos a mayores concentraciones ($\sim 30 \mu\text{M}$) (Clozel et al., 1997). Rangos de concentraciones de mibefradil de $5 \mu\text{M}$ no tiene efecto sobre la movilidad activada (Fig. 21A), estas observaciones nos sugieren que los canales Ca_v3 no influyen sobre la movilidad basal del espermatozoide de humano. Sin embargo, mayores concentraciones de mibefradil ($30 \mu\text{M}$) disminuyen el porcentaje de espermatozoides móviles y algunos parámetros de la movilidad como VAP, VCL y VSL (Tabla 5 y Fig. 21B), los valores de las tres velocidades disminuyen, indicando que el espermatozoide tiene un movimiento progresivo y sugiere la participación de los canales HVA en la regulación de la movilidad.

TABLA 5

PARÁMETROS	Mibefradil $30 \mu\text{M}$ (% Inhibición)
Movilidad	
Activada	25 ± 8
VAP	33 ± 9
VSL	31 ± 10
VCL	31 ± 5

La nifedipina pertenece a la familia de las DHPs, las cuales selectivamente bloquean las corrientes tipo L (1 - 10 μM). Sin embargo, utilizamos concentraciones en un rango de 1 a 20 μM y no observamos ningún efecto sobre la movilidad activada del espermatozoide de humano ni sobre otros parámetros de la movilidad (Fig. 22A). La calciseptina es un péptido aislado del veneno de la serpiente mamba negra que bloquea también los canales tipo L (100 nM – 2 μM) (de Weille et al., 1991). Este bloqueador (500 nM – 5 μM) tampoco tuvo un efecto drástico sobre la movilidad (Fig. 22B).

C) Participación de los canales tipo TRPC en la movilidad activada del espermatozoide

Los estudios de inmunolocalización muestran que los canales TRPC se localizan principalmente en el flagelo, lo que sugiere que estos canales podrían participar en la regulación del movimiento flagelar. Por lo que probamos el efecto de inhibidores de este tipo de canales sobre la movilidad activada. El Ni^{2+} inhibe la movilidad de manera dependiente de la concentración (Fig. 23). Después de 1 min. de incubación con 0.3 mM y con 1 mM de Ni^{2+} hay ~15% y 20 % de inhibición, respectivamente. Debido a que solo se observó un efecto en la movilidad a altas concentraciones de Ni^{2+} , se puede asociar este efecto a través de canales tipo SOC y no a canales tipo T que son más sensibles a Ni^{2+} . Otra posibilidad, es que a altas concentraciones de Ni^{2+} , el efecto inhibitorio se deba al bloqueo de la contribución tanto de los canales Cav, como de los canales tipo TRPC y/o SOCs.

El SKF96365 se ha utilizado como un bloqueador de canales tipo TRPC y/o SOC. Nosotros usamos diferentes concentraciones (5, 10, 15 y 20 μM) de este compuesto y encontramos que disminuye la movilidad de manera dependiente de la concentración (Fig. 24A). Veinte μM de SKF96365 inhibe ~30% de la movilidad y disminuye los siguientes

parámetros: VAP, VCL, VSL, BCF (el movimiento del espermatozoide es progresivo) (Fig. 24B). La IC_{50} estimada para el SKF96365 fue de 7 μM (Castellano et al., 2003), la cual es compatible con la reportada para bloquear los TRPC recombinantes (IC_{50} 5-8 μM) (Zhu et al., 1998). Debido a que el porcentaje de inhibición de la movilidad no fue muy alto, se podría pensar que este tipo de canales influyen en la concentración de Ca^{2+} intracelular basal y de manera indirecta regulan la movilidad o los canales tipo TRPC son una de las entidades que regulan la entrada de Ca^{2+} necesario para la movilidad de los espermatozoides. Otros bloqueadores para canales tipo SOCs o TRPCs como el Gadolinio y el 2-APB (Fig. 25A y B, respectivamente), no tuvieron ninguna repercusión sobre la movilidad. Quizá estos bloqueadores tengan un efecto diferencial entre los canales TRPC que codifican para SOCs y los que presentan otro mecanismo de apertura, lo cual hasta la fecha no se ha establecido. Por ejemplo se reportó que concentraciones del orden micromolar de Gd^{3+} aumentan las corrientes mediadas por TRPC4 y TRPC5, mientras que concentraciones del orden milimolar las inhibe (Jung et al., 2003). Además, TRPC3 de humano expresado heterológicamente es insensible a lantánidos (La^{3+} y Gd^{3+}) (Trebak et al., 2002) y el lantano puede inhibir a algunos TRPC y activar a otros como el TRPC4 y TRPC5 (Jung et al., 2003).

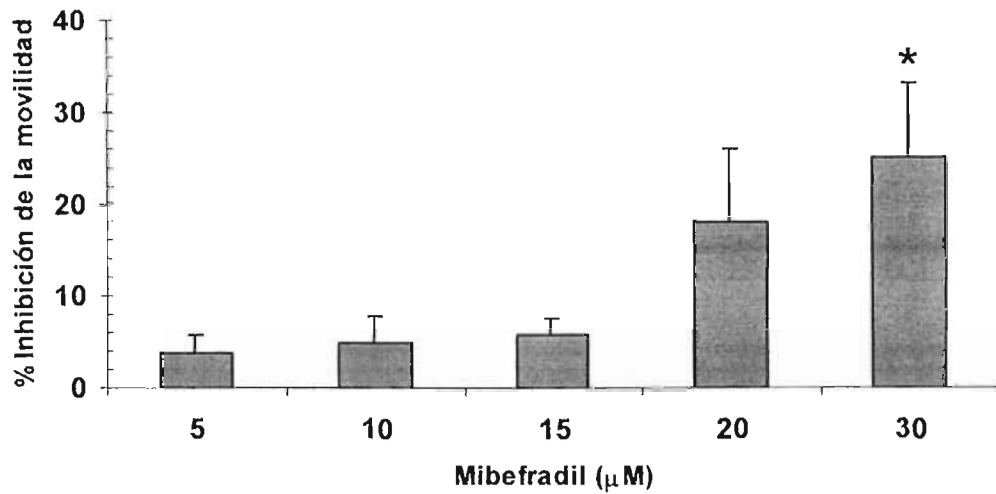
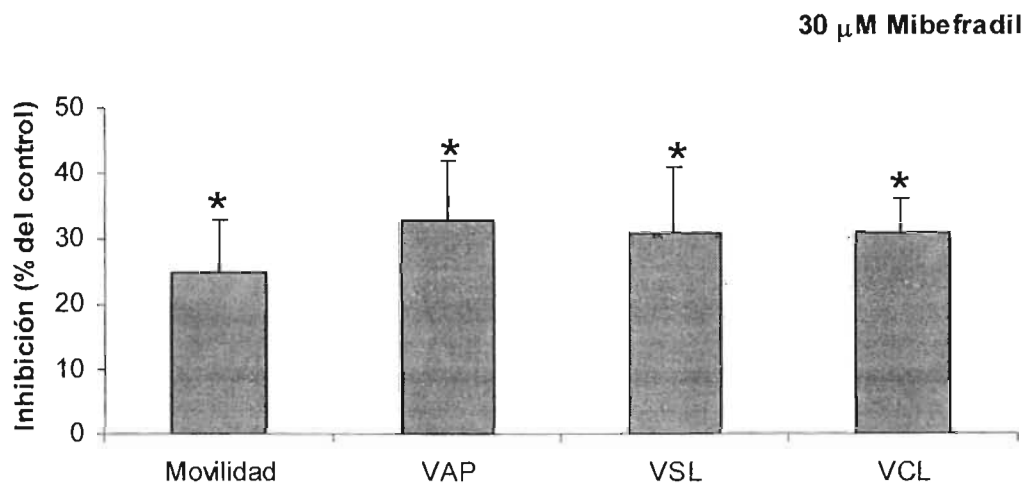
A**B**

Figura 21. El mibefradil inhibe la movilidad activa y algunos de sus parámetros en el espermatozoide de humano. (A) Los espermatozoides se incubaron a 37°C durante 10 minutos en presencia de diferentes concentraciones de mibefradil. Los datos representa el porcentaje de inhibición (promedio \pm EE). (B) A 30 μM el mibefradil inhibe la movilidad en un 25% y la VCL, VSL y VAP (n = 8). A esta concentración la inhibición es estadísticamente significativa (*P < 0.05).

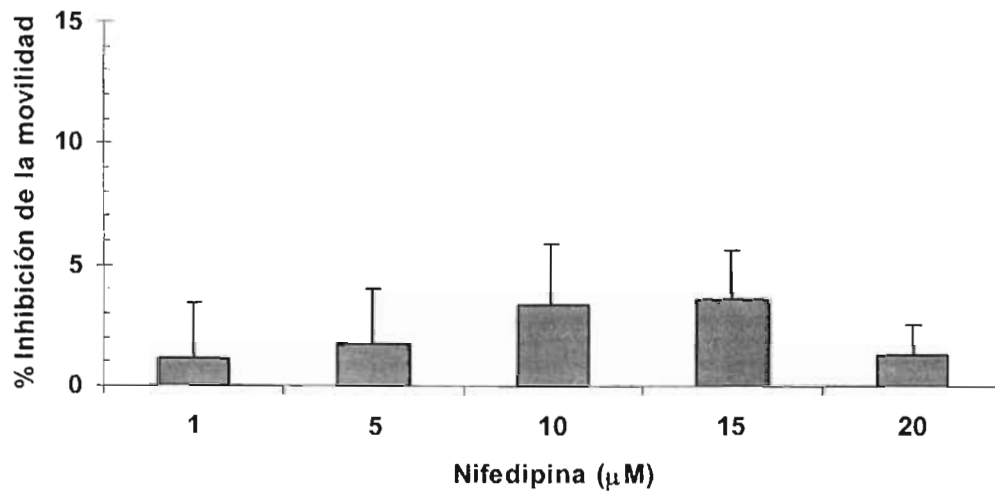
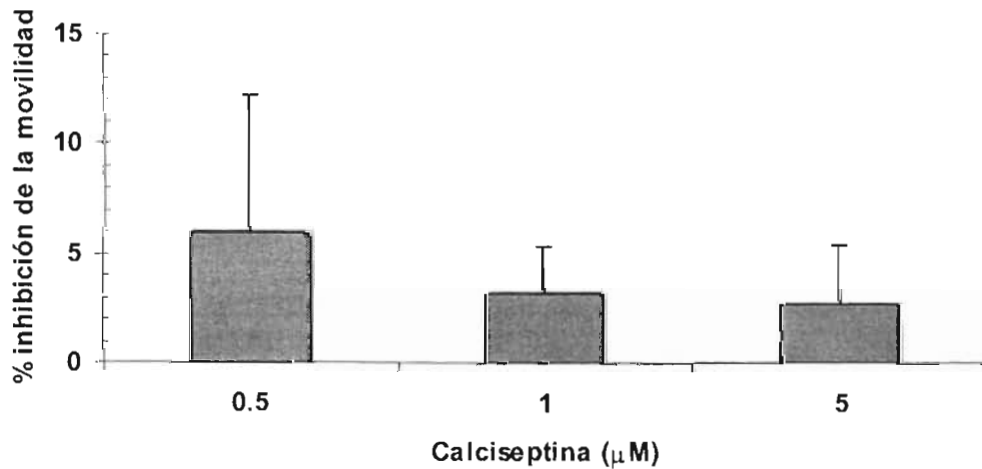
A**B**

Figura 22. La nifedipina y la calciseptina no inhiben la movilidad activada del espermatozoide de humano. Los espermatozoides se incubaron a 37°C durante 10 minutos en presencia de diferentes concentraciones de nifedipina (A) y calciseptina (B). Los dos antagonistas no tienen ningún efecto sobre la movilidad ($n = 4$). Los datos representa el porcentaje de inhibición (promedio \pm EE).

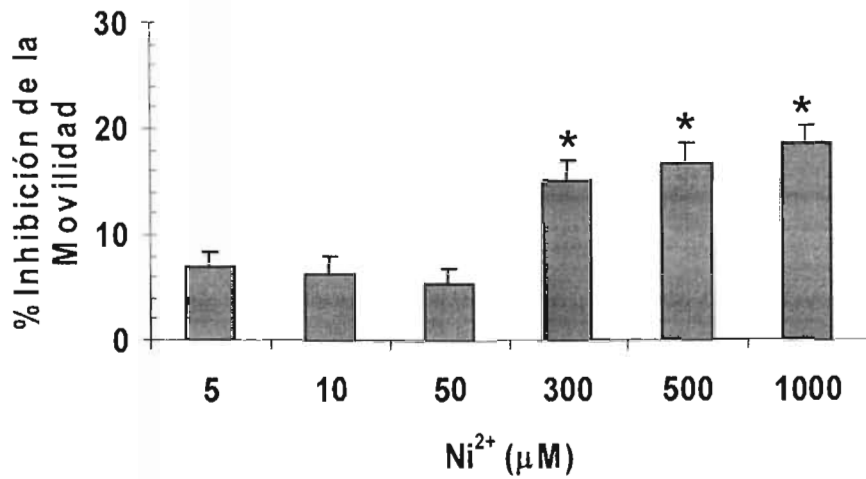
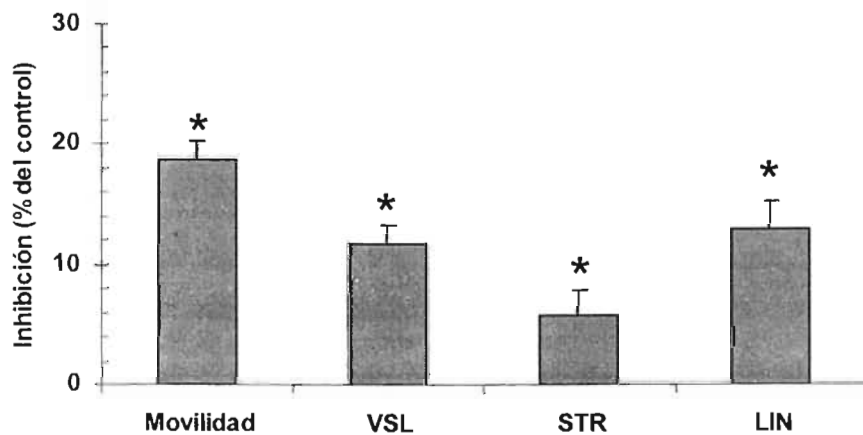
A1 mM Ni²⁺**B**

Figura 23. El Ni²⁺ inhibe parcialmente la movilidad activada de manera dosis dependiente del espermatozoide de humano. Los espermatozoides se incubaron a 37°C en presencia de diferentes concentraciones de Ni²⁺. (A) El Ni²⁺ inhibe la movilidad y (B) algunos parámetros de la movilidad (n = 10). Los datos representa el porcentaje de inhibición (promedio ± EE). A partir de 0.3 mM el porcentaje de inhibición es estadísticamente significativo (*P < 0.05).

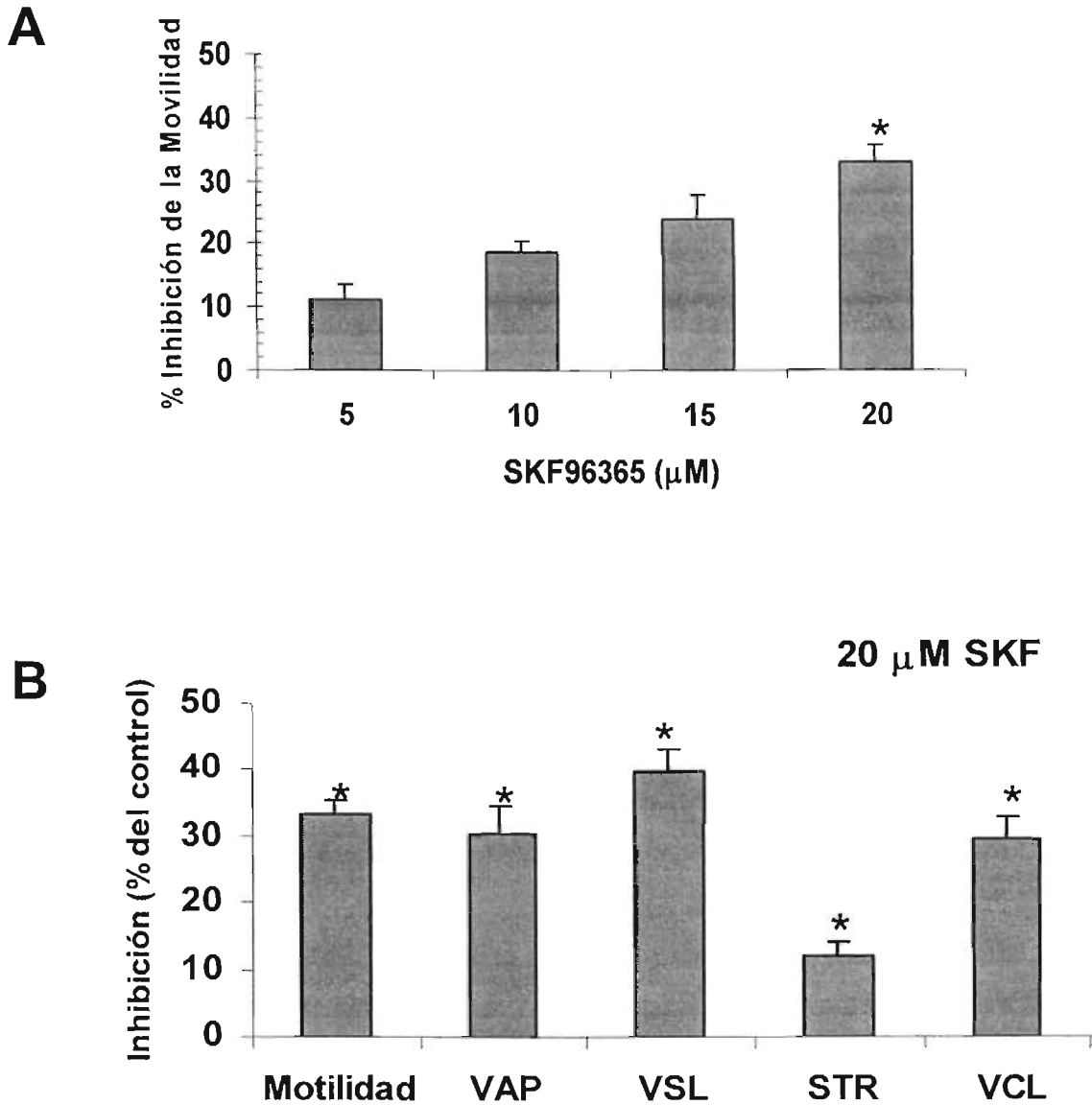


Figura 24. El SKF96365 inhibe parcialmente la movilidad activada de manera dosis-dependiente del espermatozoide de humano. Los espermatozoides móviles se incubaron a 37°C durante 10 minutos en presencia de diferentes concentraciones de SKF96365. (A) El SKF inhibe la movilidad y (B) algunos parámetros de la movilidad (n = 7). Los datos representa el porcentaje de inhibición (promedio ± EE). A 20 μM de SKF el porcentaje de inhibición es estadísticamente significativo (*P < 0.05).

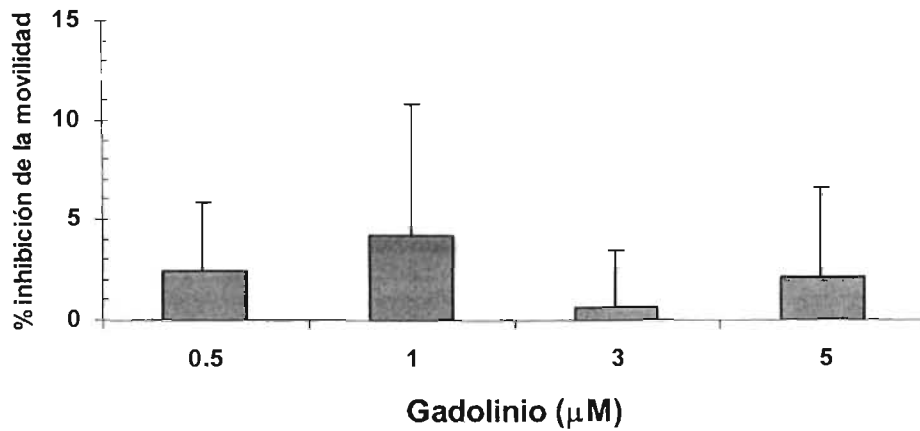
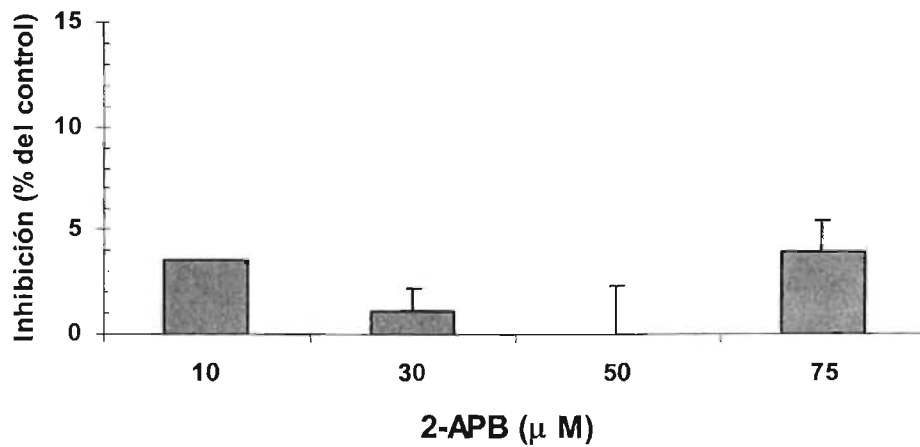
A**B**

Figura 25. Dos antagonistas de los canales tipo SOC no inhiben la movilidad activada del espermatozoide de humano. Los espermatozoides se incubaron a 37°C en presencia de diferentes concentraciones (A) Gadolinio y (B) 2-APB (n = 3). Los datos representa el porcentaje de inhibición (promedio \pm EE).

