



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**REGULACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES
DE VOLTAJE DURANTE LA CAPACITACIÓN DE EL
ESPERMATOZOIDE HUMANO.**

Efecto de la inhibición en la actividad de tirosina cinasas sobre el incremento de calcio intracelular inducido por despolarización.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
BIÓLOGO

PRESENTA

Juan José Fraire Zamora



Los Reyes Iztacala

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Marco Tulio González Martínez, Profesor Titular de la Facultad de Medicina, UNAM.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser formadora de profesionistas capaces y útiles para el país; por ser la Máxima Casa de Estudios de Latinoamérica; por permitirme formar parte de ella, pero sobre todo, por mantenerse pública y gratuita.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por ser mi segunda casa durante todo este proceso de formación académica.

Al Programa de Alta Exigencia Académica del cual fui becario y que me abrió perspectivas y espacios para decidir mi futuro como Biólogo.

A la Dra. Tzasná Hernández por ser mi tutora, amiga y profesora, pero además, porque me ayudo en los momentos en que necesité más apoyo.

Al Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes y a las personas que me ayudaron a cumplir uno de mis más grandes logros: Dr. Ignacio Peñalosa, Dra. Patricia Bonilla, Dr. Ramón Moreno, M. en C. Carmen Álvarez, Profa. Norma Ulloa, Biol. Beatriz Urbilla y especialmente al Dr. Sergio González.

A todos los profesores que siempre impulsaron mi formación de una u otra manera, en especial a los que me trataron con aprecio y me hicieron ver mi papel como Biólogo en la sociedad: M. en C. Graciela Molina, Dra. Margarita Canales, Biol. Josefina Vázquez, Dr. Sergio González, M. en C. Martha Salcedo, Dr. Ramón Moreno, M. en C. Carmen Álvarez, Dra. Patricia Bonilla, Biol. Ma. de los Ángeles Sanabria, Dr. Saúl Flores, Biol. Arnulfo Reyes, Biol.. Asela Rodríguez, Lic. Claudia Diez y Dr. Ismael Ledesma.

A toda la banda de Biología, pero muy en especial a mis amigos con los que me la pasé chido y libramos juntos miles de batallas: Beto, Anita, Alma, Daniela, Rosy, Diana, Juan, Rocío, Israel y Mago, siempre los llevo en mi corazón.

A Yubal por compartir conmigo el honor de ser UNIVERSITARIOS.

A la Maestra Amalia, a la Profa. Micaela, al Prof. Francisco Arenas y al Prof. Jesús Gómez porque sin darse cuenta fueron un ejemplo para mí y me ayudaron a decidir mi profesión.

A todos los niños de las escuelas primarias en las que trabajé por ofrecerme siempre una sonrisa sincera, tierna y llena de dulzura, lo que me hizo todo más llevadero.

Al Dr. Marco Tulio por enseñarme tantas cosas y confiar siempre en mis capacidades.

Al Dr. Richard Cardullo por ayudarme a conocer mis capacidades y por enseñarme que después de todo el proceso, no se llega al final, sino solo al principio.

...And to all those who believed.

Dedicatoria

A ti por ser siempre mi Ángel de la Guarda, mi guía, mi ejemplo, mi razón de seguir en la batalla. A ti porque te debo todo lo que soy y lo que seré.

Te amo mamá.

A mi hermano por que siempre me demostró que lo más importante es la perseverancia y los deseos de salir adelante. Te quiero mucho.

A mi padre porque siempre me trato con respeto y amor.

A ti Dios por convertirte en algo muy importante en mi vida.

A Paco por ser como un hermano para mí.

Y a todos aquellos que se interesan por los que menos tienen. PARA TODOS TODO.

Índice.