D) Participación de los canales Ca_v y tipo TRPC en la movilidad hiperactivada del espermatozoide

Recientemente Carlson y cols. propusieron que CatSper1 podría funcionar como un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje que controla la entrada de Ca^{2+} en espermatozoides hiperactivados de ratón (Carlson et al., 2003). De acuerdo con estos antecedentes y con nuestros resultados se podría pensar que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo HVA y LVA posiblemente tengan un papel importante en la regulación de la movilidad hiperactivada. Trabajos pioneros reportaron que los espermatozoides de humano no presentaban hiperactivación (Yanagimachi, 1981), mas tarde bajo condiciones de capacitación dos grupos independientemente observaron dos subpoblaciones (Burkman, 1984). En humano el porcentaje de espermatozoides que se hiperactiva es relativamente bajo (20%) comparado con otras especies (80%). Aunque la hiperactivación es un cambio funcional que ocurre durante la capacitación, las vías de señalización de estos dos eventos no están acopladas completamente. Para que un espermatozoide se le considere como hiperactivado debe cumplir con las siguientes características: $VCL \pm 150 \mu\text{m/s}$, $LIN \leq 50\%$ Y $ALH \pm 7.0 \mu\text{m}$ (Mortimer, 2000). Probamos el efecto farmacológico de varios inhibidores de canales de Ca^{2+} . Ni los inhibidores de los canales Ca_v (mibefradil (5 – 40 μM), nifedipina (1 – 30 μM) y nimodipina (2 - 30 μM) (Fig. 26A, B y C respectivamente)) ni los inhibidores de los canales tipo TRPC (SKF96365 (5 – 20 μM) y 2-APB (10 – 75 μM) (Fig. 27)), tuvieron efecto sobre la movilidad hiperactivada del espermatozoide. En condiciones control, el porcentaje de hiperactivación varió entre 10-20%. Estos resultados indican que los canales Ca_v y los TRPC tampoco están participando de manera notable en la movilidad hiperactivada.

Dado que la hiperactivación es un evento que se lleva a cabo durante la capacitación, probamos el efecto de algunos de los bloqueadores (SKF y 2-APB) (Fig. 28) y Ni^{2+} (datos no mostrados) durante el periodo de capacitación. En esta condición tampoco observamos efecto notable de los bloqueadores en el proceso de la hiperactivación, ya que los espermatozoides se hiperactivan igual que el control.

Para determinar si los canales tipo TRPC tenían algún efecto en la movilidad hiperactivada del espermatozoide de humano se probaron dos antagonistas de este tipo de canales (SKF96365 y 2-APB) a las concentraciones que se usaron para la movilidad activada. Con estos compuestos se incubaron a los espermatozoides tanto durante el período de la capacitación como después del período de capacitación (6 h). Nuestras observaciones indican que en ambas condiciones estos inhibidores no afectan de manera significativa la hiperactivación del espermatozoide de humano (Fig. 27 y 28). También se probó diferentes concentraciones de Ni^{2+} durante el período de la capacitación (datos no mostrados) y tampoco se observó un efecto notable sobre la hiperactivación.

Es probable que la función de los canales Ca_v sea inducir la movilidad en espermatozoides inmaduros como en el caso de la defensina o que su participación sea muy sutil y se refleje en alguno de los parámetros de movilidad. Para ello se puede hacer un análisis más detallado de la curvatura del flagelo (amplitud de la curvatura y diámetro de la curvatura) y lo cual no puede ser medido con el equipo Hobson, para ello se requiere de un sistema de análisis especializado.

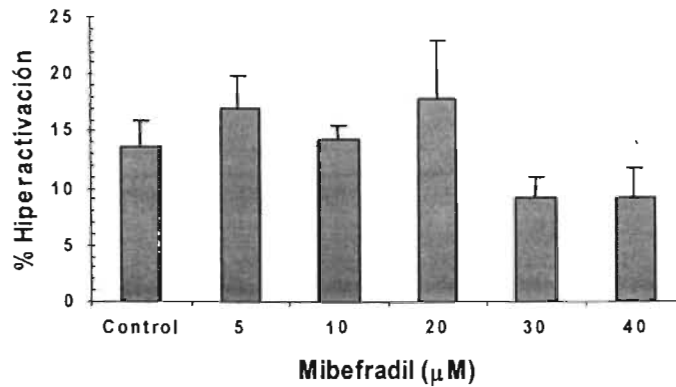
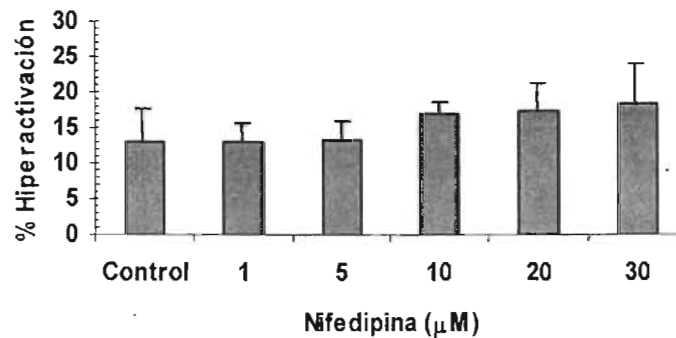
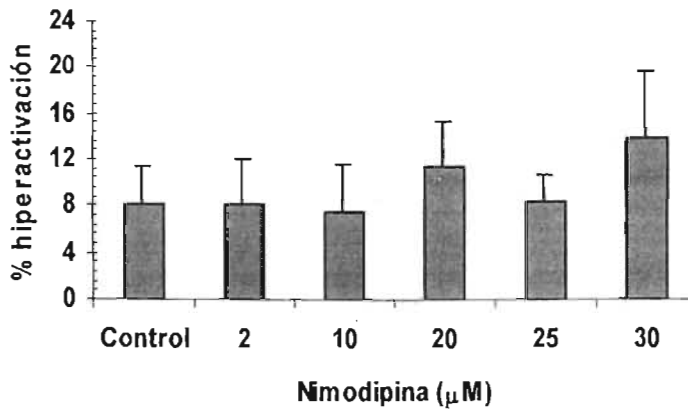
A**B****C**

Figura 26. Tres antagonistas de los canales Ca_v no inhiben la hiperactivación de los espermatozoide de humano. Los espermatozoides después de capacitados (6 h) se incubaron durante 10 minutos en presencia de diferentes concentraciones de (A) Mibefradil, (B) Nifedipina y (C) Nimodipina ($n = 3$). Los datos representan el porcentaje de hiperactivación (promedio \pm EE). Las diferencias no son estadísticamente significativas.

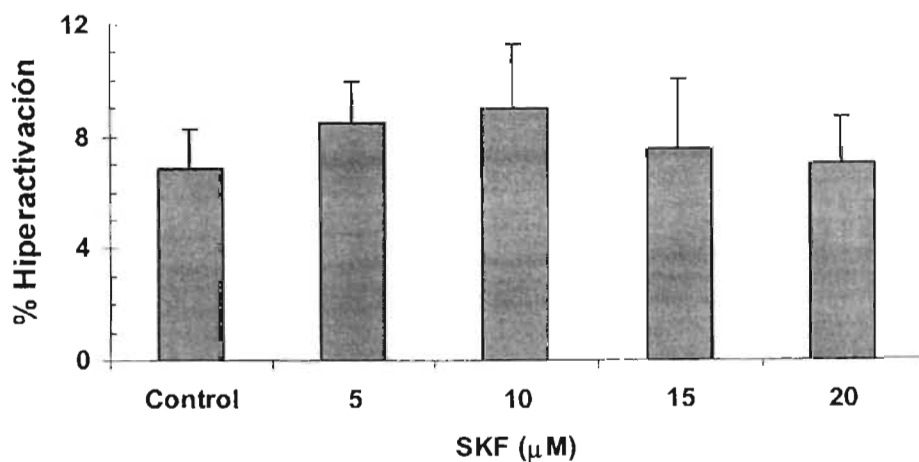
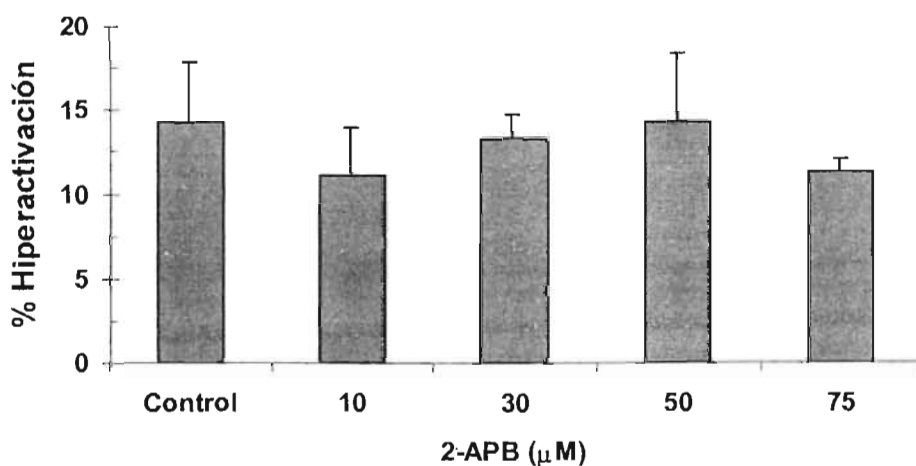
A**B**

Figura 27. Dos antagonistas de los canales tipo SOC (SKF96365 y 2-APB) no inhiben la hiperactivación de los espermatozoide de humano. Los espermatozoides después de capacitados (6 h) se incubaron durante 10 minutos en presencia de diferentes concentraciones de (A) SKF96365 y (B) 2-APB ($n = 3$). Los datos representan el porcentaje de hiperactivación (promedio \pm EE). Las diferencias no son estadísticamente significativas.

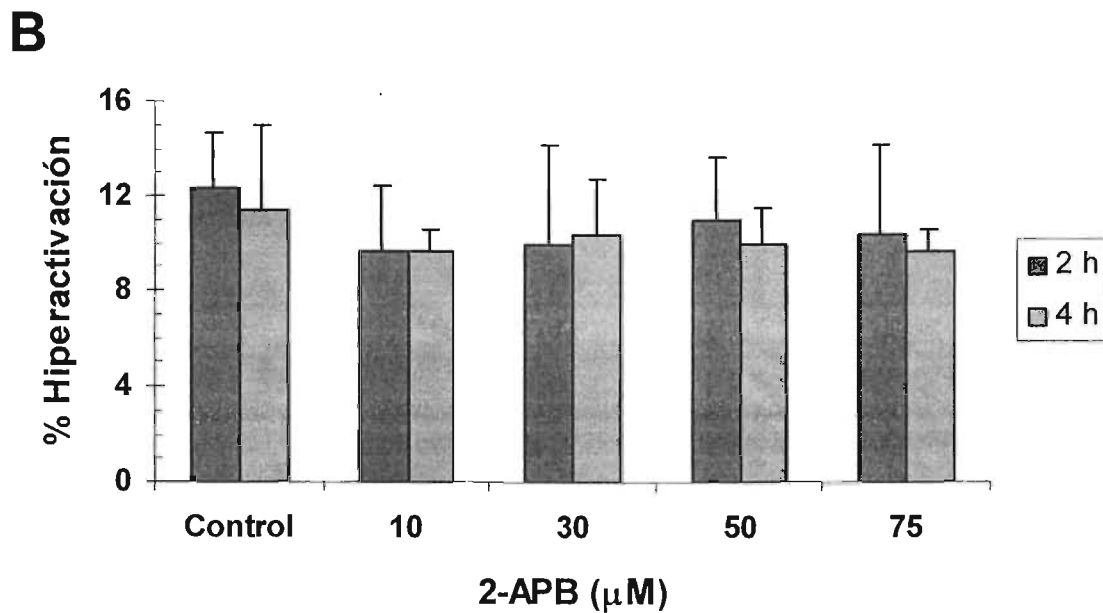
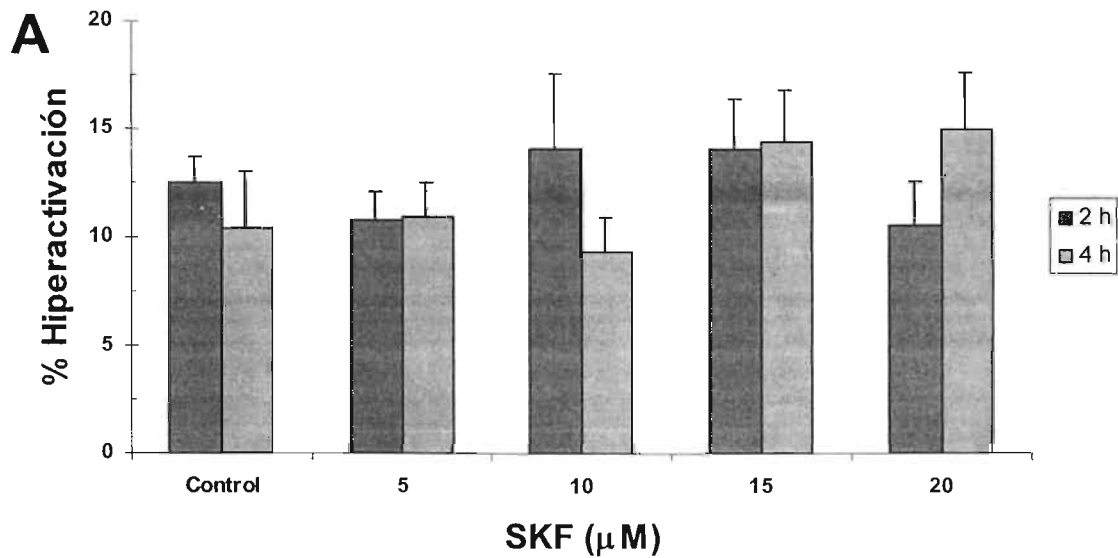


Figura 28. Dos antagonistas de los canales tipo SOC (SKF y 2-APB) no inhiben la movilidad hiperactivada del espermatozoide de humano durante el tiempo de la capacitación. Los espermatozoides se incubaron durante el tiempo de la capacitación con diferentes concentraciones de (A) SKF y (B) 2-APB (n = 6). Los datos representan el porcentaje de hiperactivación (promedio \pm EE). Las diferencias no son estadísticamente significativas.

D) Efecto del ZD7288 sobre la movilidad del espermatozoide

En estudios realizados en el laboratorio se encontró que el ZD7288, un bloqueador de los canales activados por hiperpolarización y por nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), también bloquea a las corrientes de Ca^{2+} tipo T en células espermatogénicas de ratón con una IC_{50} ~100 μM , y a las expresadas heterológicamente en células HEK-293, pero no afecta las corrientes tipo N (Felix et al., 2003). Por lo tanto, decidimos probar su efecto sobre la movilidad del espermatozoide. Sorprendentemente este bloqueador cambia el patrón de movimiento del espermatozoide de humano, hiperactivando los espermatozoides tanto capacitados como no capacitados. El porcentaje de hiperactivación es dependiente de la concentración, observándose hasta un 60% de espermatozoides hiperactivados a una concentración de 500 μM en condiciones de capacitación y de no-capacitación (Fig. 29A). Este compuesto no afecta el porcentaje de movilidad pero sí sus parámetros, VCL y ALH aumentan (Fig. 29B y 30A) y LIN disminuye (Fig. 30B). Como se mencionó anteriormente, la definición cinemática para la movilidad hiperactivada es $\text{VCL} \pm 150 \mu\text{M}$, $\text{LIN} \leq 50\%$ y $\text{ALH} \pm 7.0 \mu\text{M}$. Durante la hiperactivación de los espermatozoides de hámster, la concentración de Ca^{2+} citoplásmico es mayor que cuando están activados. En este sentido sería importante determinar si este compuesto podría facilitar la entrada de Ca^{2+} al citoplasma del espermatozoide promoviendo la hiperactivación. Datos no publicados indican que se requiere de Ca^{2+} externo para que el ZD7288 induzca hiperactivación en el espermatozoide de humano, lo que sugiere que este compuesto podría activar la entrada de Ca^{2+} (efecto contrario a lo esperado, ya que en general opera como un bloqueador de canales y no como activador), lo cual induciría la hiperactivación del espermatozoide. Otra posibilidad, es que el ZD7288 actuará bloqueando las bombas que permiten la salida de Ca^{2+} (Ca^{2+} -ATPasa) del citoplasma al exterior de la célula o que

esté bloqueando al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, y esto ocasioné que haya un aumento del Ca^{2+} intracelular y como consecuencia la hiperactivación del espermatozoide.

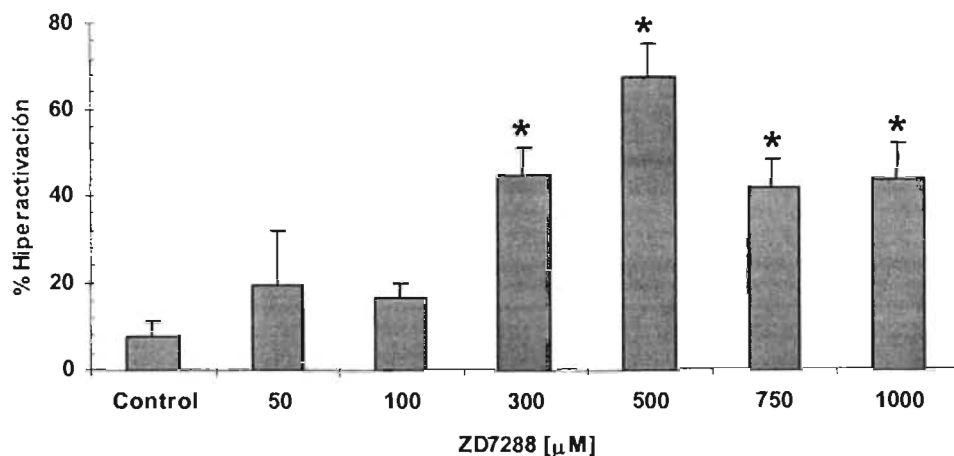
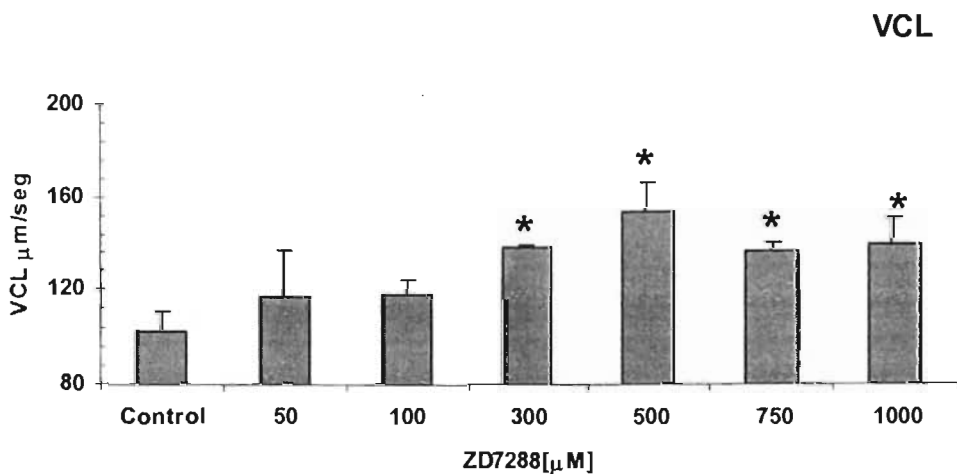
A**B**

Figura 29. El ZD7288 hiperactiva a los espermatozoides de humano. Los espermatozoides se incubaron durante 15 min. en presencia de diferentes concentraciones de ZD7288 (n = 5). Los espermatozoides se hiperactivan de manera dosis-dependiente (A) y la velocidad promedio VCL aumenta (B). Los datos representan el porcentaje de aumento de la hiperactivación y de la VCL (promedio \pm EE). El aumento de la hiperactivación y de la VCL son estadísticamente significativos (*P < 0.05).

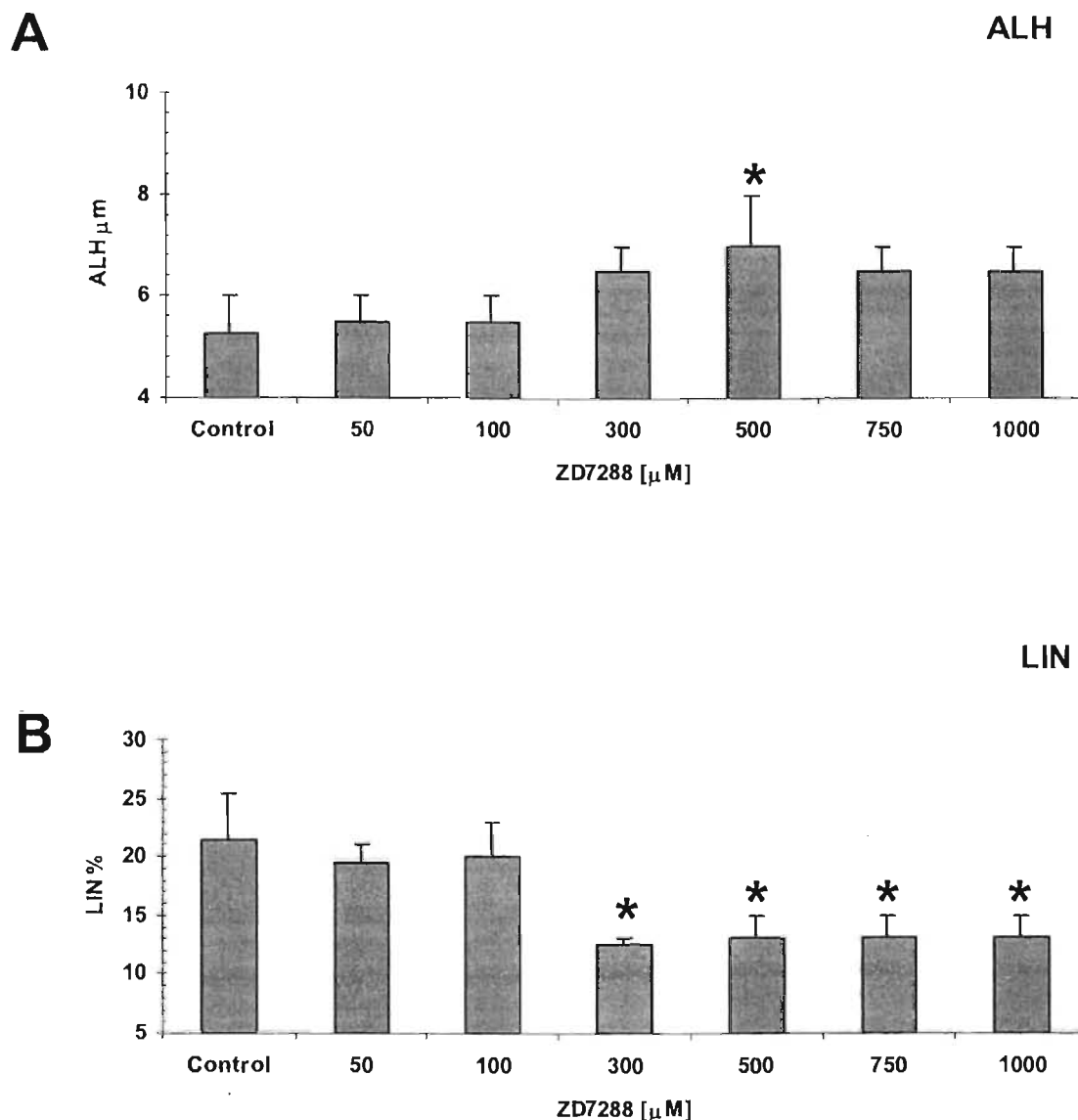


Figura 30. El ZD7288 hiperactiva a los espermatozoides de humano y cambia algunos de sus parámetros. Los espermatozoides se incubaron durante 15 min. en presencia de diferentes concentraciones de ZD7288 (n = 5). El desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) aumenta (A) y la linealidad (LIN) disminuye (B). (promedio \pm EE). El aumento de ALH y la disminución de la LIN son estadísticamente significativos (* $P < 0.05$).

IV. DISCUSIÓN

Existen estudios que indican la importancia del Ca^{2+} en varios procesos fisiológicos del espermatozoide, tales como la movilidad, la capacitación y la RA (Benoff, 1998; Darszon et al., 2005). Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares que regulan estos eventos. Estudios previos muestran la presencia de canales HVA en el espermatozoide de mamífero. En el espermatozoide de ratón $\text{Ca}_v1.2$ y $\text{Ca}_v2.1$ se localizan en el flagelo (Serrano et al., 1999; Westenbroek y Babcock, 1999; Carlson et al., 2003) y $\text{Ca}_v1.2$ en la región acrosomal del espermatozoide de humano y de rata (Goodwin et al., 1997; Goodwin et al., 1998). En el presente trabajo se mostró que anti- $\text{Ca}_v1.2$ reconoce la pieza media y con menor intensidad la pieza principal del flagelo y anti- $\text{Ca}_v2.3$ se localiza en la pieza principal y en el segmento ecuatorial de la cabeza. La diferencia en el patrón de fluorescencia para $\text{Ca}_v1.2$ se puede deber a que se utilizaron diferentes técnicas de inmunolocalización o porque los anticuerpos que se emplearon reconocen diferentes epítopes, ya que en nuestro caso usamos un anticuerpo policlonal y en el caso de Goodwin y cols., utilizaron un anticuerpo monoclonal (Goodwin et al., 1997; Goodwin et al., 1998). A nivel de proteína no detectamos $\text{Ca}_v1.3$ y $\text{Ca}_v2.1$ lo cual es consistente con estudios recientes, donde se mostró en espermatozoides de humano la presencia del RNA mensajero para $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v2.2$, $\text{Ca}_v2.3$, $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$, pero no se detectaron los RNA mensajeros para $\text{Ca}_v1.3$ y $\text{Ca}_v2.1$ (Park et al., 2003). A pesar de que se detectó el RNA mensajero de $\text{Ca}_v2.2$ en el espermatozoide de humano (Park et al., 2003), nosotros no lo pudimos detectar a nivel de proteína, esto quizá se deba a que el espermatozoide es una célula terminal que no es capaz llevar a cabo la síntesis

de proteínas, o que la sensibilidad de nuestro ensayo no es suficiente para detectar niveles bajos de expresión.

Las células espermatogénicas (CE) de ratón expresan funcionalmente las corrientes tipo T, y por estudios de RT-PCR se mostró la presencia de dos genes que codifican para los canales tipo T ($Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$) tanto en ratón como en humano (Espinosa et al., 1999; Son et al., 2000; Jagannathan et al., 2002). Sin embargo, la expresión de $Ca_v3.3$ no se había determinado en CE de ratón. En nuestro laboratorio, en estas células mediante experimentos de RT-PCR usando oligos específicos se obtuvo una banda de 404 pb, que corresponde al canal $Ca_v3.3$ de ratón (Trevino et al., 2004). La expresión del RNAm de esta isoforma se había reportado exclusivamente en cerebro (Lee et al., 1999b; Talley et al., 1999), pero recientemente su presencia fue observada también en espermatozoides de humano (Park et al., 2003).

Dado que los RNAm de los tres canales de Ca^{2+} tipo T están presentes en eyaculados de humano (Park et al., 2003), fue interesante establecer si estos canales se expresan a nivel de proteína en el espermatozoide. Para este fin, se utilizaron seis anticuerpos policlonales contra los tres diferentes canales Ca_v3 , tres contra las regiones N-terminal y tres contra las regiones C-terminal. Los anticuerpos dirigidos contra la región C- y N-terminal de cada Ca_v3 , produjeron patrones de tinción similares. Mediante microscopía confocal $Ca_v3.1$ produjo una señal específica en la cabeza y en el flagelo. $Ca_v3.2$ reconoce la pieza principal del flagelo y $Ca_v3.3$ exclusivamente la pieza media. Utilizando microscopía electrónica se muestra que las partículas de oro se asociaron preferencialmente a la MP del flagelo y un poco menos en la cabeza. La baja abundancia de los canales Ca_v en la cabeza encontrado con esta técnica puede explicar nuestra dificultad para detectar estos canales en la cabeza con inmunofluorescencia. La

distribución heterogénea de estos canales sugiere su posible participación en funciones diversas del espermatozoide. Específicamente, su presencia en el flagelo sugiere la participación en la movilidad del espermatozoide.

La presencia de múltiples tipos de TRPC se han detectado en células espermatogénicas y en el espermatozoide de ratón (Trevino et al., 2001). Sin embargo, en espermatozoides de humano no se había identificado su presencia. Los hallazgos presentados en este trabajo son la primera evidencia de la expresión de los diferentes canales TRPC en el espermatozoide de humano y su posible participación en la movilidad de estas células.

Las proteínas TRPC se inmunolocalizaron principalmente en el flagelo del espermatozoide, aunque en algunos casos también hubo tinción en la cabeza. Estos datos proporcionan evidencia de la heterogeneidad en la expresión de los canales TRPC en el espermatozoide de humano y sugieren que pueden participar en la homeostasis del Ca^{2+} , participando en varios papeles fisiológicos de estas células. Los resultados de inmunocitoquímica para TRPC1, 3 y 6 son consistentes con la presencia de TRPC1, 3 y 6 a nivel de RNA (Castellano et al., 2003). Sin embargo, la presencia de TRP6 no se pudo confirmar por microscopía electrónica, esta inconsistencia pudo deberse a problemas técnicos asociados con el uso de diferentes diluciones del péptido antigénico y/o con el uso de diferentes anticuerpos secundarios. Se debe confirmar la presencia de TRPC6 mediante estudios de Western blot. Adicionalmente, detectamos TRPC4 y TRPC5 con anticuerpos pero no fue posible amplificar su correspondiente RNAm. La razón de esta discrepancia no está determinada, tal vez la abundancia del RNAm es muy baja o se trate de isoformas de TRPC4 y TRPC5 específicas para espermatozoide. La presencia de

TRPC5 y TRPC6 se necesita explorar más a fondo realizando experimentos de Western blot.

El efecto del Ca^{2+} externo observado sobre la movilidad de los espermatozoides de humano y la presencia de canales de Ca_v tanto HVA como LVA, nos sugieren la posible participación de estos canales en la movilidad. Para probar esta hipótesis se utilizaron varios antagonistas de los Ca_v . El mibefradil es un bloqueador que permite diferenciar a los canales LVA de los HVA, ya que inhibe a los primeros a concentraciones bajas ($\sim 5 \mu\text{M}$) y a los segundos a mayores concentraciones ($\sim 30 \mu\text{M}$) (Clozel et al. 1997). Además, en espermatozoides de humano capacitados y no capacitados se ha observado que el mibefradil ($\text{IC}_{50} \sim 11 \mu\text{M}$) inhibe la entrada de Ca^{2+} activada por la progesterona (Garcia y Meizel, 1999) y en CE de ratón bloquea las corrientes de Ca^{2+} tipo T con una $\text{IC}_{50} \sim 5 \mu\text{M}$ (Arnoult et al., 1998). Con base en estos antecedentes decidimos probar el efecto del mibefradil sobre la movilidad activada del espermatozoide de humano. En nuestros estudios, el mibefradil no afectó la movilidad activada a las concentraciones que bloquea a los canales tipo HVA. Por otro lado, se ha observado que este compuesto también inhibe las corrientes tipo LVA a concentraciones mayores y dada la presencia de canales de Ca^{2+} tipo LVA decidimos probar concentraciones mayores de mibefradil. Además, en células de miocitos de cobayo que tienen corrientes de Ca^{2+} tipo T y L, el mibefradil inhibe las corrientes T con una $\text{IC}_{50} \sim 1.6 \mu\text{M}$ y las corrientes tipo L con una $\text{IC}_{50} \sim 28 \mu\text{M}$ (Clozel et al., 1997). En este trabajo reportamos que concentraciones mayores de mibefradil ($20\text{-}30 \mu\text{M}$) producen una disminución de la movilidad activada en un 25%, indicando la posible participación de los canales tipo HVA sobre la movilidad activada del espermatozoide de humano. Para confirmar estos resultados se emplearon antagonistas

de los canales tipo HVA como la nifedipina (5 - 20 μM) y la calciseptina (1 - 5 μM). Sin embargo, no se observó un efecto significativo sobre la movilidad activada del espermatozoide de humano. En conjunto, estos resultados indican que los canales de Ca^{2+} tipo HVA y LVA, no participan notablemente en la movilidad basal del espermatozoide de humano y que el efecto del mibefradil observado sobre la movilidad tal vez sea a través de otro blanco o que la movilidad del espermatozoide es regulada por la contribución de varios tipos de canales de Ca^{2+} . También es importante mencionar que dos reportes recientes indican que ratones que tienen mutado $\text{Ca}_v3.1$ (Stambouljian et al., 2004) y $\text{Ca}_v3.2$ (Chen et al., 2003) son fértiles, pero no se puede descartar la participación de los canales Ca_v en la movilidad del espermatozoide hasta que no se tenga un doble mutante, pues puede haber redundancia en la función. Alternativamente, estos canales podrían estar participando en el proceso de maduración durante su paso por el epidídimo, como es el caso de Bin1b (un miembro de la familia de la β -defensina) que induce aumento de Ca^{2+} y regula la movilidad progresiva en el espermatozoide inmaduro que se encuentra en el segmento inicial del epidídimo (Zhou et al., 2004).

En estudios previos se mostró la presencia de distintos TRPCs, no solo en la cabeza sino también en el flagelo del espermatozoide de ratón (Trevino et al., 2001) sugiriendo que pueden estar implicados en determinar la movilidad. Además, un reporte reciente indica que los SOCs regulan la quimiotaxis y la movilidad en espermatozoides de ascidia (Yoshida et al., 2003). Dado que el Ni^{2+} bloquea los SOCs involucrados en la reacción acrosomal de ratón ($\text{IC}_{50} \sim 500 \mu\text{M}$) (O'Toole et al., 2000), probamos su capacidad para inhibir la movilidad del espermatozoide de humano. Encontramos que el Ni^{2+} medianamente afecta la movilidad de manera dosis-dependiente, disminuyéndola en $\sim 20\%$ a 1 mM y diferencialmente altera algunos de los parámetros de movilidad. El Ni^{2+} a

esta concentración puede afectar tanto el Ca^{2+} basal a través de los SOC y/o TRPCs parcialmente activados en los espermatozoides en movimiento como influir en el Ca^{2+} alterando otros sistemas de transporte de Ca^{2+} como el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Egger et al., 1999). Por otro lado, los canales de Ca^{2+} tipo T que son más sensibles a Ni^{2+} (Lee et al., 1999a), parece que no afectan la movilidad basal. Considerando la inespecificidad del Ni^{2+} , no se puede descartar la participación de otros transportadores que aumenten la concentración de Ca^{2+} como los canales de las pozas internas (receptor a IP_3) o canales catiónicos no selectivos regulados por AMPc , como el CatSper (Ren et al., 2001; Wennemuth et al., 2003). Por otro lado, el efecto de Ni^{2+} a 1 mM puede ser el resultado del bloqueo de todas las contribuciones individuales de los canales Ca_v , TRP y/o SOCs y probablemente otro tipo de canales de Ca^{2+} .

Para establecer la contribución de los canales TRPC y/o SOCs en la movilidad del espermatozoide de humano, probamos el SKF96365, un bloqueador de estos canales. Encontramos que este compuesto reduce la movilidad de manera dosis dependiente. Con 10 minutos de incubación, 20 μM de SKF96365 inhibe ~70% de la movilidad basal. La IC_{50} estimada para esta inhibición (~7 μM) es consistente con la reportada para bloquear los canales TRPC recombinantes (IC_{50} 5-8 μM) (Zhu et al., 1998; Halaszovich et al., 2000). Es importante mencionar que 20 μM de SKF96365 no afecta significativamente la actividad de los canales de Ca^{2+} tipo T registrados en células espermátogénicas de ratón, sugiriendo que efectivamente los canales TRPC y/o SOCs pueden influir en la regulación de la movilidad basal.

Nuestros hallazgos con Ni^{2+} y SKF96365 indican que los canales TRPC y/o SOCs pueden influir en la movilidad. En este escenario, son paradójicos los resultados obtenidos con Gd^{3+} y 2-APB (antagonistas de los SOCs) ya que no afectaron la movilidad de

manera significativa. Posiblemente estas observaciones inesperadas resultan de las complejas interacciones entre estos dos compuestos y los canales tipo SOCs y/o TRPCs. La mayoría de los canales TRPC se bloquean con lantánidos, sin embargo, a concentraciones micromolares (1-1000 μM) el Gd^{3+} y el La^{3+} activan las corrientes TRPC5 expresadas heterológamente, mientras que a concentraciones milimolar (5 mM) las inhiben (Jung et al., 2003). Además hTRPC3 expresado heterológamente en células HEK293 es insensible a Gd^{3+} (Trebak et al., 2002). En cambio TRPC6 expresado heterológamente es sensible a La^{3+} y Gd^{3+} (1-1000 μM). Igualmente, 2-APB inhibe parcialmente hTRPC3 a altas concentraciones (100 μM) (Trebak et al., 2002). Se ha especulado que estas características farmacológicas pueden resultar de diferentes modos de activación de los canales y también pueden reflejar diferencias en su estructura molecular. Los canales TRPC de los espermatozoides que modulan movilidad pueden ser diferentes que aquellos responsables de la entrada de Ca^{2+} capacitativa y ser operados por receptor o activados por segundos mensajeros. Alternativamente, existe la posibilidad que los TRPCs de los espermatozoides implicados en la movilidad sean heteromultímeros con un perfil farmacológico particular.

Algunas evidencias indican que TRPC2 participa en la entrada sostenida de Ca^{2+} durante la RA en ratones (Jungnickel et al., 2001). Sin embargo, el ratón mutante para mTRPC2 no se ve afectado en su fertilidad (Stowers et al., 2002; Lobleby et al., 2003). Estos hallazgos sugieren que el canal iónico involucrado en el aumento sostenido de Ca^{2+} necesario para que se lleve a cabo la RA puede ser un tetrámero compuesto por diferentes proteínas TRPC. Además, en humano el TRPC2 está considerado como un pseudogen (Vannier et al., 1999), de esta forma TRPC1, 3, 4 y 6 presentes en la cabeza

del espermatozoide pueden ser candidatos para formar los SOCs que pueden participar en la RA del espermatozoide de humano.

Por último, la señal externa que modula la movilidad del espermatozoide no se conoce bien, nuestras observaciones son consistentes con el conocido papel fundamental del Ca^{2+} en la movilidad. El balance de Ca^{2+} puede ser influenciado por los canales TRPC y/o SOCs que tienen un amplio rango de modos de regulación. En el futuro se tendrá que determinar el mecanismo exacto por el cual los TRPCs contribuyen a la entrada de Ca^{2+} al espermatozoide, y el papel que estas proteínas tienen en la regulación del metabolismo celular y la respuesta a señales extracelulares durante la movilidad del espermatozoide.

El Ca^{2+} tiene un papel muy importante en la regulación de la movilidad hiperactivada. Ya que en espermatozoides de hámster se requiere de Ca^{2+} extracelular para mantener la hiperactivación *in vitro* (Yanagimachi, 1994), y el tratamiento de espermatozoides de ratón con el ionóforo de Ca^{2+} A23187 rápidamente induce la hiperactivación de la movilidad (Suarez and Osman, 1987). Asimismo, se han visto fluctuaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la pieza media distal y proximal del flagelo, en el acrosoma y en la región postacrosomal durante la movilidad hiperactivada (Suarez et al., 1993). Las fluctuaciones detectadas en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se pueden atribuir a una rápida apertura y cierre de canales de Ca^{2+} combinada con la participación de bombas e intercambiadores y una rápida unión y liberación de Ca^{2+} por medio de proteínas con afinidad a Ca^{2+} . Para estudiar la posible participación de los canales Ca_v y los canales tipo TRPC en la hiperactivación, los espermatozoides se incubaron con diferentes concentraciones de nifedipina (1 - 30 μM), nimodipina (2 - 30 μM), mibefradil (5 - 40 μM), SKF96365 (5 - 20 μM) y 2-APB (10 - 75 μM), tanto durante como después del período de capacitación. Sin embargo, parece ser que los canales Ca_v y TRPC y/o SOCs no tienen efectos muy

notables sobre la movilidad hiperactivada. Puede ser que estos canales estén regulando de manera sutil la movilidad o que todos o más de uno participen en la entrada de Ca^{2+} . En un estudio reciente llevado a cabo en nuestro laboratorio en espermatozoides de erizo de mar, se observó que la nimodipina inhibe el aumento de Ca^{2+} transitorio inducido por GMPc. Este aumento transitorio de Ca^{2+} regula la asimetría del flagelo del espermatozoide de erizo de mar, pero esto ocurre en milisegundos (Wood et al., 2003). Esto sugiere que los canales Ca_v podrían estar regulando la forma de bateo flagelar, lo cual no es posible determinar con el sistema CASA. Por otro lado, recientemente se ha propuesto que CatSper1 y CatSper2 podrían funcionar como canales de Ca^{2+} que controlan la entrada del ión y que regulan la movilidad hiperactivada, ya que los espermatozoides CatSper^{-/-} no son capaces de llevar a cabo esta función. A continuación se presenta un modelo del mecanismo de regulación de la movilidad hiperactivada. En la que planteamos el posible mecanismo de regulación de la movilidad hiperactivada.

MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA HIPERACTIVACIÓN

Numerosos factores fisiológicos, como el Ca^{2+} , el AMPc, el bicarbonato y algunos substratos metabólicos son esenciales para el inicio y mantenimiento de la movilidad hiperactivada *in vitro*. En la figura 31 se muestra un modelo del mecanismo de regulación de la hiperactivación, donde se señala al Ca^{2+} y al AMPc entre los factores más importantes en la regulación de este evento. En el modelo, una señal fisiológica desconocida activa una fosfolipasa C (PLC) a través de un receptor (R_1) acoplado a una proteína G heterotrimérica ($\text{G}_{q/11}$) y produce IP_3 . La unión del IP_3 a su receptor (IP_3R) causa un aumento del Ca^{2+} citoplásmico. La activación de la adenilato ciclasa (AC) a través del Ca^{2+} citoplásmico y de proteínas G aumenta los niveles de AMPc, también el

bicarbonato puede causar un aumento del AMPc activando directamente una adenilato ciclasa soluble (ACs). El AMPc puede activar a un canal de Ca^{2+} , como canales Ca_v , CNG o CatSper. Es posible que la entrada de Ca^{2+} que regula la hiperactivación, se lleve a cabo a través de CatSper, pues se ha observado que espermatozoides de ratones CatSper^{-/-} (Quill et al., 2003), no son capaces de hiperactivarse, lo cual sugiere que este canal podría ser el responsable de la entrada de Ca^{2+} necesaria para que ocurra la hiperactivación. Otra posibilidad es que existan varios tipos de canales de Ca^{2+} que estén contribuyendo en la regulación de la movilidad del espermatozoide, ya que nuestros resultados indican que los canales Ca_v y TRPC no afectan notablemente la movilidad activada e hiperactivada del espermatozoide de humano, esto aunado a los datos recientemente publicados, donde se ha observado que ratones que tienen mutado $\text{Ca}_v3.1$ (Stamboulian et al., 2004) y $\text{Ca}_v3.2$ (Chen et al., 2003) son fértiles. Además el aumento de AMPc activa una proteína cinasa A (PKA) y fosforila proteínas del axonema o de la vaina fibrosa lo cual resulta en el movimiento flagelar. Una concentración alta de Ca^{2+} y del complejo Ca^{2+} /calmodulina son los responsables de la asimetría en movimiento flagelar que se observa en la hiperactivación (Fig. 31) (Ho y Suarez, 2001).