Resumen.....	7
1. Introducción.....	8
1.1. Generalidades.....	8
1.2. Estructura del espermatozoide.....	9
1.3. Fisiología del espermatozoide.....	9
1.3.1. Motilidad e hiperactivación.....	9
1.3.2. Capacitación.....	10
1.3.2. Reacción acrosomal.....	11
2. Antecedentes.....	12
2.1. Canales de calcio dependientes de voltaje en el espermatozoide humano.....	12
3. Hipótesis.....	14
4. Objetivos.....	14
5. Metodología.....	15
5.1. Colecta y purificación de espermatozoides.....	15
5.2. Incorporación de fura-2 AM.....	15
5.3. Sistema de detección simultánea de calcio intracelular y potencial de membrana.....	16
5.4. Calibración en la detección simultánea de calcio intracelular con fura-2 y potencial de membrana con diSC3(5). Calibraciones.....	17
6. Resultados y Discusión.....	20
6.1. Efecto de la genisteina en los CCDV de los espermatozoides capacitados.....	20
6.2. Efecto de la genisteina en los CDDV estimulados por la progesterona.....	24
7. Conclusiones.....	26
8. Bibliografía.....	41

Resumen.

En la fertilización de mamíferos, el espermatozoide activa sus mecanismos de influjo de calcio para cubrir los requerimientos necesarios y llevar a cabo la capacitación y la reacción acrosomal. La capacitación es un proceso complejo en el que se activan varios sistemas de transducción de señales, entre los que destaca la activación de tirosina cinasas, permitiendo al espermatozoide presentar reacción acrosomal en respuesta a la ZP3, una glicoproteína de zona pelúcida. Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) probablemente participan en estos procesos. Se ha reportado que la capacitación aumenta la permeación de calcio a través de los CCDV. Asimismo, la progesterona, que induce un aumento en el calcio intracelular por mecanismos diferentes a la activación de CCDV, estimula la permeabilidad de los CCDV. En la presente tesis se explora la participación de tirosina cinasas en la estimulación de los CCDV inducida durante la capacitación y por acción de la progesterona. Analizando la actividad de CCDV con detectores ópticos para potencial de membrana y calcio intracelular en espermatozoides humanos, se estudio el efecto de la inhibición en la actividad de fosforilación de tirosinas sobre el aumento en la permeabilidad de los CCDV después de la capacitación, y sobre la estimulación de los CCDV por acción de la progesterona. La genisteina, un inhibidor de la actividad de tirosina cinasas, disminuyó el calcio intracelular basal de manera reversible. El influjo de calcio inducido por progesterona, que también se estimula durante la capacitación del espermatozoide humano, se inhibió con genisteina (de acuerdo con reportes anteriores). Sin embargo, este inhibidor no tuvo efecto sobre el aumento en la permeabilidad de los CCDV posterior a la capacitación, ni sobre la estimulación de estos canales por el influjo de calcio inducido por acción de la progesterona. Los resultados confirman que los CCDV y el influjo de calcio inducido por progesterona son dos vías diferentes de permeabilidad y sugieren que la actividad de fosforilación de tirosinas durante la capacitación no modula la permeabilidad de los CCDV.

1. Introducción.

1.1. Generalidades

Durante el proceso evolutivo de los seres vivos, la aparición de la reproducción sexual causó una notable ventaja adaptativa; ya que permitió a los individuos establecerse con mayor facilidad en el medio ambiente. El fundamento biológico de este proceso adaptativo lo constituye el hecho de que el nuevo individuo se dotó de las características genéticas del padre y la madre, a través de la unión de los gametos, esto es, de los espermatozoides y los óvulos.

Los gametos se generan por meiosis, un proceso en el que se presenta también la recombinación genética entre cromosomas. En la meiosis la división celular va acompañada de una reducción a la mitad de la cantidad de material genético de una célula diploide dando lugar a células haploides. Este proceso se denomina ovogénesis en el caso femenino y espermatogénesis en el masculino. El óvulo fecundado por el espermatozoide constituye el cigoto unicelular diploide, condición de la que arranca la formación del nuevo individuo.