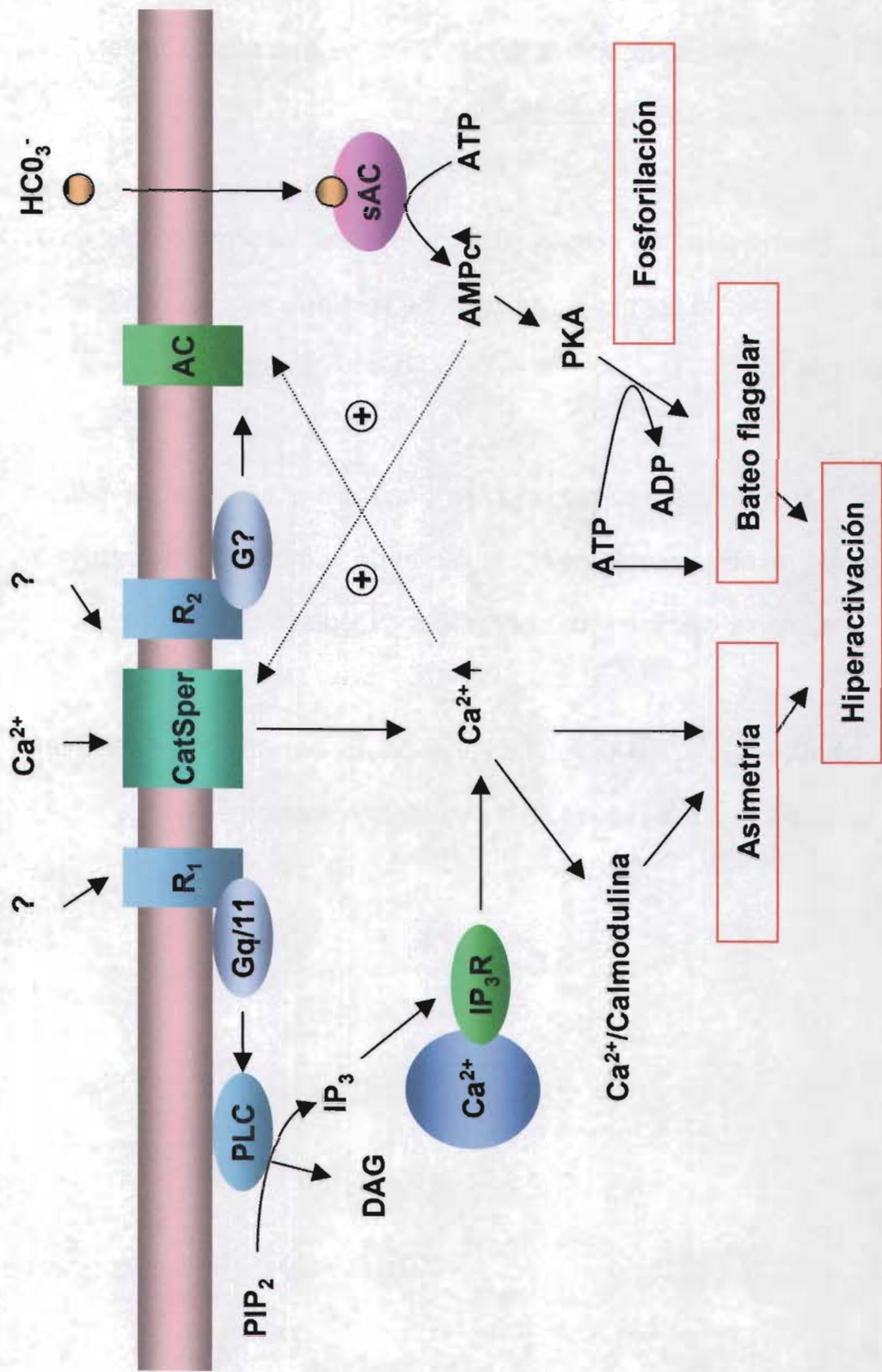


Figura 31. Modelo hipotético del mecanismo de regulación de la hiperactivación. PLC, fosfolipasa C; R, receptor; AC, adenilato ciclasa; ACs, adenilato ciclasa soluble; IP₃R, receptor a IP₃; PKA, proteína cinasa A. Modificado de Ho y Suarez, (2001). *Reproduction* 122: 519-26.

V. CONCLUSIONES

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y los TRPC se encuentran distribuidos diferencialmente en el espermatozoide de humano.

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje no participan de manera notable en la movilidad activada e hiperactividad del espermatozoide de humano, bajo las condiciones experimentales estudiadas.

Los canales tipo TRPC podrían estar participando en la movilidad activada de manera parcial y no participan de manera notable en la regulación de la movilidad hiperactivada del espermatozoide de humano, bajo nuestras condiciones experimentales.

La presencia de los canales Ca_v y TRPC en la cabeza del espermatozoide de humano sugieren su posible participación en la regulación de la reacción acrosomal.

VI. PERSPECTIVAS

Hacer estudios del efecto de los bloqueadores de los canales de Ca_v y de los canales tipo TRPC sobre curvatura del flagelo, tales como diámetro y amplitud de la curvatura.

Investigar si existen otras entidades moleculares que regulen el Ca^{2+} intracelular en el espermatozoide de humano y estudiar su posible participando en la regulación de la movilidad de dicha célula.

Estudiar el efecto del ZD7288 sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular en células en población, en célula única pegada y en célula única en movimiento.

Estudiar el efecto del ZD7288 sobre el pH intracelular, sobre los niveles de fosforilación y de AMPc.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad K, Bracho GE, Wolf DP, Tash JS (1995) Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin, and protein phosphatases. *Arch Androl* 35:187-208.
- Aoki F, Sakai S, Kohmoto K (1999) Regulation of flagellar bending by cAMP and Ca²⁺ in hamster sperm. *Mol Reprod Dev* 53:77-83.
- Arias JM, Murbartian J, Perez-Reyes E (2003) Cloning of a novel one-repeat calcium channel-like gene. *Biochem Biophys Res Commun* 303:31-36.
- Arnoult C, Villaz M, Florman HM (1998) Pharmacological properties of the T-type Ca²⁺ current of mouse spermatogenic cells. *Mol Pharmacol* 53:1104-1111.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G (2000) Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci* 5:E110-123.
- Benoff S (1998) Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. *Front Biosci* 3:D1220-1240.
- Bleil JD, Wassarman PM (1983) Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 95:317-324.
- Boatman DE, Robbins RS (1991) Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol Reprod* 44:806-813.
- Bourinet E, Stotz SC, Spaetgens RL, Dayanithi G, Lemos J, Nargeot J, Zamponi GW (2001) Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) calcium channels. *Biophys J* 81:79-88.
- Burkman LJ (1984) Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. *Arch Androl* 13:153-165.
- Carbone E, Lux HD (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501-502.

- Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF (2003) CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14864-14868.
- Castellano LE, Trevino CL, Rodriguez D, Serrano CJ, Pacheco J, Tsutsumi V, Felix R, Darszon A (2003) Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett* 541:69-74.
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* 55:579-581.
- Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA, Campbell KP (2003) Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels. *Science* 302:1416-1418.
- Chyb S, Raghu P, Hardie RC (1999) Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* 397:255-259.
- Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D (2003) International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 55:591-596.
- Clozel JP, Ertel EA, Ertel SI (1997) Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker. *J Hypertens Suppl* 15:S17-25.
- Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285-287.
- Cosson J (1996) A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biol Int* 20:83-94.
- Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Trevino CL, Felix R, Beltran C (2005) Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* 243:79-172.

- de Weille JR, Schweitz H, Maes P, Tartar A, Lazdunski M (1991) Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2437-2440.
- Dean J (2004) Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays* 26:29-38.
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE (2003) Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 278:7001-7009.
- Egger M, Ruknudin A, Niggli E, Lederer WJ, Schulze DH (1999) Ni²⁺ transport by the human Na⁺/Ca²⁺ exchanger expressed in Sf9 cells. *Am J Physiol* 276:C1184-1192.
- Ellis SB, Williams ME, Ways NR, Brenner R, Sharp AH, Leung AT, Campbell KP, McKenna E, Koch WJ, Hui A, et al. (1988) Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 241:1661-1664.
- Ensslin MA, Shur BD (2003) Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* 114:405-417.
- Espinosa F, Lopez-Gonzalez I, Serrano CJ, Gasque G, de la Vega-Beltran JL, Trevino CL, Darszon A (1999) Anion channel blockers differentially affect T-type Ca(2+) currents of mouse spermatogenic cells, alpha1E currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction. *Dev Genet* 25:103-114.
- Felix R, Sandoval A, Sanchez D, Gomora JC, De la Vega-Beltran JL, Trevino CL, Darszon A (2003) ZD7288 inhibits low-threshold Ca(2+) channel activity and regulates sperm function. *Biochem Biophys Res Commun* 311:187-192.
- Fleig A, Penner R (2004) The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci* 25:633-639.
- Fraser LR (1983) Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro. *J Reprod Fertil* 69:539-553.
- Goodwin LO, Karabinus DS, Pergolizzi RG, Benoff S (2000) L-type voltage-dependent calcium channel alpha-1C subunit mRNA is present in ejaculated human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 6:127-136.

- Goodwin LO, Leeds NB, Hurley I, Mandel FS, Pergolizzi RG, Benoff S (1997) Isolation and characterization of the primary structure of testis-specific L-type calcium channel: implications for contraception. *Mol Hum Reprod* 3:255-268.
- Goodwin LO, Leeds NB, Hurley I, Cooper GW, Pergolizzi RG, Benoff S (1998) Alternative splicing of exons in the alpha1 subunit of the rat testis L-type voltage-dependent calcium channel generates germ line-specific dihydropyridine binding sites. *Mol Hum Reprod* 4:215-226.
- Gorus FK, Finsky R, Pipeleers DG (1982) Effect of temperature, nutrients, calcium, and cAMP on motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 242:C304-311.
- Gurnett CA, De Waard M, Campbell KP (1996) Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16:431-440.
- Halaszovich CR, Zitt C, Jungling E, Luckhoff A (2000) Inhibition of TRP3 channels by lanthanides. Block from the cytosolic side of the plasma membrane. *J Biol Chem* 275:37423-37428.
- Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA (2005) The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol* 202:663-671.
- Ho HC, Suarez SS (2001) Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 122:519-526.
- Ho HC, Suarez SS (2003) Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol. Reprod* 68:1590-1596.
- Ho HC, Granish KA, Suarez SS (2002) Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol* 250:208-217.
- Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N (1999a) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139:33-87.
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999b) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397:259-263.
- Huang CL (2004) The transient receptor potential superfamily of ion channels. *J Am Soc Nephrol* 15:1690-1699.

- Jagannathan S, Punt EL, Gu Y, Arnoult C, Sakkas D, Barratt CL, Publicover SJ (2002) Identification and localization of T-type voltage-operated calcium channel subunits in human male germ cells. Expression of multiple isoforms. *J Biol Chem* 277:8449-8456.
- Jay SD, Ellis SB, McCue AF, Williams ME, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP (1990) Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 248:490-492.
- Jung S, Muhle A, Schaefer M, Strotmann R, Schultz G, Plant TD (2003) Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J Biol Chem* 278:3562-3571.
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM (2001) Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 3:499-502.
- Kay VJ, Robertson L (1998) Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 4:776-786.
- Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, Muallem S (1998) Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396:478-482.
- Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E (1999a) Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys J* 77:3034-3042.
- Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, Perez-Reyes E (1999b) Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19:1912-1921.
- Lee MA, Trucco GS, Bechtol KB, Wummer N, Kopf GS, Blasco L, Storey BT (1987) Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril* 48:649-658.
- Leypold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R (2002) Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6376-6381.
- Lievano A, Santi CM, Serrano CJ, Trevino CL, Bellve AR, Hernandez-Cruz A, Darszon A (1996) T-type Ca²⁺ channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* 388:150-154.

- Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR (2003) Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem* 278:15922-15926.
- Lobley A, Pierron V, Reynolds L, Allen L, Michalovich D (2003) Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reprod Biol Endocrinol* 1:53.
- Luconi M, Baldi E (2003) How do sperm swim? Molecular mechanisms underlying sperm motility. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49:357-369.
- Ma HT, Patterson RL, van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL (2000) Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science* 287:1647-1651.
- Marin-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverria F, Buffone M, Calamera JC, Tezon JG, Vazquez-Levin MH (2003) Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertil Steril* 79:1396-1403.
- Miljanich GP, Ramachandran J (1995) Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:707-734.
- Minke B, Cook B (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 82:429-472.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 9:229-231.
- Mortimer ST (2000) CASA--practical aspects. *J Androl* 21:515-524.
- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S (1989) Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160:828-833.
- O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM (2000) Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 11:1571-1584.

- Parekh AB, Terlau H, Stuhmer W (1993) Depletion of InsP3 stores activates a Ca²⁺ and K⁺ current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature* 364:814-818.
- Park JY, Ahn HJ, Gu JG, Lee KH, Kim JS, Kang HW, Lee JH (2003) Molecular identification of Ca²⁺ channels in human sperm. *Exp Mol Med* 35:285-292.
- Putney JW, Jr. (2001) Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol Interv* 1:84-94.
- Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL (2001) A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12527-12531.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL (2003) Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14869-14874.
- Randriamampita C, Tsien RY (1993) Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* 364:809-814.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413:603-609.
- Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F (1989) Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 245:1115-1118.
- Sakata Y, Saegusa H, Zong S, Osanai M, Murakoshi T, Shimizu Y, Noda T, Aso T, Tanabe T (2002) Ca_v2.3 (alpha1E) Ca²⁺ channel participates in the control of sperm function. *FEBS Lett* 516:229-233.
- Serrano CJ, Trevino CL, Felix R, Darszon A (1999) Voltage-dependent Ca²⁺ channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett* 462:171-176.
- Serres C, Feneux D, Berthon B (1991) Decrease of internal free calcium and human sperm movement. *Cell Motil Cytoskeleton* 18:228-240.
- Shi X, Amindari S, Paruchuru K, Skalla D, Burkin H, Shur BD, Miller DJ (2001) Cell surface beta-1,4-galactosyltransferase-I activates G protein-dependent exocytotic signaling. *Development* 128:645-654.
- Si Y, Okuno M (1999) Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biol Reprod* 61:240-246.

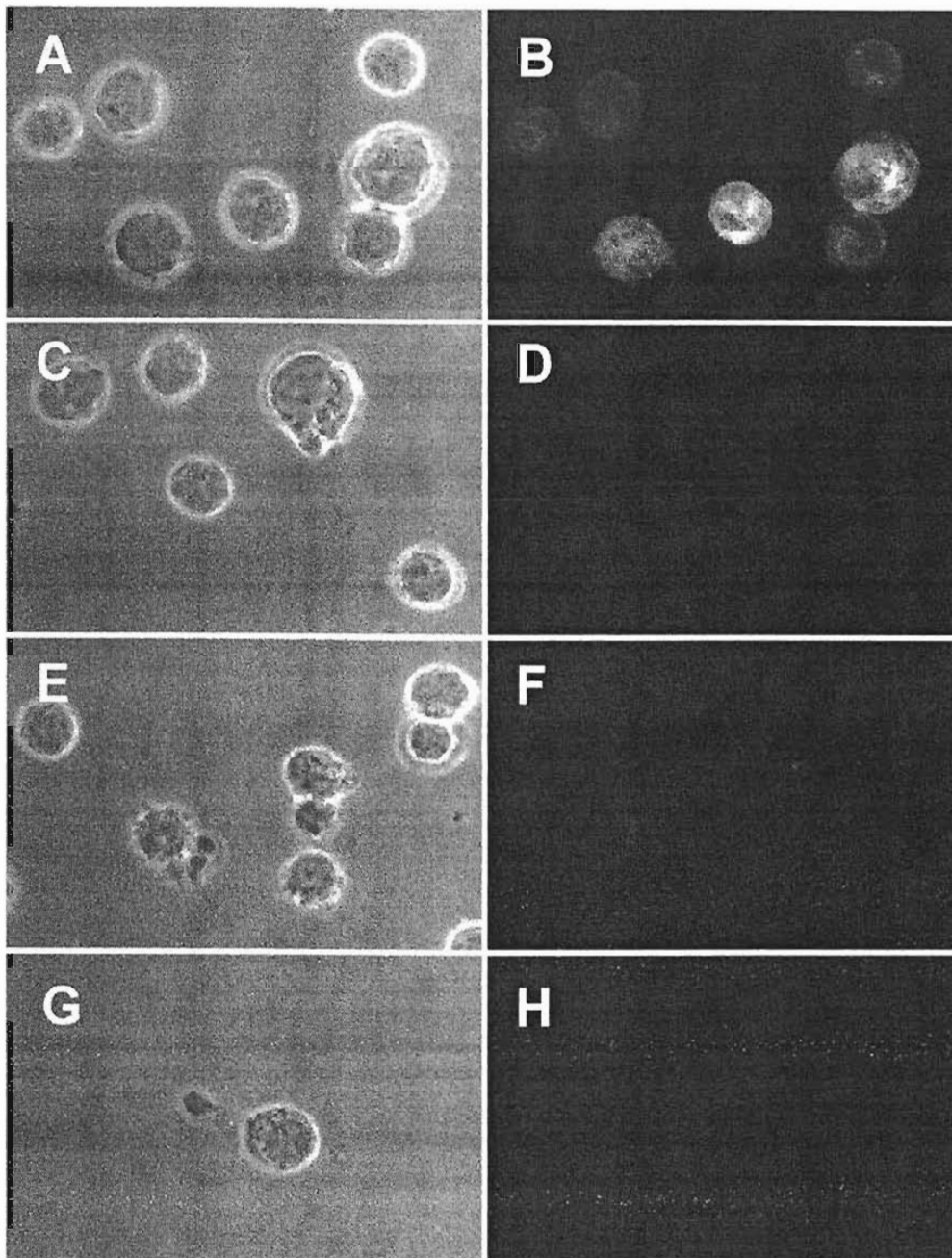
- Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES, Bolotina VM (2004) A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* 6:113-120.
- Son WY, Lee JH, Han CT (2000) Acrosome reaction of human spermatozoa is mainly mediated by alpha1H T-type calcium channels. *Mol Hum Reprod* 6:893-897.
- Stamboulian S, Kim D, Shin HS, Ronjat M, De Waard M, Arnoult C (2004) Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3.1 (alpha1G) calcium channel: CaV3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. *J Cell Physiol* 200:116-124.
- Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295:1493-1500.
- Suarez SS, Osman RA (1987) Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol Reprod* 36:1191-1198.
- Suarez SS, Ho HC (2003) Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim* 38:119-124.
- Suarez SS, Vincenti L, Ceglia MW (1987) Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *J Exp Zool* 244:331-336.
- Suarez SS, Varosi SM, Dai X (1993) Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4660-4664.
- Sutton KA, Jungnickel MK, Wang Y, Cullen K, Lambert S, Florman HM (2004) Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. *Dev Biol* 274:426-435.
- Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5478-5482.
- Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, Bayliss DA (1999) Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19:1895-1911.
- Tash JS, Means AR (1987) Ca²⁺ regulation of sperm axonemal motility. *Methods Enzymol* 139:808-823.

- Todorovic SM, Lingle CJ (1998) Pharmacological properties of T-type Ca²⁺ current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J Neurophysiol* 79:240-252.
- Trebak M, Bird GS, McKay RR, Putney JW, Jr. (2002) Comparison of human TRPC3 channels in receptor-activated and store-operated modes. Differential sensitivity to channel blockers suggests fundamental differences in channel composition. *J Biol Chem* 277:21617-21623.
- Trevino CL, Serrano CJ, Beltran C, Felix R, Darszon A (2001) Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett* 509:119-125.
- Trevino CL, Santi CM, Beltran C, Hernandez-Cruz A, Darszon A, Lomeli H (1998) Localisation of inositol trisphosphate and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: possible functional implications. *Zygote* 6:159-172.
- Trevino CL, Felix R, Castellano LE, Gutierrez C, Rodriguez D, Pacheco J, Lopez-Gonzalez I, Gomora JC, Tsutsumi V, Hernandez-Cruz A, Fiordelisisio T, Scaling AL, Darszon A (2004) Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca(2+) channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett* 563:87-92.
- Tsiokas L, Arnould T, Zhu C, Kim E, Walz G, Sukhatme VP (1999) Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3934-3939.
- Turner RM (2003) Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J Androl* 24:790-803.
- Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L (1999) Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca²⁺ entry channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2060-2064.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB (2002) Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 53:133-150.
- Walensky LD, Roskams AJ, Lefkowitz RJ, Snyder SH, Ronnett GV (1995) Odorant receptors and desensitization proteins colocalize in mammalian sperm. *Mol Med* 1:130-141.

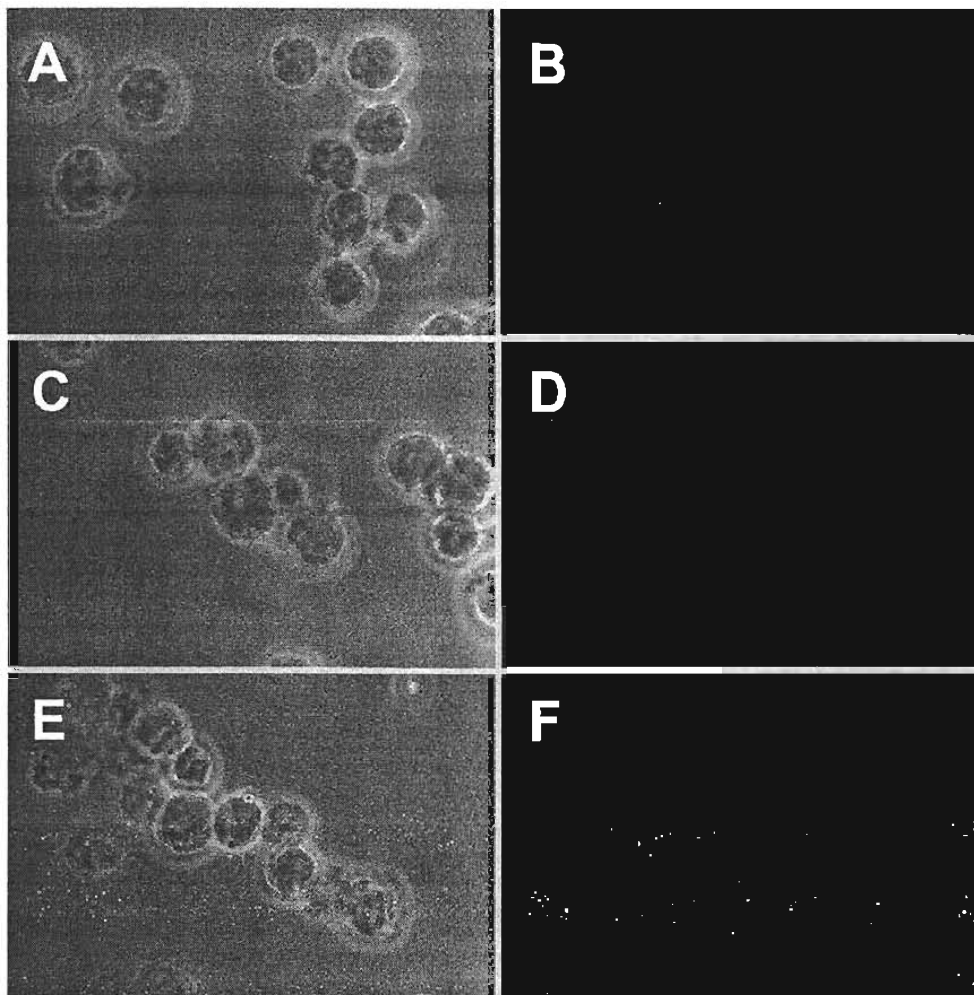
- Wassarman PM (1999) Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96:175-183.
- Wassarman PM (2002) Sperm receptors and fertilization in mammals. *Mt Sinai J Med* 69:148-155.
- Wennemuth G, Carlson AE, Harper AJ, Babcock DF (2003) Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺ -channel responses: initial events in sperm activation. *Development* 130:1317-1326.
- Wennemuth G, Westenbroek RE, Xu T, Hille B, Babcock DF (2000) CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm. *J Biol Chem* 275:21210-21217.
- Westenbroek RE, Babcock DF (1999) Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel alpha1 subunits in sperm. *Dev Biol* 207:457-469.
- White DR, Aitken RJ (1989) Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res* 22:163-177.
- Wissenbach U, Niemeyer BA, Flockerzi V (2004) TRP channels as potential drug targets. *Biol Cell* 96:47-54.
- Wissenbach U, Schroth G, Philipp S, Flockerzi V (1998) Structure and mRNA expression of a bovine trp homologue related to mammalian trp2 transcripts. *FEBS Lett* 429:61-66.
- Wood CD, Darszon A, Whitaker M (2003) Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *J Cell Biol* 161:89-101.
- Yanagimachi R (1994) Mammalian Fertilization. In: *The Fisiology of Reproduction* (Knobil E, Neill, J.D., ed), pp 189-317. New York: Raven Press.
- Yao Y, Ferrer-Montiel AV, Montal M, Tsien RY (1999) Activation of store-operated Ca²⁺ current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* 98:475-485.
- Yoshida M, Ishikawa M, Izumi H, De Santis R, Morisawa M (2003) Store-operated calcium channel regulates the chemotactic behavior of ascidian sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:149-154.
- Yunes R, Michaut M, Tomes C, Mayorga LS (2000) Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biol Reprod* 62:1084-1089.

- Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM (1996) pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO₃(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol* 173:510-520.
- Zhou CX, Zhang YL, Xiao L, Zheng M, Leung KM, Chan MY, Lo PS, Tsang LL, Wong HY, Ho LS, Chung YW, Chan HC (2004) An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat Cell Biol* 6:458-464.
- Zhu X, Jiang M, Birnbaumer L (1998) Receptor-activated Ca²⁺ influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca²⁺ entry. *J Biol Chem* 273:133-142.
- Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1996) trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* 85:661-671.
- Zitt C, Halaszovich CR, Luckhoff A (2002) The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry. *Prog Neurobiol* 66:243-264.

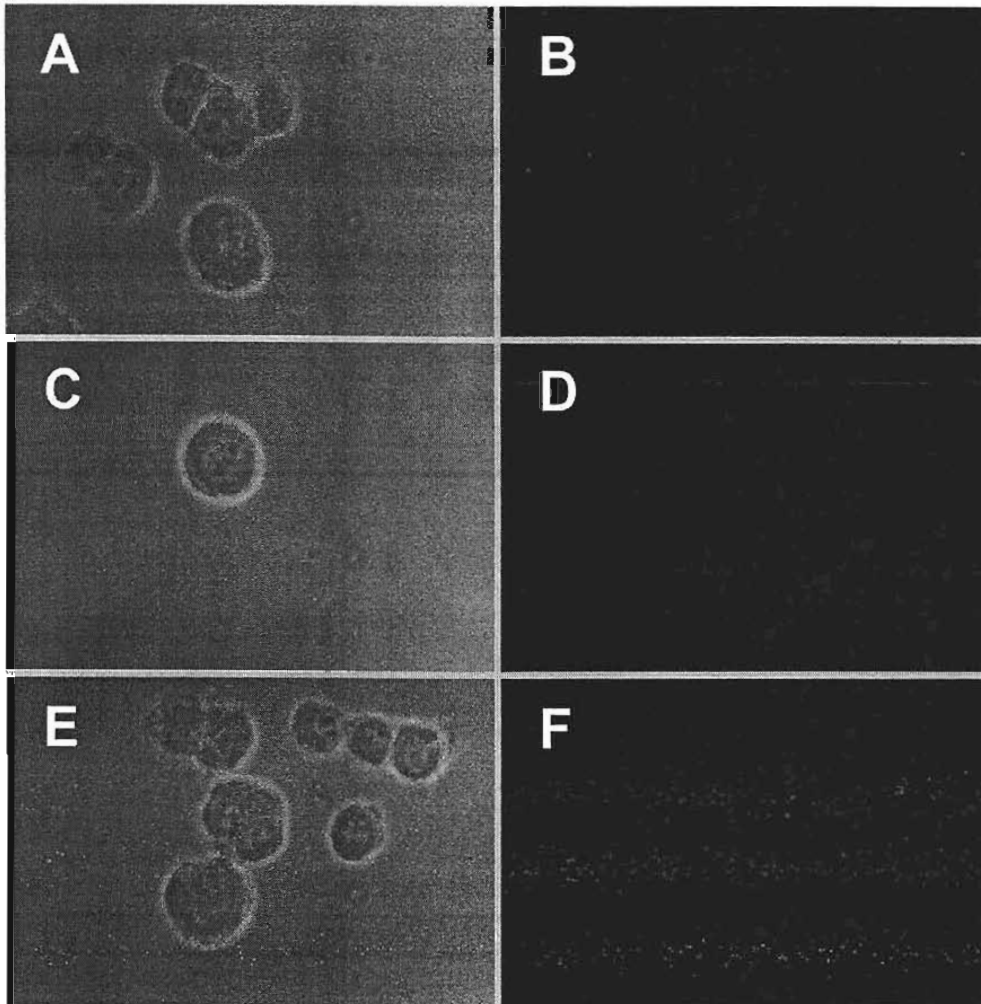
APÉNDICE I



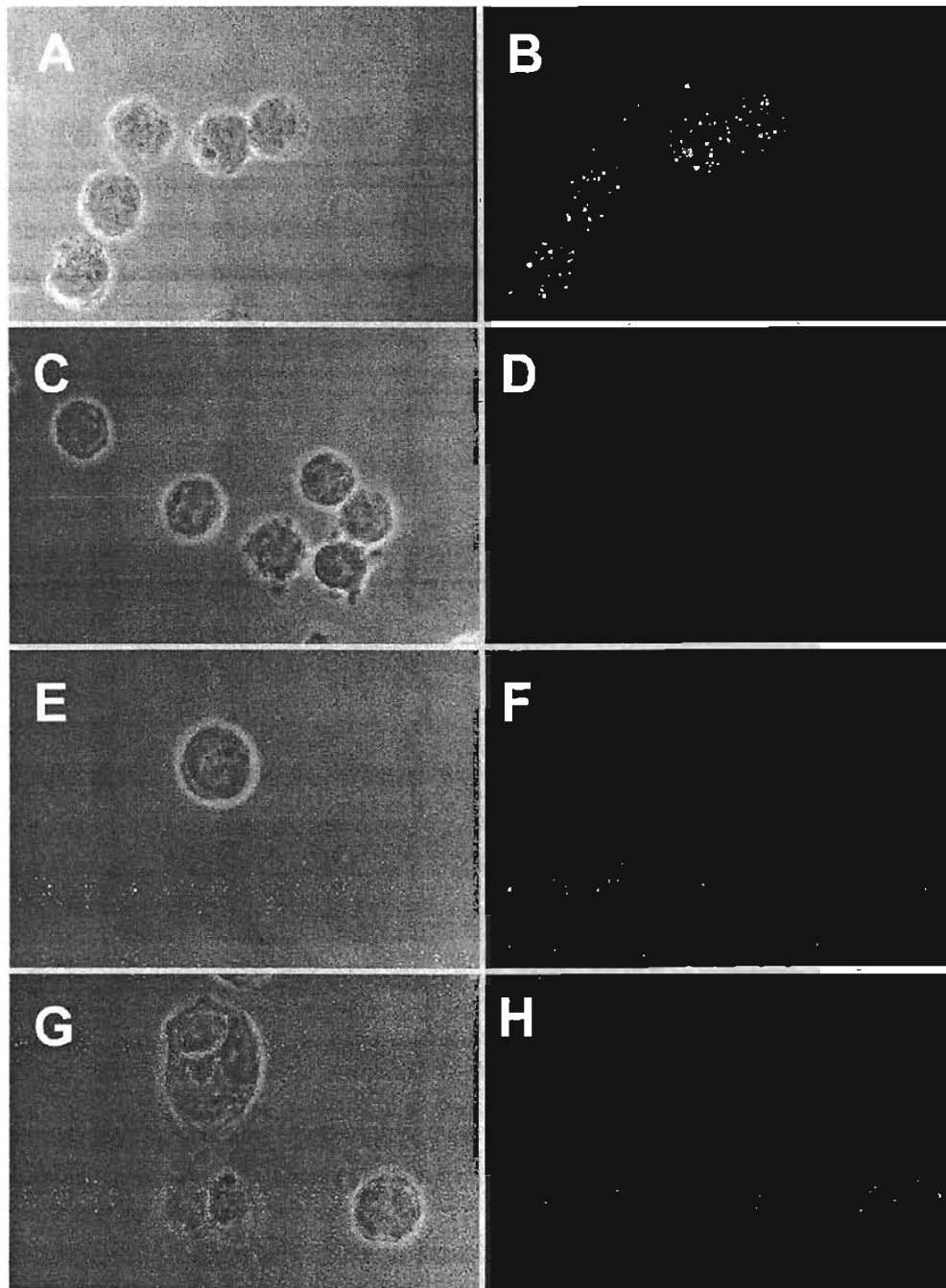
Inmunolocalización de $Ca_v3.2$ en las células HEK293 que expresan heterológamente $Ca_v3.2$. (A, C, E, y G) Imágenes de las células HEK en contraste de fases. (B) Imagen de inmunofluorescencia confocal de las células HEK teñidas con el anticuerpo anti- $Ca_v3.2$. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:5) correspondiente. (F) Células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario. (H) Autofluorescencia (n = 3).



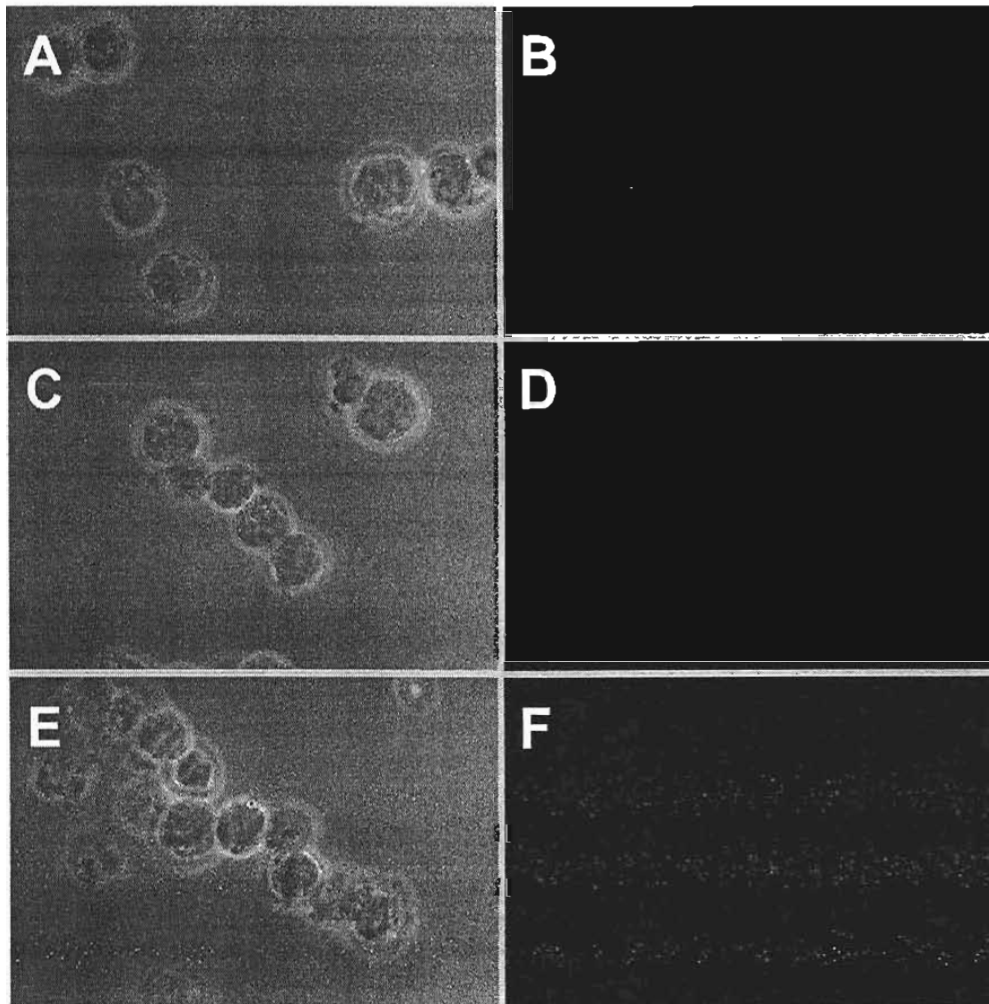
Immunolocalización de $Ca_v3.2$ en las células HEK293 que expresan heterológamente $Ca_v3.1$. (A, C y E) Imágenes de las células HEK en contraste de fases. (B) La Imagen de inmunofluorescencia confocal de las células HEK no muestra tinción con el anticuerpo anti- $Ca_v3.2$. (D) Células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario. (F) Autofluorescencia (n = 3).



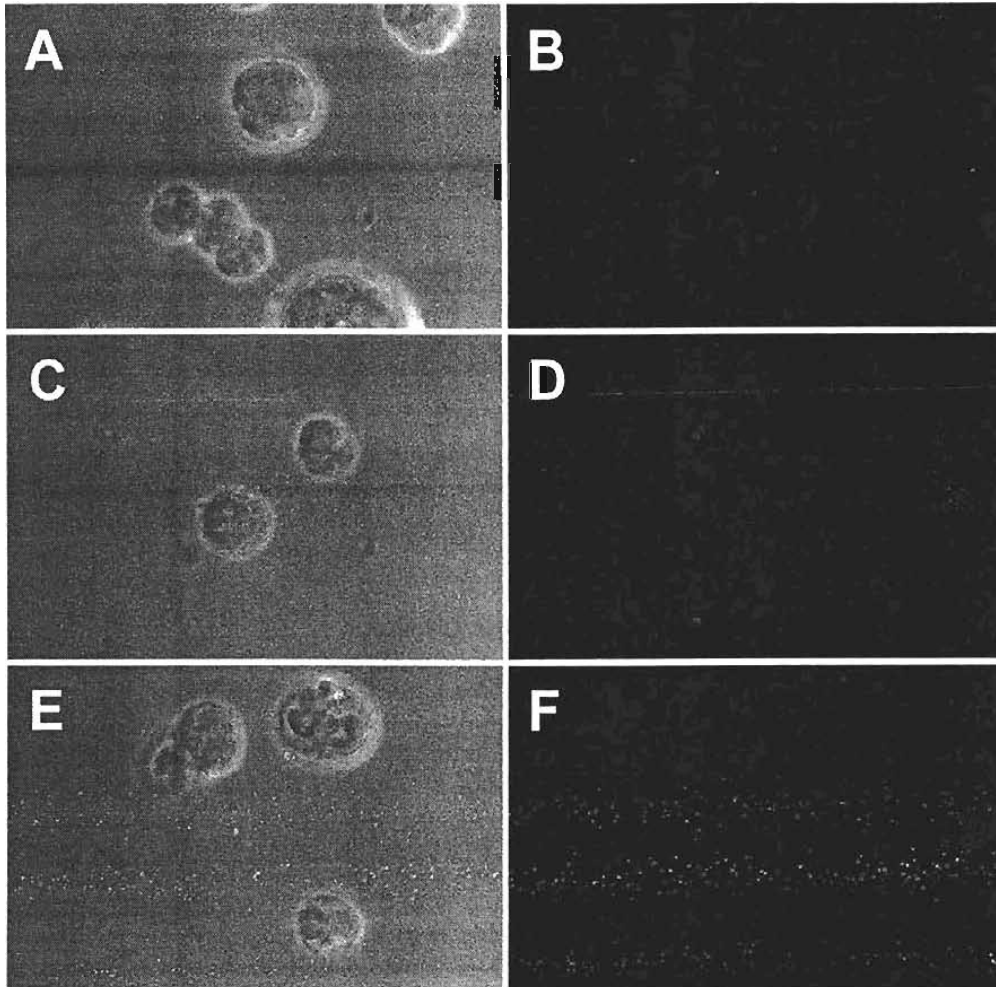
Inmunolocalización de $Ca_v3.2$ en las células HEK-293 que expresan heterológamente $Ca_v3.3$. (A, C y E) Imágenes de las células HEK en contraste de fases. (B) La imagen de inmunofluorescencia confocal de las células HEK no muestra tinción con el anticuerpo anti- $Ca_v3.2$. (D) Células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario. (F) Autofluorescencia (n = 3).



Inmunolocalización de $Ca_v3.3$ en las células HEK-293 que expresan heterológamente $Ca_v3.3$. (A, C, E, y G) Imágenes de las células HEK en contraste de fases. (B) Imagen de inmunofluorescencia confocal de las células HEK teñidas con el anticuerpo anti- $Ca_v3.3$. (D) La señal observada en B se elimina al preincubar el anticuerpo con su péptido antigénico (1:5) correspondiente. (F) Células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario. (H) Autofluorescencia (n = 3).



Inmunolocalización de $Ca_v3.3$ en las células HEK-293 que expresan heterológamente $Ca_v3.1$. (A, C y E) Imágenes de las células HEK en contraste de fases. (B) La Imagen de inmunofluorescencia confocal de las células HEK no muestra tinción con el anticuerpo anti- $Ca_v3.3$. (D) Células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario. (F) Autofluorescencia (n = 3).



Inmunolocalización de $Ca_v3.3$ en las células HEK-293 que expresan heterológicamente $Ca_v3.2$. (A, C y E) Imágenes de las células HEK en contraste de fases. (B) La imagen de inmunofluorescencia confocal de las células HEK no muestra tinción con el anticuerpo anti- $Ca_v3.3$. (D) Células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario. (F) Autofluorescencia (n = 3).

APÉNDICE II

Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility

Laura E. Castellano^{a,1}, Claudia L. Treviño^{a,1}, Delany Rodríguez^a, Carmen J. Serrano^{a,b}, Judith Pacheco^{c,d}, Víctor Tsutsumi^c, Ricardo Felix^b, Alberto Darszon^{a,*}

^aDepartment of Genetics of Development and Molecular Physiology, Institute of Biotechnology, UNAM, Cuernavaca, Mexico

^bDepartment of Physiology, Biophysics and Neuroscience, Cinvestav-IPN, Mexico City, Mexico

^cDepartment of Experimental Pathology, Cinvestav-IPN, Mexico City, Mexico

^dSchool of Medicine, La Salle University, Mexico City, Mexico

Received 4 March 2003; accepted 17 March 2003

First published online 31 March 2003

Edited by Maurice Montal

Abstract Capacitative Ca^{2+} entry is a process whereby the activation of Ca^{2+} influx through the plasma membrane is triggered by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. Some transient receptor potential (TRPC) proteins have been proposed as candidates for capacitative Ca^{2+} channels. Recent evidence indicates that capacitative Ca^{2+} entry participates in the sperm acrosome reaction (AR), an exocytotic process necessary for fertilization. In addition, several TRPCs have been detected heterogeneously distributed in mouse sperm, suggesting that they may participate in other functions such as motility. Using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis, RNA messengers for TRPC1, 3, 6 and 7 were found in human spermatogenic cells. Confocal indirect immunofluorescence revealed the presence of TRPC1, 3, 4 and 6 differentially localized in the human sperm, and immunogold transmission electron microscopy indicated that TRPC epitopes are mostly associated to the surface of the cells. Because all of them were detected in the flagellum, TRPC channel antagonists were tested in sperm motility using a computer-assisted assay. Our results provide what is to our knowledge the first evidence that these channels may influence human sperm motility.

© 2003 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Ca^{2+} channel; Capacitative Ca^{2+} entry; Transient receptor potential; TRPC; Store operated channel; Sperm motility

1. Introduction

Capacitative Ca^{2+} entry in some mammalian cell types helps to maintain Ca^{2+} levels in intracellular stores that may otherwise be depleted during production of repetitive intracellular Ca^{2+} (Ca^{2+}) spikes. However, ion influx through this pathway can also generate Ca^{2+} signals important for other functions [1]. Recent evidence suggests that the protein encoded by the transient receptor potential (*trp*) gene ex-

pressed in *Drosophila* photoreceptors may be homologous with capacitative Ca^{2+} entry channels in mammals, usually known as store operated channels (SOCs). In mammals, the TRP channel superfamily is constantly growing and encompasses three main families according to structural motifs (TRPC, TRPV and TRPM) [1,2].

TRPC channels are widely expressed in the nervous system, as well as in non-excitabile cells and play fundamental roles in processes ranging from sensory physiology to male fertility. In mouse spermatogenic cells (SC), several kinds of mRNAs for TRPCs (*TRPC1–7*) have been reported [3]. As for the proteins, immunocytochemical studies suggest the presence of TRPC1, 3 and 6 in the mature mouse sperm [3]. In addition, the presence of TRPC2 has been also detected in mouse sperm and shown to functionally mediate Ca^{2+} influx during the acrosome reaction (AR) [4]. In mouse, the AR is triggered by ZP3, a glycoprotein of the egg's *zona pellucida* (ZP), causing a transient Ca^{2+} influx into sperm through voltage-gated T-type Ca^{2+} channels. This initial response promotes a sustained increase in Ca^{2+} that drives the AR [5]. TRPC2 has been proposed to participate in the sustained sperm Ca^{2+} influx triggered by ZP3 [4]. Other TRPCs or unknown subunits may substitute for TRPC2 since *TRPC2*^{-/-} mutant mice are fertile [6]. It is worth mentioning that the human *TRPC2* gene appears to be a pseudogene, considering that several expressed sequence-tagged clones (ESTs) show early stop codons [7].

Interestingly, it has been found that TRPC channels are not only localized to the sperm head, but several of these proteins are present in the flagellum, suggesting that they may serve sperm to regulate important Ca^{2+} -dependent events in addition to the AR. Although the function of the different TRPC channels in the sperm flagellum is unknown, it has been speculated that they could participate in significant events for fertilization such as the initiation of motility (activation) and hyperactivation [3]. It is well known that Ca^{2+} , acting directly on the flagellum axoneme, is a key regulator of sperm motility and hyperactivation [8], however the mechanism by which Ca^{2+} reaches the axoneme to modulate motility has not been identified. In this report, we show that TRPC Ca^{2+} -permeable channels are expressed and differentially localized to the mature human sperm head and importantly to the flagellum, therefore they may influence flagellar movement.

*Corresponding author. Fax: (52)-73-17 23 88.

E-mail address: darszon@ibt.unam.mx (A. Darszon).

¹ These authors contributed equally.

This is consistent with alterations in the swimming characteristics of sperm induced by TRPC channel antagonists.

2. Materials and methods

2.1. Ejaculates

Human sperm were obtained from normal fertile volunteers who had authorized the use of their semen following an appropriate routine of donation. The experimental design complied with the precepts of the Helsinki Declaration (1975).

2.2. Ribonucleic acid (RNA) extraction and polymerase chain reaction (PCR)

Total RNA was isolated from the ejaculate of normozoospermic volunteers using Trizol reagent (Gibco BRL) and cDNA was synthesized using the Superscript first strand synthesis system (Invitrogen) for reverse transcription (RT)-PCR according to the manufacturer's instructions. Specific primers for TRPC channels were designed based on coding sequences, and the predicted sizes of the fragments are shown in Table 1. The typical PCR temperature profile was 40 cycles of amplification (94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 30 s), and a final extension at 72°C for 3 min. The PCR products were separated on agarose gels, purified and sequenced. Sequence identities were established by searching the databases using the NCBI BLAST programs.

2.3. Indirect immunofluorescence (IF)

Sperm immunolocalization of TRPC channels was assessed by fluorescence microscopy as previously described [3]. In brief, human sperm were fixed in 5% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) and then attached to Teflon printed glass slides coated with a bioadhesive. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min and incubated for at least 30 min in a blocking solution. Samples were then incubated overnight at room temperature with primary antibodies at a 1:200 dilution (or 1:50 for TRPC6). Samples were next incubated for 1 h at room temperature with Alexa594 or Alexa488 (Molecular Probes Inc.) conjugated secondary antibody. Sperm were examined by confocal fluorescence and phase contrast microscopy.

2.4. Sample preparation and transmission electron microscopy (EM)

Sperm were fixed in a 4% paraformaldehyde–0.5% glutaraldehyde solution in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3) for 2 h and stored at 4°C until processed. Cells were dehydrated in 50% ethanol for 20 min and then in 60–100% ethanol. The final pellet was embedded in LR white resin (Electron Microscopy Sciences) 5 days at 50°C. Ultrathin sections were cut and mounted onto nickel grids. Sections were first incubated in a blocking solution containing 5% fetal bovine serum and 0.005% Tween 20, and then incubated overnight with TRPC channel-specific primary antibodies (Alomone Labs) diluted 1:20 in PBS. Subsequently, samples were incubated 1 h with a goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:40) conjugated to 20 nm colloidal gold particles (ZYMED). The sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and then examined using a Phillips EM-201 electron microscope.

2.5. Swim-up preparation and evaluation of sperm motility

After liquefaction, 1 ml of Ham's F-10 was applied to 1 ml of semen, after 1 h incubation at 37°C, the upper layer of the medium was separated. The concentration of the cell suspension was adjusted to 8–12 × 10⁶ cells/ml. Video-recording of 15–20 microscopic fields of

the sperm sample was made over 1 min using phase contrast microscopy. For each sample, ~1200 motile sperm were tracked and analyzed with the Hamilton–Thorne HTM-IVOS-12 computer-assisted semen analysis (CASA) system. Thirty frames were acquired at a frame rate of 60 Hz. Sperm motility parameters measured included progressive velocity (VSL; the straight-line distance from the beginning to the end of each sperm's track divided by the time elapsed, expressed in μm/s), the path velocity (VAP; the total distance along the smoothed average path for each sperm divided by the time elapsed, in μm/s), the curvilinear velocity (VCL; the track speed, or total distance covered by each sperm divided by the time elapsed, in μm/s), amplitude of lateral head displacement (ALH, in μm), beat cross frequency (BCF, in Hz) and the derived parameters of linearity (LIN = VSL/VCL × 100%) and straightness (STR = VAP/VCL × 100%). TRPC blockers were prepared as 100 mM stock solutions in distilled water (Ni²⁺, Cd³⁺ and SKF96365) or dimethyl sulfoxide (DMSO) (2-aminoethoxydiphenyl borate; 2-APB).

3. Results

AR in mammals is triggered during gamete contact and causes a transient Ca²⁺ entry into sperm through voltage-gated (Ca_v) channels which is followed by a second Ca²⁺ influx that promotes a sustained increase in Ca²⁺_i. Mammalian TRPCs have emerged as candidates for the ion channels that mediate this sustained Ca²⁺ influx, however their expression and cell distribution have not been established in human sperm [9]. Therefore, it seemed necessary to determine which members of the TRPC channel family are present in these cells.

Sperm are small differentiated terminal cells unable to synthesize proteins; all their ion channels are made during spermatogenesis. SC are being used to study sperm ion channels since they are larger and molecular biology techniques can be applied [9]. Obtaining human SC is difficult [10], however, semen from fertile men contains ~5% non-sperm cells (called round cells) [11] > 20 × 10⁶ cells/ml, there are at least 1 × 10⁶/ml round cells. More than 94% of the round cells in human ejaculates are germinal and those remaining are epithelial and blood cells [12]. Thus, the mRNAs found in ejaculates are derived mainly from the SC since mature sperm have only a few mRNAs [13]. Here, a set of oligonucleotides (Table 1) was designed to amplify the six different known mammalian TRPC genes from human ejaculates (*hTRPC2* is a pseudogene) using RT-PCR. Fig. 1 shows a 1% agarose gel with ethidium bromide staining of the PCR products for *TRPC1*, 3, 6, and 7 from human ejaculate cDNA. The PCR products were sequenced, and the identities of the amplicons were verified by database homology searches. These data indicate that multiple TRPC genes are expressed in human SC.

We used antibodies against TRPC1, 3, 4 and 6, whose specificity has been tested previously [3,9], to investigate their expression at the protein level in human sperm. Fig. 2A shows a confocal IF image of human sperm treated with antibodies

Table 1
Sets of primers designed to amplify TRPC homologues from human SC

Gene	Forward primer 5'–3'	Reverse primer 5'–3'	T _m (°C)/size (bp)
<i>TRPC1</i>	GCTAATGCCACGAAGT	CGTTTGGGTGAGGACA	55/471
<i>TRPC3</i>	GACATATTCAAGTTCATGGTCCTC	ACATCACTGTCATCCTCAATTC	55/323
<i>TRPC4</i>	CTGCCAATATCTCTGGGAAGA	GCTTTGTCGTGCAAATTTCC	53/411
<i>TRPC5</i>	GCTCGCAGCCACCCCAAAGGGAGGA	CCAATGTCCTACCCCTGTTCTCCCAGCTCTC	65/523
<i>TRPC6</i>	GACATCTTCAAGTTCATGGTCATA	GACATCTTCAAGTTCATGGTCATA	53/320
<i>TRPC7</i>	TGCTGTCTCAAAGGGTGC	CTGCTGACAGTTAGGGT	52/443

The predicted sizes and melting temperatures of the PCR products (T_m) are indicated on the right.

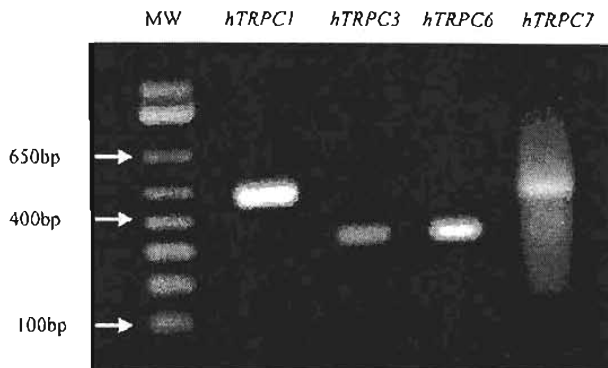


Fig. 1. RT-PCR analysis of TRPC mRNAs expression in human semen. MW, molecular weight markers; the order of the lanes is: PCR products for *hTRPC1*, 3, 6 and 7.

directed to the TRPC1 protein. As can be seen the principal piece of the flagellum is heavily stained, showing uniform fluorescence, although no fluorescent signal was detected in the sperm midpiece. Additionally, in some cells TRPC1 protein showed a ring-shaped pattern at the posterior acrosomal region in the sperm head along the equatorial segment (not shown). Both TRPC3 (Fig. 2B) and TRPC4 (Fig. 2C) gave a strong signal in the midpiece. TRPC3 heavily stained the acrosome region, sometimes with a punctuate aspect, and TRPC4 showed a weak diffuse signal in the head and the principal piece. Sperm incubated with the anti-TRPC6 showed strong staining at the midpiece, punctuate pattern in the principal piece and a weak and diffuse signal in the head (Fig. 2D). The specificity of the TRPC antisera was demonstrated by the absence of signal in sperm incubated with antisera (1:2 for TRPC1, 3 and 4; 1:6 for TRPC6) that had been pre-incubated with their corresponding peptide antigens (not shown).

To ensure expression and confirm TRPC protein localization, EM was next performed on the human sperm. Ejacu-

lated sperm were embedded and ultrathin sections were incubated with TRPC antisera followed by a secondary antibody conjugated to colloidal gold. The micrographs shown in Fig. 3 support our observations at the confocal microscopic level and illustrate that TRPC1, 3, and 4 are localized in both the heads and flagella with no specific labeling detected in the sperm nucleus. Furthermore, gold particles did not appear to be distributed in the cell interior, instead TRPC1, 3, and 4 seemed to be preferentially associated with the plasma membrane in the different regions of the cell. Control sections incubated with antibodies blocked by the peptide antigen showed only background levels of gold particles with no specific localization in the sperm. However, while the TRPC6 signal was abolished by competition with its corresponding peptide antigen in IF experiments, it was not competed in EM (not shown).

Immunofluorescence and EM images showed that TRPC channels in human sperm are strongly expressed in the flagellum, suggesting that they may serve to regulate important Ca^{2+} -dependent events in this region such as flagellar beating. Therefore, we next used a CASA system to assess the participation of TRPC channels on sperm motility using pharmacological agents that inhibit their function.

A swim-up sperm suspension was diluted in Ham's F-10 medium alone (control) or containing different concentrations of Ni^{2+} or SKF96365 and motility analyses were performed. Ni^{2+} has been shown to block the mouse sperm SOCs involved in the AR with a $K_i \sim 500 \mu\text{M}$ [5]. After 1 min incubation, 1 mM Ni^{2+} caused a $\sim 20\%$ reduction in the number of swimming cells ($K_i \sim 218 \mu\text{M}$) (Fig. 4A). In addition, this treatment decreased the following parameters in the remaining motile sperm (Fig. 4B): fast motility, VSL and LIN. Similarly, SKF96365, a blocker of TRPC channels, significantly decreased sperm motility in a dose- and time-dependent manner. Application of 20 μM SKF96365 decreased the percentage of motile sperm by $\sim 30\%$ after 1 min incubation ($P < 0.05$) and differentially affected the individual motility parameters (Fig. 4C and D). This SKF96365 concentration inhibited $68.9 \pm 9\%$

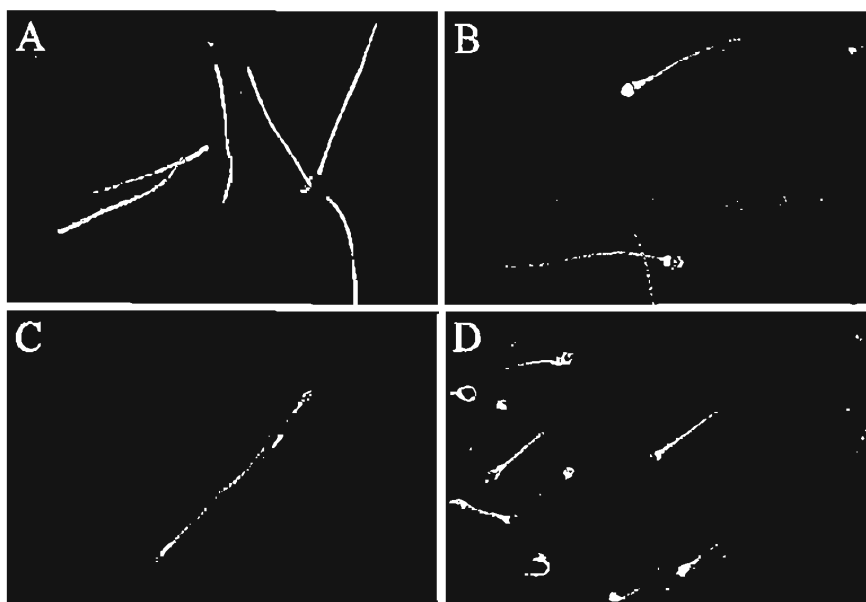


Fig. 2. Identification and immunolocalization of TRPC channels in human sperm. Confocal fluorescence images of sperm labeled with specific anti-TRPC1 (A), anti-TRPC3 (B), anti-TRPC4 (C) and anti-TRPC6 (D) antibodies illustrating the staining pattern of the proteins.

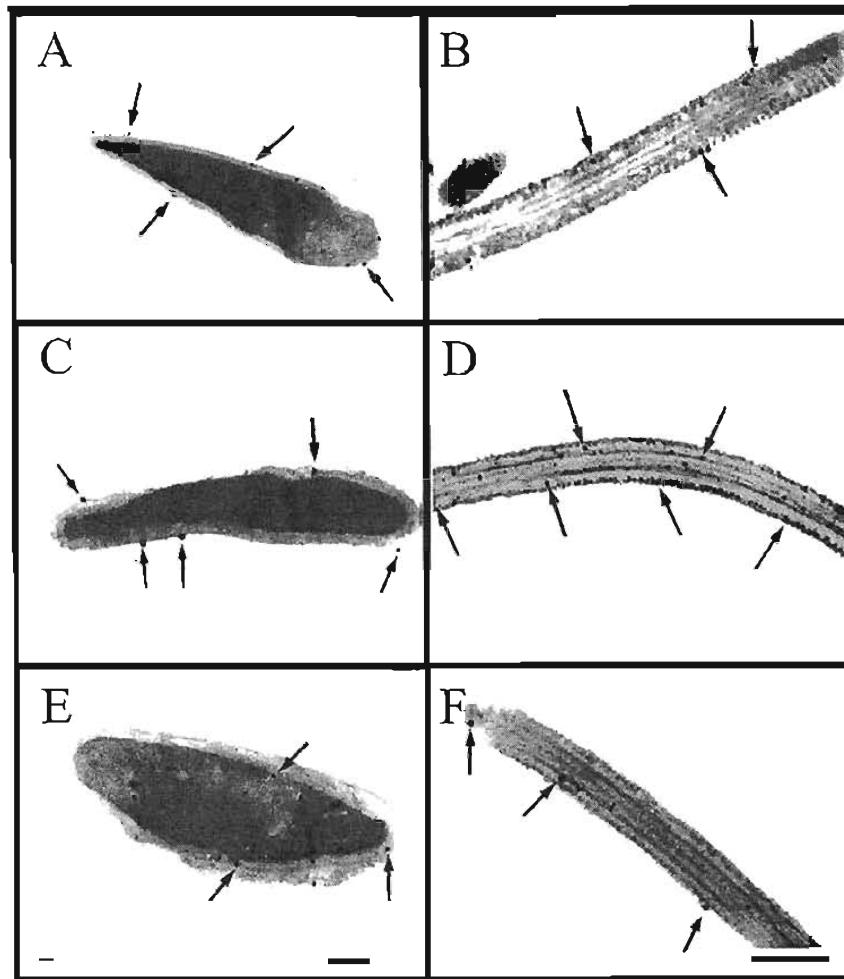


Fig. 3. Immunogold EM of TRPC channels in human sperm. Longitudinal sections showing the subcellular localization of the TRPC1 (A, B), TRPC3 (C, D) and TRPC6 (E, F) antigens in the head and principal piece of the flagellum, respectively. The arrows indicate the gold particles that label principally the periphery of the cells, though TRPC3 antibody also labeled dense fibers and the ribs of the fibrous sheath in the flagellum. Scale bars = 0.4 μm .

of the motility after a 10 min incubation (Fig. 4C). In contrast, 20 μM SKF96365 did not affect the magnitude of the voltage-gated T-type current expressed in mouse SC (3 min incubation, not shown). Lastly, we also tested the TRPC channel blockers GdCl₃ and 2-APB in the 0.5–5 and 10–75 μM range, respectively, but they proved ineffective in altering the sperm motility parameters (not shown).

4. Discussion

Diverse studies in mammalian sperm indicate that an increase in Ca^{2+}_i is critical for several physiological processes during fertilization, such as sperm motility, capacitation and AR [9]. However, little is known about the molecular identity of the pathways that regulate these events. Recently, the presence of multiple types of TRPC mammalian homologues in mouse SC and sperm was revealed [3]. A recent report indicates that SOCs regulate chemotactic behavior in ascidian sperm [14]. However, in human sperm TRPC channels have not been identified and their possible functions are yet to be defined. The findings presented here provide what is to our knowledge the first evidence for the expression of different

TRPC channels in human sperm and for their possible involvement in the motility in these cells.

Positive immunolocalization of the TRPC proteins occurred importantly in the tail region of human sperm, though in some cases the heads were also immunopositive. These data provided evidence of heterogeneity in the expression of TRPC channels in human sperm and suggested that they may participate in Ca^{2+}_i homeostasis and play several physiological roles in these cells. Our immunocytochemistry results are basically consistent with the PCR data since we were able to detect TRPC1, 3 and 6 both at the RNA and protein level. The inconsistency between the IF and EM experiments regarding TRPC6 may be due to technical problems associated with the use of a different secondary antibody. The presence of TRPC6 should be confirmed by Western blot. Although we also identified messenger for TRPC7, we could not confirm the presence of this channel in sperm due to the lack of specific antibodies. Likewise, we detected TRPC4 with antibodies but we were unable to amplify the corresponding mRNA, even though the oligonucleotides used amplified TRPC4 from mouse brain and HEK293 cells (not shown). Thus, the reason for this discrepancy is unknown; perhaps it lies within

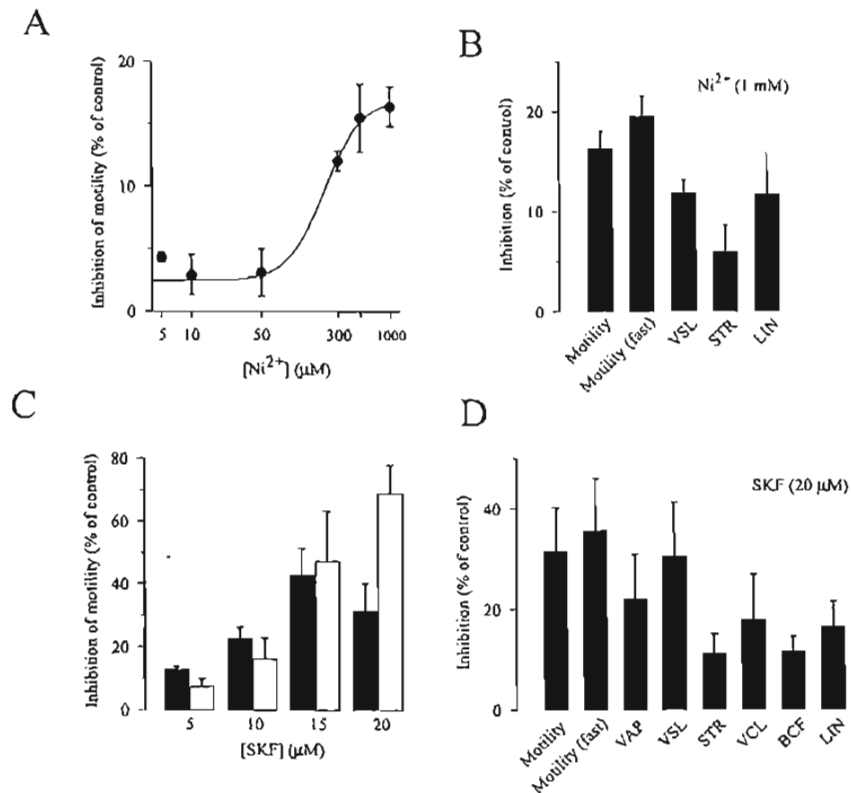


Fig. 4. CASA parameters of individual human sperm from ejaculates in the presence of TRPC inhibitors. A: Concentration-dependent inhibition of sperm motility by Ni²⁺. The inhibition curve was fitted with the Hill equation. B: The effects of the Ni²⁺ treatment on the velocity parameters of sperm classified as average and fast motility as well as VSL, STR and LIN are shown ($n=10$). C: Concentration- and time-dependent inhibition of sperm motility by SKF96365. Data represent the percentage of inhibition (mean \pm S.E.M.) after 1 (filled bars, $n=7$) and 10 min (open bars, $n=3$) of SKF96365 treatment. D: The CASA parameters of sperm classified as: average motility, fast motility, VAP, VSL, STR, VCL, BCF and LIN obtained in the presence of drug are shown. The effects of both antagonists were evaluated as the ratio between the posttreatment value and the control swim-up value ($n=7$).

the regulation of the mRNA decay [15]. Alternatively, there may be a sperm-specific TRPC4 isoform. Since we could not detect TRPC5 messenger and lacked specific antibodies for this channel, its presence needs to be explored further.

Previous studies have shown reactivity of TRPC antibodies not only in the head but also in the flagellum of mouse sperm [3] suggesting that they may be implicated in determining sperm motility. Since Ni²⁺ blocks the SOCs involved in the mouse AR (IC_{50} of ~ 500 μ M) [5], we tested its capacity to inhibit human sperm motility. We found that though mildly, Ni²⁺ affected cell motility in a dose-dependent fashion, decreasing it by $\sim 20\%$ at 1 mM and differentially altering the motility parameters of swimming sperm. Ni²⁺ at this concentration could be affecting basal Ca²⁺ through SOCs partially activated in swimming sperm. This concentration of Ni²⁺ could also influence Ca²⁺ by altering other Ca²⁺ transport systems such as the Na⁺/Ca²⁺ exchanger [16] and the other TRPCs present in the flagella. On the other hand, it seems that T-type Ca²⁺ channels which are more sensitive to Ni²⁺ [17], do not strongly affect basal sperm motility. The participation of other transporters that elevate Ca²⁺ such as non-T-type channels as well as channels from intracellular stores [18] or plasma membrane non-selective cation channels regulated by cAMP [19,20] cannot be ruled out.

To further establish the pharmacological profile of human sperm ion channels involved in motility, another TRPC block-

er, SKF96365, was tested. This compound reduced motility in a concentration- and time-dependent fashion. Remarkably, a 10 min incubation with 20 μ M SKF96365 inhibited $\sim 70\%$ of sperm motility. The estimated IC_{50} of ~ 7 μ M for this inhibition is consistent with the reported efficacy of SKF96365 to block recombinant TRPC channels (IC_{50} 5–8 μ M) [21,22]. It is worth mentioning that 20 μ M SKF96365 did not significantly affect Cav T-type channel activity recorded in mouse SC, suggesting that TRPC channels can indeed influence sperm motility.

Our findings with Ni²⁺ and SKF96365 indicate that TRPC channels may influence flagellar motility. In this scenario, the results with two other SOC antagonists, Gd³⁺ and 2-APB, present something of a paradox since they do not appear to affect sperm motility. Possibly this unexpected finding arises from the complex interactions between these two compounds and the TRPCs. Micromolar Gd³⁺ has been reported to increase TRPC4- and TRPC5-mediated currents, while mM Gd³⁺ inhibits them [23]. In addition, recombinant heterologously expressed hTRPC3 is completely insensitive to this lanthanide [24]. Likewise, 2-APB only partially inhibits some TRPC channels at concentrations as high as 100 μ M [24]. It has been speculated that these pharmacological features may result from the different modes of activation of the channels and may also reflect differences in their molecular structure. The sperm TRPC channels that modulate motility may be

different from those responsible for capacitative Ca^{2+} entry such as receptor operated, second messenger activated TRPC channels (TRPC3, 6 and 7). Alternatively it remains possible that the sperm TRPCs implicated in motility are heteromultimers with a peculiar pharmacological profile.

Recent evidence indicates that TRPC2 participates in the sustained Ca^{2+} entry during AR in mice [4]. Unexpectedly, genetic ablation of *mTRPC2* did not compromise the fertile capability of null mice [6,25]. These findings suggest that the ion channel involved in the sustained increase in Ca^{2+} necessary for the AR may be a tetramer composed of different TRPC proteins. Furthermore, in humans *TRPC2* is considered a pseudogene [26], thus TRPC1, 3, 4 and 6 present in the sperm head would be candidates to form the SOC involved in the human sperm AR.

Lastly, though the external signals that modulate sperm motility are not well understood, our observations are consistent with the known fundamental role of Ca^{2+} in motility. The balance of Ca^{2+} can be influenced by TRPC channels that have a wide range of regulatory modes. It remains for future studies to determine the exact mechanisms whereby TRPCs contribute to Ca^{2+} entry to sperm, and the role these proteins play in the regulation of cellular metabolism and responsiveness to extracellular signals during sperm motility.

Acknowledgements: This work was supported by grants from DGA-PA (UNAM) to A.D. and C.L.T.; from CONACYT to A.D. and to R.F. as well as from TWAS to R.F. and C.L.T. We thank X. Alvarado, A. Sandoval, E. Bustos, M. Olvera and A. Vega for expert technical assistance. We thank Laboratorio Clínico y de Biogenética Eugenio Sue for allowing us to use the CASA system.

References

- [1] Montell, C., Birnbaumer, L. and Flockerzi, V. (2002) *Cell* 108, 595–598.
- [2] Minke, B. and Cook, B. (2002) *Physiol. Rev.* 82, 429–472.
- [3] Treviño, C.L., Serrano, C.J., Beltrán, C., Felix, R. and Darszon, A. (2001) *FEBS Lett.* 509, 119–125.
- [4] Jungnickel, M.K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J.R. and Florman, H.M. (2001) *Nat. Cell Biol.* 3, 499–502.
- [5] O'Toole, C.M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R.A. and Florman, H.M. (2000) *Mol. Biol. Cell* 11, 1571–1584.
- [6] Leypold, B.G., Yu, C.R., Leinders-Zufall, T., Kim, M.M., Zufall, F. and Axel, R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6376–6381.
- [7] Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E. and Birnbaumer, L. (1996) *Cell* 85, 661–671.
- [8] Ho, H.C. and Suarez, S.S. (2001) *Reproduction* 122, 519–526.
- [9] Darszon, A., Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T. and Treviño, C.L. (2001) *Dev. Biol.* 240, 1–14.
- [10] Jagannathan, S., Punt, E.L., Gu, Y., Arnoult, C., Sakkas, D., Barratt, C.L. and Publicover, S.J. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 8449–8456.
- [11] Fishel, S., Green, S., Hunter, A., Lisi, F., Rinaldi, L., Lisi, R. and McDermott, H. (1997) *Hum. Reprod.* 12, 336–340.
- [12] Auroux, M., Collin, C. and Couvillers, M.L. (1985) *Arch. Androl.* 14, 73–80.
- [13] Ostermeier, G.C., Dix, D.J., Miller, D., Khatri, P. and Krawetz, S.A. (2002) *Lancet* 360, 772–777.
- [14] Yoshida, M., Ishikawa, M., Izumi, H., De Santis, R. and Morisawa, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 149–154.
- [15] Guhaniyogi, J. and Brewer, G. (2001) *Gene* 265, 11–23.
- [16] Egger, M., Ruknudin, A., Niggli, E., Lederer, W.J. and Schulze, D.H. (1999) *Am. J. Physiol.* 276, C1184–C1192.
- [17] Lee, J.H., Gomora, J.C., Cribbs, L.L. and Perez-Reyes, E. (1999) *Biophys. J.* 77, 3034–3042.
- [18] Ho, H.C. and Suarez, S.S. (2001) *Biol. Reprod.* 65, 1606–1615.
- [19] Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L. and Clapham, D.E. (2001) *Nature* 413, 603–609.
- [20] Wennemuth, G., Carlson, A.E., Hasper, A.J. and Babcock, D.F. (2003) *Development* 130, 1317–1326.
- [21] Zhu, X., Jiang, M. and Birnbaumer, L. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 133–142.
- [22] Halaszovich, C.R., Zitt, C., Jungling, E. and Luckhoff, A. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 37423–37428.
- [23] Jung, S., Muhle, A., Schaefer, M., Strotmann, R., Schultz, G. and Plant, T.D. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 3562–3571.
- [24] Trebak, M., Bird, G.S., McKay, R.R. and Putney Jr., J.W. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 21617–21623.
- [25] Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C. and Koentges, G. (2002) *Science* 295, 1493–1500.
- [26] Vannier, B., Peyton, M., Boulay, G., Brown, D., Qin, N., Jiang, M., Zhu, X. and Birnbaumer, L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2060–2064.

Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca^{2+} channels in mammalian male germ cells and sperm

Claudia L. Treviño^{a,1}, Ricardo Felix^b, Laura E. Castellano^a, Carolina Gutiérrez^a, Delany Rodríguez^a, Judith Pacheco^{c,d}, Ignacio López-González^a, Juan Carlos Gomora^e, Victor Tsutsumi^d, Arturo Hernández-Cruz^e, Tatiana Fiordelisis^e, Allison L. Scaling^f, Alberto Darszon^{a,*}

^aDepartment of Genetics of Development and Molecular Physiology, Institute of Biotechnology, UNAM, Avenida Universidad #2001, Col. Chamilpa, CP 62210, Cuernavaca, Mor., Mexico

^bDepartment of Physiology, Biophysics and Neuroscience, Cinvestav-IPN, Mexico City, Mexico

^cSchool of Medicine, La Salle University, Mexico City, Mexico

^dDepartment of Experimental Pathology, Cinvestav-IPN, Mexico City, Mexico

^eDepartment of Biophysics, Institute of Cell Physiology, UNAM, Mexico City, Mexico

^fDepartment of Chemistry and Biochemistry, New Mexico State University, Las Cruces, NM, USA

Received 16 February 2004; accepted 24 February 2004

First published online 16 March 2004

Edited by Maurice Montal

Abstract Numerous sperm functions including the acrosome reaction (AR) are associated with Ca^{2+} influx through voltage-gated Ca^{2+} (Ca_V) channels. Although the electrophysiological characterization of Ca^{2+} currents in mature sperm has proven difficult, functional studies have revealed the presence of low-threshold (Ca_V3) channels in spermatogenic cells. However, the molecular identity of these proteins remains undefined. Here, we identified by reverse transcription polymerase chain reaction the expression of $\text{Ca}_V3.3$ mRNA in mouse male germ cells, an isoform not previously described in these cells. Immunofocal microscopy revealed the presence of the three Ca_V3 channel isoforms in mouse spermatogenic cells. In mature mouse sperm only $\text{Ca}_V3.1$ and $\text{Ca}_V3.2$ were detected in the head, suggesting its participation in the AR. $\text{Ca}_V3.1$ and $\text{Ca}_V3.3$ were found in the principal and the midpiece of the flagella. All Ca_V3 channels are also present in human sperm, but only to a minor extent in the head. These findings were corroborated by immunogold transmission electron microscopy. Tail localization of Ca_V3 channels suggested they may participate in motility, however, mibefradil and gossypol concentrations that inhibit Ca_V3 channels did not significantly affect human sperm motility. Only higher mibefradil doses that can block high-threshold (HVA) Ca_V channels caused small but significant motility alterations. Antibodies to HVA channels detected $\text{Ca}_V1.3$ and $\text{Ca}_V2.3$ in human sperm flagella.

© 2004 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Ca^{2+} channel; Acrosome reaction; Sperm motility; Gossypol; Mibefradil

1. Introduction

Sperm motility, capacitation and the acrosome reaction (AR) are fundamental processes for fertilization [1–4]. The

effects of certain physiological agonists of these processes are mediated by changes in the intracellular concentration of Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) [1–5]. In particular, the mouse AR is associated with a zona pellucida-induced fast transient $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase (~250 ms) involving the activation of low-threshold activated (LVA or T-type) Ca^{2+} channels which is followed by a sustained increase lasting minutes that is linked to store-operated channel (SOC) opening [6]. In spite of the crucial role of LVA channels in sperm physiology [3,7,8], their definitive molecular identification and localization remains elusive. This issue is further complicated by reports indicating that high-threshold activated (HVA) channels are also present and functional in mammalian spermatogenic cells and mature sperm [9].

The inability of sperm to synthesize proteins impedes the use of standard molecular approaches. Their minute size, complex geometry and motile nature have precluded a systematic electrophysiological characterization. For these reasons, more recent efforts have focused on the germ-line cells, the progenitors of sperm [3,7,8]. Three different classes of LVA Ca^{2+} channels (known as $\text{Ca}_V3.1$ – $\text{Ca}_V3.3$) have been cloned and expressed [10–12]. The presence of mRNAs for $\text{Ca}_V3.1$ and $\text{Ca}_V3.2$, but not for $\text{Ca}_V3.3$, has been previously documented in mouse [13,14] and human [15] spermatogenic cells. None of these channels has been immunolocalized in sperm. Very recently, using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) the expression of the mRNAs for all Ca_V3 channels in motile human sperm was detected [16]. Here, we report the detection of a transcript for $\text{Ca}_V3.3$ from mouse male germ cells and the distribution of the different low-threshold Ca^{2+} channel proteins in mouse spermatogenic cells and mature mouse and human sperm. Consistent with the expression of different low-threshold Ca^{2+} channel proteins, Ni^{2+} inhibition of whole-cell patch-clamp native currents in mouse spermatogenic cells unveiled the presence of subtypes of Ca_V3 channels in these cells.

Lastly, since $\text{Ca}_V3.2$ and $\text{Ca}_V3.3$ channels are expressed prominently in sperm flagella, studies were carried out to explore their involvement in motility. Although gossypol had previously been shown to inhibit motility in human sperm

*Corresponding author. Fax: (52777) 3172388.

E-mail address: darszon@ibt.unam.mx (A. Darszon).

¹ Present address: Department of Chemistry and Biochemistry, New Mexico State University, Las Cruces, NM, USA.

[17], our results using computer-assisted sperm motility analysis (CASA) showed that concentrations of mibefradil [11] and gossypol [18] that inhibit low-threshold Ca^{2+} channels in mouse spermatogenic cells did not reduce basal motility. Other Ca^{2+} -permeable channels like Catsper and SOCs have been shown to modulate this important function [19–21]. Higher mibefradil concentrations that can block L-type HVA channels inhibited sperm motility and antibodies to HVA channels detected Cav1.2 and Cav2.3 in human sperm flagella. However, other blockers of L-type channels such as nifedipine and calciseptine did not significantly affect sperm basal motility.

2. Materials and methods

2.1. RT-PCR

The isolation of RNA from mouse spermatogenic cells, preparation of cDNA and RT-PCR were conducted as described previously [22,23]. The PCR primers employed were: sense 5'-ATCTGCTCCCTGTGG-3' and antisense 5'-GAGAAGTGGTGGCTATG-3'. The conditions employed were as follows: after an initial treatment for 5 min at 94°C, the following cycle was repeated 40 times: 30 s at 94°C, 1 min at 54°C, and 1 min at 72°C. Final extension was 5 min at 72°C. cDNA fragments amplified by PCR were analyzed in a 1% agarose gel: the expected size for the PCR product corresponding to Cav3.3 was 404 bp.

2.2. Immunolocalization of Ca^{2+} channels in spermatogenic cells and sperm

2.2.1. Controls (not shown). HEK-293 cells stably expressing α_{1G} (Cav3.1), α_{1H} (Cav3.2) and α_{1I} (Cav3.3) channels [24] were used to determine the specificity of the primary antibodies (anti-Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3 from Santa Cruz Biotechnology, and anti-Cav3.1 from Alomone Labs). Anti-Cav3.2 and anti-Cav3.3 gave quite specific signals that were competed by the corresponding antigen in the cells expressing the matching channel isoform. Anti-Cav3.1 from Santa Cruz had some cross reaction with Cav3.3 and was competed by its corresponding antigen in HEK-293 cells expressing Cav3.1 or Cav3.3. Anti-Cav3.1 from Alomone was specific for HEK-293 cells expressing Cav3.1. In addition, the specificity of the antibodies was evaluated in mouse and human sperm using antibodies preadsorbed with the synthetic antigenic peptides (1:2–1:8 antibody:peptide ratios). In human sperm antibodies were further tested for specificity by showing that only the corresponding peptide antigen, and not the others, competed antibody binding.

2.2.2. Spermatogenic cells. Aliquots of mouse spermatogenic cells were obtained and processed as described previously [22,23]. After fixation with 5% paraformaldehyde and permeabilization with 0.1% Triton X-100, cells were incubated overnight with primary T-type Ca^{2+} channel polyclonal antibodies (1:100 dilution) and then for 1 h with Alexa 594-conjugated secondary antibodies (1:100; Molecular Probes).

2.2.3. Mouse sperm. Cells were collected from CD1 mouse epididymis. Sperm were separated into two groups: (i) non-capacitated, handling cells in non-capacitating medium (Medium 199 without bovine serum albumin, HCO_3^- and Ca^{2+}), and (ii) acrosome-reacted, where sperm after capacitation (30 min at 37°C in capacitating medium) were incubated with the Ca^{2+} ionophore A23187 (15 μ M). Aliquots of these cells were fixed with 5% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100 and incubated overnight at 4°C with primary antibodies at 1:100 dilution. Lastly, samples were incubated for 1 h with the Alexa 594-conjugated antibody (1:100). Images were acquired in a confocal microscope using Comos 7.0 and analyzed using Confocal Assistant software 4.02 (Bio-Rad Microscience).

2.2.4. Human sperm. Semen was obtained from normal, fertile volunteers by masturbation after at least 2 days of abstinence. Samples were subjected to swim-up preparation (see below) and used for indirect immunofluorescence analysis as described above for mouse sperm. Control experiments were also processed as indicated for mouse samples (corresponding peptides at 1:4, 1:2 and 1:8 ratios were used for anti-Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3, respectively). HVA channel antibodies against Cav1.2, Cav1.3, Cav2.1, Cav2.2, and

Cav2.3 were from Alomone Labs, and they were diluted 1:100 (corresponding peptides were used at 1:2 ratio, except for the Cav1.3 peptide that was used at 1:4).

2.2.5. Immunogold transmission electron microscopy. Human sperm were fixed in a 4% paraformaldehyde–0.5% glutaraldehyde solution in 100 μ M cacodylate buffer (pH 7.3) for 2 h and stored until processed. Cells were dehydrated in 20% ethanol for 20 min and then in 40–100% ethanol. The final pellet was embedded in LR-White resin for 5 days at 50°C. Ultrathin sections were mounted on nickel grids. Samples were first incubated in a blocking solution containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.005% Tween 20, and then incubated overnight with Cav3 channel primary antibodies diluted 1:25 in phosphate-buffered saline–3% FBS. Subsequently, samples were incubated for 1 h with a rabbit anti-goat IgG secondary antibody (1:30) conjugated to 10 nm colloidal gold particles (Sigma). The sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and then examined using a Jeol 100SX electron microscope.

2.3. Electrophysiology

Ca^{2+} currents were recorded in spermatogenic cells using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique as described previously [13]. Briefly, cells were bathed in a solution containing (in mM): $CaCl_2$ 10; NaCl 130; KCl 3; $MgCl_2$ 2; $NaHCO_3$ 1; NaH_2PO_4 0.5; HEPES 5; glucose 10 (pH 7.3). The internal solution consisted of (mM): $CsMeSO_3$ 110; CsF 10; CsCl 15; $CaCl_2$ 4.6; EGTA 10; HEPES 5; ATP- Mg_2 4; phosphocreatine 10 (pH 7.3). Currents were sampled at 10 kHz and recorded (following filtering 5 kHz) by a patch-clamp amplifier (Axopatch 200A; Axon Instruments) interfaced to a personal computer via an A-to-D board (DigiData 1200A; Axon) using computer-driven software (pCLAMP 6.0.3; Axon). Capacity transients were electronically compensated, and linear leak and residual capacity currents were subtracted on-line using a P/4 protocol.

2.4. Evaluation of human sperm motility

After liquefaction, 1 ml of Ham's F-10 was applied to 1 ml of semen to allow the motile sperm to swim up into the upper layer of the suspension (1 h at 37°C). Swim-up sperm were collected, adjusted to $8\text{--}12 \times 10^6$ cells/ml and their motility determined as previously described [19]. For each sample, ~ 1000 motile sperm were tracked and analyzed with the Hamilton-Thorne HTM-IVOS-12 CASA system. Sperm motility parameters measured included progressive velocity (VSL), path velocity (VAP), and curvilinear velocity (VCL), as well as amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), linearity ($LIN = VSL/VCL \times 100\%$) and straightness ($STR = VSL/VAP \times 100\%$). Ca^{2+} channel antagonists were prepared as 100 mM stock solutions in deionized water (mibefradil and calciseptine) or dimethylsulfoxide (gossypol and nifedipine).

3. Results and discussion

Mouse spermatogenic cells functionally express mainly T-type currents, and RT-PCR studies have indicated the expression of two different genes encoding T-type channels (Cav3.1 and Cav3.2) in both mouse and human male germ cells [13–15]. However, the expression of the third member of the Cav3 family had not been determined. Our PCR experiments using specific primers generated a band of 404 bp, which was confirmed by sequencing to be a fragment of the mouse Cav3.3 channel (Fig. 1A). The RNA expression of this isoform had been shown to be restricted to the brain [12,25], but recently its presence was also found in human ejaculates [16].

Given that mRNAs for the three T-type Ca^{2+} channels are present in mouse spermatogenic cells, it became necessary to establish whether the proteins are also expressed in these cells and in mature sperm. To this end, specific polyclonal antibodies against both N- and C-terminal sequences of Cav3 channels were used. Most of the results shown in both immature germ cells and mature sperm were obtained with antibodies against the C-terminus, however qualitatively similar findings were observed with the N-terminus antibodies. Con-

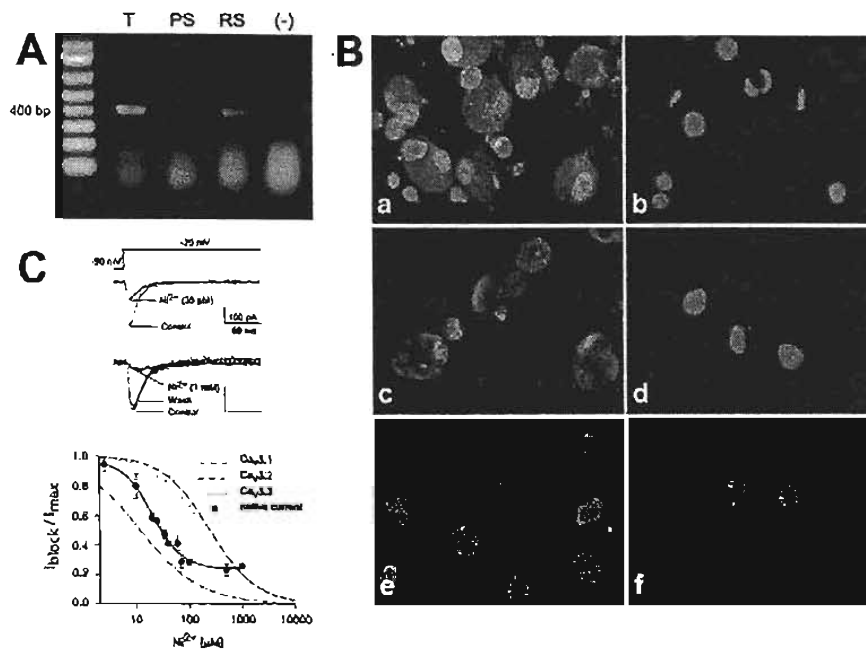


Fig. 1. Cav3 proteins are expressed in spermatogenic cells. A: RNA was extracted from spermatogenic cells and subjected to RT-PCR with specific primers based on the sequence of Cav3.3. Lanes 2–4 show PCR products generated from mouse testis (T), pachytene spermatocytes (PS), and round spermatids (RS), respectively. Lane 5 is a negative control (–). The product was sequenced to verify specific amplification. Molecular weights of the standards are shown on the left. B: Representative confocal micrographs from cells immunostained with Cav3.1 (a), Cav3.2 (c) and Cav3.3 (e) channel antibodies, showing the cluster arrangement of the proteins (red), or stained with the anti-Cav3 antibodies preincubated with the corresponding antigen peptide to demonstrate that specific staining is blocked by the peptide (b, d, and f); nuclei are shown in green. C: Representative superimposed whole-cell patch-clamp Ca^{2+} current traces activated in mouse spermatogenic cells by 200 ms pulses to -20 mV from a holding potential of -90 mV (upper panel) before and after application of $35 \mu\text{M}$ and 1 mM Ni^{2+} . The lower panel shows the dose–response analysis of Ni^{2+} blockade. Following exposure to the indicated concentration of the inhibitor, peak current amplitude was normalized to the control. The percentage of inhibition is compared with that obtained from HEK-293 cells expressing Cav3.1, Cav3.2 or Cav3.3. Smooth curves were generated with the Hill equation according to the parameters reported from currents through the cloned channels [24]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

focal immunoinages of spermatogenic cells incubated with anti-Cav3 antibodies revealed a punctate pattern of fluorescence possibly indicating clusters of channels at the plasma membrane, or intracellular accumulation of channel protein (Fig. 1B). The strongest signal was observed with the Cav3.1 antibody (Fig. 1Ba). Nuclei, shown in green due to staining with SYTOX Green, excluded immunostaining. Likewise, practically no signal was detected when the antibodies were preincubated with their corresponding antigen peptide (Fig. 1Bb,d,f), demonstrating that the staining shown in panels a, c, and e is specific.

Consistent with the expression of different Cav3 proteins, the dose–response analysis for Ni^{2+} blockade performed on native Ca^{2+} currents in mouse spermatogenic cells revealed the presence of subtypes of low-threshold channels. Representative whole-cell patch-clamp recordings (Fig. 1C, upper panel) indicated that the IC_{50} for Ni^{2+} blockade was $\sim 21 \mu\text{M}$ (Fig. 1C, lower panel). In contrast, as reported by Lee and colleagues [24], the Ni^{2+} IC_{50} for Cav3.2 is $\sim 12 \mu\text{M}$ and the IC_{50} values determined for Cav3.1 and Cav3.3 are ~ 20 -fold higher. Considering the data in recombinant channels, the potency of Ni^{2+} in spermatogenic cells is intermediate. These results, analyzed as indicated by Lee et al. [24], suggest that the native current may arise from the activity of different types of low-threshold channels, with Cav3.2 contributing around 60%.

We next examined the expression of Cav3 channels in mature mouse sperm. Although our results for Cav3.1 were in-

conclusive with the anti- α_{1G} antibody from Santa Cruz, the use of a new polyclonal anti-Cav3.1 antibody (Alomone Labs) corroborated specific immunostaining in the head (50% of sperm) and principal flagellar piece (Fig. 2A). Fig. 2B also shows illustrative confocal images before (left) and after induction of the sperm AR with a Ca^{2+} ionophore (right). Panel Ba illustrates that Cav3.2 immunoreactivity was confined to the head overlying the acrosome. Upon AR the Cav3.2 signal did not undergo redistribution and remained associated with the head. However, this process decreased fluorescence staining giving a vesiculated pattern (panel Bb) consistent with the formation of hybrid vesicles [26]. Panel Bc shows that the Cav3.3 channel is located in the flagellar midpiece and not in the head or the principal piece of the tail. As anticipated its distribution was unchanged in acrosome-reacted sperm (panel Bd). Controls discussed in Section 2 using anti-Cav3 antibodies on HEK-293 cells separately expressing the three Cav3 channel isoforms indicate that the staining illustrated in Fig. 2 is specific.

Thereafter we sought to determine the expression of T-type channels in human sperm. As in the case of mouse sperm, expression of Cav3.1 in human sperm could not be confidently determined with the Santa Cruz antibody since immunostaining was not fully blocked by the corresponding antigen peptide. However, anti-Cav3.1 from Alomone gave specific binding in the head as well as in the mid and principal pieces of the tail (Fig. 3Aa). The Cav3.2 antibody recognized the principal piece with an intense punctate signal and excluded

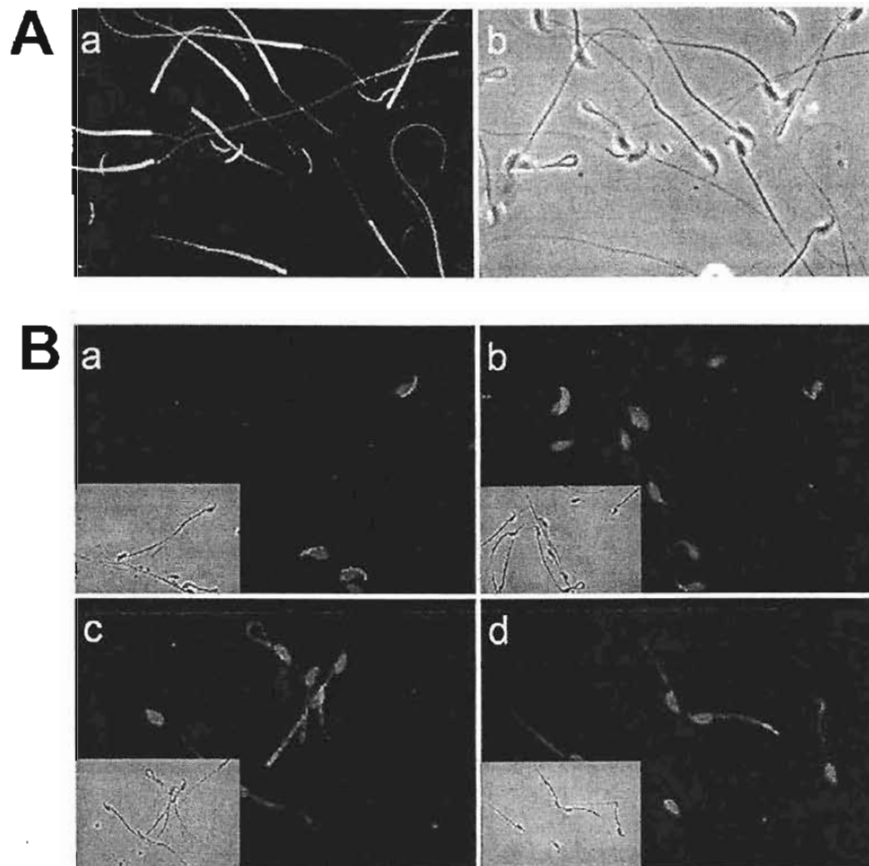


Fig. 2. Cav3 proteins are expressed and differentially localized in mouse epididymal sperm. Cells were attached to glass slides, and subjected to indirect immunofluorescence. A: Shown are confocal immunofluorescence images of mature sperm stained with anti-Cav3.1 antibodies (panel a). Panel b shows the corresponding phase contrast image. B: Cav3 confocal immunofluorescence images in mouse sperm before and after undergoing the AR. Paired phase contrast (inset) and fluorescence micrographs of anti-Cav3.2 and Cav3.3 in acrosome-intact (a, c) and acrosome-reacted sperm (b, d). Nuclei are shown in green. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the end piece of the flagellum (Fig. 3Ab). In addition, a faint Cav3.2 immunofluorescent signal was noted in the base of the human sperm head. On the other hand, the fluorescent signal for Cav3.3 (N-terminal antibody) was restricted to the mid-piece of the flagellum (as in mouse sperm) (Fig. 3Ac). Binding of the Cav3 antibodies was competed only by the corresponding peptide antigen but not by the other peptides (not shown), thus indicating their specificity. To our knowledge this is the first evidence for the localization of Cav3 channels in human sperm.

Cav3 protein expression and localization in human sperm was corroborated using transmission electron microscopy. Ultrathin sections from embedded cells were incubated with the Cav3 antibodies followed by a secondary antibody conjugated to colloidal gold. Control sections showed only background levels of gold particles with no specific sperm localization. The micrographs in Fig. 3B show that gold particles were preferentially associated with tail plasma membrane, less in the head and rarely in the cell interior. The lower abundance of Cav channel in the head and specifically Cav3.1 found with this technique may help to explain our difficulty to detect these channels by immunofluorescence.

Given that Cav3 channels are present in the human sperm flagella, we tested whether two T-type channel inhibitors, mibefradil [11,27,28] and gossypol [18], influence motility. To

this end, a post-swim-up sperm suspension was diluted in culture medium in the absence or presence of different concentrations of the channel antagonists and motility was analyzed using CASA. Interestingly, concentrations of these two compounds that inhibit Cav3 channels only reduced basal motility by < 3% after 1 min, in agreement with our previous findings with low Ni^{2+} concentrations (50 μM) that block these channels [19]. These observations indicate that Cav3 channels essentially do not influence the basal motility of human sperm. However, higher doses of mibefradil (30 μM) and gossypol (40 μM) that block HVA channels decreased human sperm velocity parameters making their trajectories less progressive (Table 1). These results may explain, at least in part, why

Table 1
Effects of Cav channel antagonists on human sperm motility

CASA parameter	Mibefradil 30 μM (% inhibition)	Gossypol 40 μM (% inhibition)
Basal motility	25 \pm 8	21 \pm 6
VAP	33 \pm 9	23 \pm 6
VSL	31 \pm 10	27 \pm 5
VCL	31 \pm 5	13 \pm 8

Data are expressed as mean \pm S.E.M. ($n=3-8$ separate determinations; three different donors).

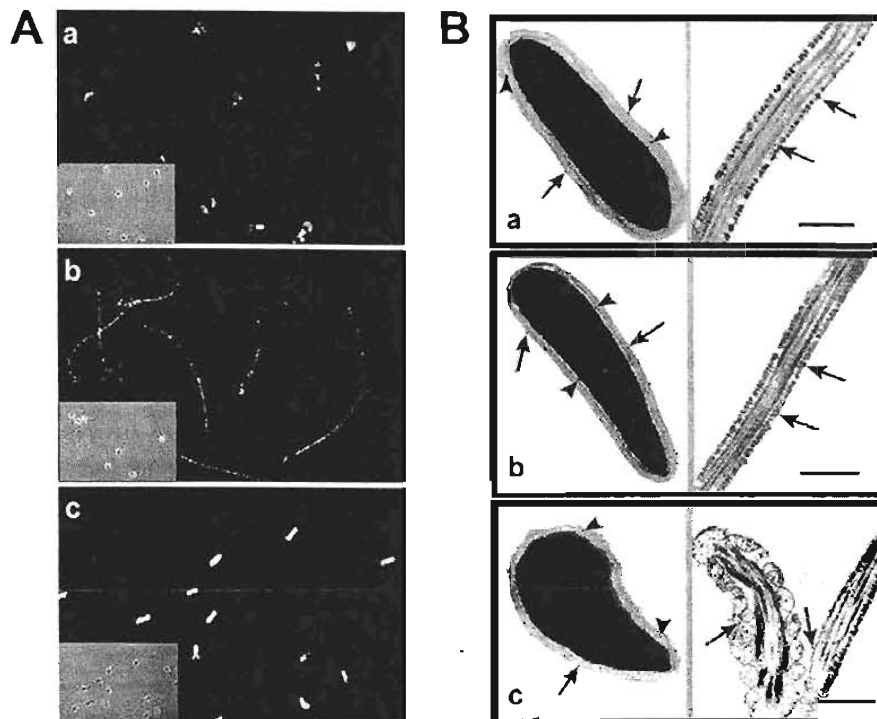


Fig. 3. Cav3 proteins are differentially expressed in human sperm. A: Representative confocal micrographs from cells stained with Cav3.1- (a), Cav3.2- (b) and Cav3.3- (c) specific antibodies showing the immunofluorescence localization of the proteins. Insets represent the corresponding phase contrast images. B: Immunogold electron microscopy detected Cav3 channels in human sperm. Ultrathin sections of human sperm were incubated with Cav3.1 (a), Cav3.2 (b) and Cav3.3 (c) antibodies. Gold particles (arrows) are associated with the plasma membrane of the sperm head (left panel of each figure). In longitudinal flagellar sections, gold labeling is observed associated with the plasma membrane as well as in the ribs of the fibrous sheath at the principal piece (right panel of each figure). Cav3.3 antibody labeled the mitochondrial sheath at the midpiece of the flagellum (c). Scale bar = 0.5 μ m.

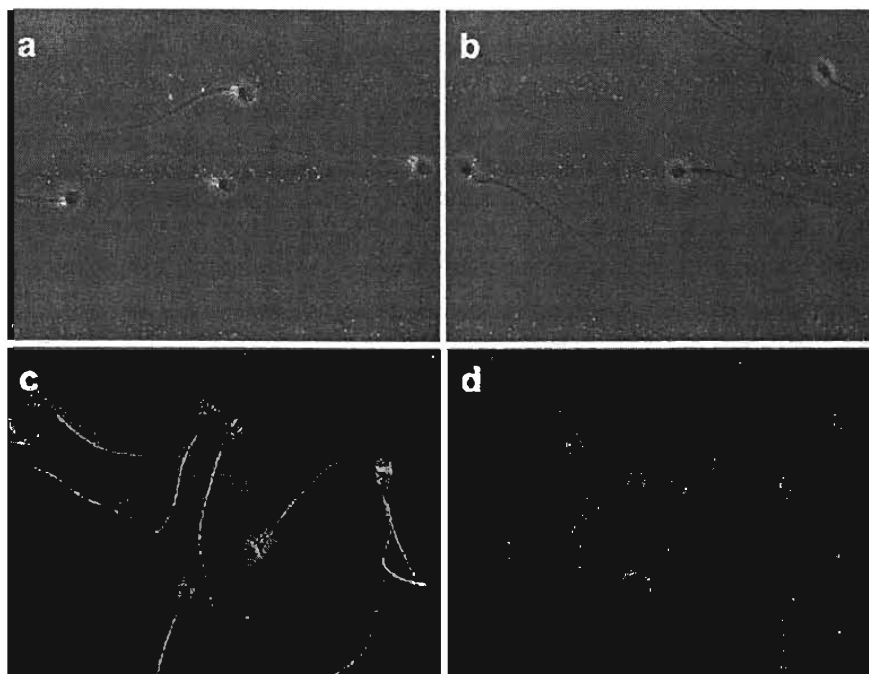


Fig. 4. Cav1.2 and Cav2.3 channels are present in human sperm. Representative confocal micrographs from sperm cells immunostained with Cav1.2 antibodies (a) showing strong specific staining at the mid and the end pieces of the tail, as well as with Cav2.3 antibodies (c) showing signal in the principal piece of the flagellum and the equatorial segment of sperm head. Panels b and d are control experiments in which the antibodies were preincubated with the corresponding antigen peptide to demonstrate specificity.

gossypol and possibly mibefradil, like other Cav channel antagonists, can affect human sperm fertilizing ability [29,30].

The previous results also suggest the possible presence of HVA channels in human sperm. Cav1.2 and Cav2.1 are present in the tail of mouse sperm [21,22,31] and Cav1.2 in the acrosomal region of human sperm [32]. In our hands, specific antibodies for these channels revealed positive immunostaining for Cav1.2 strong in the midpiece and less intense in the principal piece (Fig. 4a), and for Cav2.3 in the principal piece and the equatorial segment of the head (Fig. 4b). Antibodies against Cav1.3, Cav2.1 and Cav2.2 did not produce specific signals. In spite of the presence of HVA channels in the human sperm flagella, two other blockers of Cav1 channels, nifedipine (up to 20 μ M) and calciseptine (up to 5 μ M) [33], did not significantly affect motility, ruling out an important role of Cav1 channels in this function. On the other hand, recently it was reported that a transgenic mouse lacking Cav2.3 had motility alterations [34].

In conclusion, we identified the expression of Cav3.3 mRNA in mouse male germ cells, an isoform not previously described in these cells. This study also provides what is to our knowledge the first evidence that all three types of Cav3 channels are detected in male germ cells and display differential distribution in sperm. After differentiation and maturation Cav3.1 and Cav3.2 channels are present on the mouse sperm head, indicating that they may participate in regulating acrosomal exocytosis. Recently mice deficient in Cav3.2 were found to be fertile, which suggests Cav3.1 might be enough to allow the sperm AR [36]. Interestingly, Cav3 channel activity, particularly Cav3.2, has been associated with the AR in human sperm [14,35]. Likewise, tail localization of Cav3 channels suggested they may influence sperm motility. This was also the case for Cav1.2 and Cav2.3 channels. However, blockers of Cav1 and Cav3 channels did not significantly affect basal motility, indicating they do not play a major role in this sperm function. The possibility that these channels participate in hyperactivated motility, as Catsper does [21], cannot be ruled out.

Acknowledgements. Supported by grants from CONACyT to A.D., R.F. and J.C.G.; and from DGAPA (UNAM) to A.D., J.C.G., C.L.T. and A.H.-C. and from TWAS to C.L.T. We thank X. Alvarado, R. Hernández, E. Mata, E. Bustos, A. Rondán and A. Marín for expert technical assistance. We thank also the Laboratorio Clínico y de Biogenética Eugenio Sue for allowing us to use the Hamilton-Thorne HTM-IVOS-12 sperm analysis system.

References

- [1] Suarez, S.S. and Ho, H.C. (2001) *Reproduction* 122, 519–526.
- [2] Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Matorini, M. and Forti, G. (2000) *Front. Biosci.* 5, E110–E123.
- [3] Darszon, A., Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T. and Treviño, C.L. (2001) *Dev. Biol.* 240, 1–14.
- [4] Viscconti, P.E., Westbrook, V.A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S. and Diekmann, A.B. (2002) *J. Reprod. Immunol.* 53, 133–150.
- [5] Wassarman, P.M., Jovine, L. and Litscher, E.S. (2001) *Nat. Cell Biol.* 3, E59–E64.

- [6] O'Toole, C.M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R.A. and Florman, H.M. (2000) *Mol. Biol. Cell* 11, 1571–1584.
- [7] Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T. and Espinosa, F. (1999) *Physiol. Rev.* 79, 481–510.
- [8] Jagannathan, S., Publicover, S.J. and Barratt, C.L. (2002) *Reproduction* 123, 203–215.
- [9] Wennemuth, G., Westenbroek, R.E., Xu, T., Hille, B. and Babcock, D.F. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 21210–21217.
- [10] Perez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A.E., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M. and Lee, J.H. (1998) *Nature* 391, 896–900.
- [11] Cribbs, L.L., Lee, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M. and Perez-Reyes, E. (1998) *Circ. Res.* 83, 103–109.
- [12] Lee, J.H., Daud, A.N., Cribbs, L.L., Lacerda, A.E., Pereverzev, A., Klockner, U., Schneider, T. and Perez-Reyes, E. (1999) *J. Neurosci.* 19, 1912–1921.
- [13] Espinosa, F., López-González, I., Serrano, C.J., Gasque, G., de la Vega-Beltrán, J.L., Treviño, C.L. and Darszon, A. (1999) *Dev. Genet.* 25, 103–114.
- [14] Son, W.Y., Lee, J.H., Lee, J.H. and Han, C.T. (2000) *Mol. Hum. Reprod.* 6, 893–897.
- [15] Jagannathan, S., Punt, E.L., Gu, Y., Arnoult, C., Sakkas, D., Barratt, C.L. and Publicover, S.J. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 8449–8456.
- [16] Park, J.Y., Ahn, H.J., Gu, J.G., Lee, K.H., Kim, J.S., Kang, H.W. and Lee, J.H. (2003) *Exp. Mol. Med.* 35, 285–292.
- [17] Porat, O. (1990) *Mol. Reprod. Dev.* 25, 400–408.
- [18] Bai, J. and Shi, Y. (2002) *Eur. J. Pharmacol.* 440, 1–6.
- [19] Castellano, L.E., Treviño, C.L., Rodríguez, D., Serrano, C.J., Pacheco, J., Tsutsumi, V., Felix, R. and Darszon, A. (2003) *FEBS Lett.* 541, 69–74.
- [20] Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L. and Clapham, D.E. (2001) *Nature* 413, 603–609.
- [21] Carlson, A.E., Westbrook, R.E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D.E., Hille, B., Garbers, D.L. and Babcock, D.F. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14864–14868.
- [22] Serrano, C.J., Treviño, C.L., Felix, R. and Darszon, A. (1999) *FEBS Lett.* 462, 171–176.
- [23] Treviño, C.L., Serrano, C.J., Beltrán, C., Felix, R. and Darszon, A. (2001) *FEBS Lett.* 509, 119–125.
- [24] Lee, J.H., Gomora, J.C., Cribbs, L.L. and Perez-Reyes, E. (1999) *Biophys. J.* 77, 3034–3042.
- [25] Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Daud, A., Perez-Reyes, E. and Bayliss, D.A. (1999) *J. Neurosci.* 19, 1895–1911.
- [26] Yudin, A.I., Gottlieb, W. and Meizel, S. (1988) *Gamete Res.* 20, 11–24.
- [27] Lacinova, L., Klugbauer, N. and Hofmann, F. (2000) *Gen. Physiol. Biophys.* 19, 121–136.
- [28] Perez-Reyes, E. (1999) *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 660–669.
- [29] Benoff, S., Jacob, A. and Hurley, I.R. (2000) *Hum. Reprod. Update* 6, 107–121.
- [30] Goodwin, L.O., Leeds, N.B., Hurley, I., Mandel, F.S., Pergolizzi, R.G. and Benoff, S. (1997) *Mol. Hum. Reprod.* 3, 255–368.
- [31] Westbrook, R.E. and Babcock, D.F. (1999) *Dev. Biol.* 207, 457–469.
- [32] Goodwin, L.O., Leeds, N.B., Hurley, I., Cooper, G.W., Pergolizzi, R.G. and Benoff, S. (1998) *Mol. Hum. Reprod.* 4, 215–226.
- [33] de Weille, J.R., Schweitz, H., Macs, P., Tartar, A. and Lazdunski, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2437–2440.
- [34] Sakata, Y., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Shimizu, Y., Noda, T., Aso, T. and Tanabe, T. (2002) *FEBS Lett.* 516, 229–233.
- [35] Blackmore, P.F. and Eisoldt, S. (1999) *Mol. Hum. Reprod.* 5, 498–506.
- [36] Chen, C.C., Lamping, K.G., Nuno, D.W., Barrresi, R., Prouty, S.J., Lavoie, J.L., Cribbs, L.L., England, S.K., Sigmund, C.D., Weiss, R.M., Williamson, R.A., Hill, J.A. and Campbell, K.P. (2003) *Science* 302, 1416–1418.