En los mamíferos, antes de llevar a cabo la fecundación, se orquestan fenómenos que inician con la liberación del óvulo y su viaje a través del oviducto y, por otro lado, con el viaje que emprende el espermatozoide eyaculado hasta alcanzar a su destinatario. Es sin embargo, el espermatozoide quien debe cumplir con varios requisitos que le permitirán fecundar. El proceso comienza con la antes mencionada espermatogénesis, prosigue con el fenómeno de espermiogénesis, donde las espermátides (células que no están totalmente maduras), eliminan componentes celulares que no le serán útiles para la fertilización, y desarrollan el espermatozoide maduro que consiste de una forma hidrodinámica, provista de una cabeza generalmente puntiaguda y de un flagelo.

El espermatozoide eyaculado y depositado en el tracto genital femenino, presenta una serie de cambios bioquímicos que afectan profundamente su motilidad, hiperactivándola, y le confieren, en horas, la capacidad de responder a estímulos generados por la hembra produciéndole la exocitosis del acrosoma o reacción acrosomal. A la serie de procesos bioquímicos que confieren al

espermatozoide la capacidad de presentar reacción acrosomal fisiológica se le denomina **capacitación** [1].

La hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosomal son prerequisites absolutos para que el espermatozoide pueda fecundar al óvulo. Las bases moleculares de estos tres fenómenos involucran la activación de mecanismos de transporte de calcio [1,2,3]. Como se verá más adelante, el estudio de estos mecanismos constituyen parte central de esta tesis.

1.2. Estructura del espermatozoide

El espermatozoide consta de una cola o flagelo, el cual tiene un arreglo axonemal de "9+2", típico de eucariontes; una pieza media o cuello, donde se encuentran las mitocondrias; y la cabeza que alberga dos centríolos, un núcleo muy compactado y el acrosoma. El acrosoma es una estructura localizada en el extremo apical, la constituye una vesícula rodeada por una membrana acrosomal externa cerca de la membrana plasmática de la cabeza y una membrana acrosomal interna sobre la membrana nuclear (figura 1). Cabe mencionar que la estructura pequeña y peculiar de la cabeza ha dificultado enormemente el estudio de las corrientes iónicas en estas células [4].

1.3. Fisiología de el espermatozoide de mamíferos.

1.3.1. Motilidad e hiperactivación.

Los espermatozoides de mamífero se desarrollan en los túbulos seminíferos, terminan su maduración y posteriormente son almacenados en el epidídimo donde tienen un patrón de movimiento flagelar muy débil y se dice son inactivos[2]; cuando entran en contacto con el plasma seminal, son eyaculados y depositados en el tracto genital femenino, los espermatozoides cambian su patrón de movimiento e inician un desplazamiento vigoroso con trayectoria casi lineal [2]. Con el tiempo (en horas) el espermatozoide alcanza un movimiento flagelar aún

más vigoroso que juega un papel muy importante en el desplazamiento efectivo a través del mucus cervico-uterino. Esta aceleración de la motilidad, denominada por Yanagimachi hiperactivación [1] también ayuda al espermatozoide a penetrar la zona pelúcida, una cubierta extracelular que rodea al ovocito [2]. La hiperactivación de la motilidad requiere de calcio extracelular y un mantenimiento adecuado del pH intracelular [5].

1.3.2. Capacitación.

La capacitación es un proceso complejo que al parecer inicia por un eflujo de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides [6]. Este eflujo es lento y favorecido experimentalmente por la albúmina sérica bovina (BSA), constituyente esencial del medio de capacitación *in vitro* de los espermatozoides[7]. La extrusión de colesterol de la membrana trae como consecuencia un aumento en su fluidez y la activación de una adenilato ciclasa que eleva, también en horas, los niveles de AMPc y activa consecuentemente a la proteína cinasa A (PKA) [8,9]. La adenilato ciclasa del espermatozoide es soluble, y de manera peculiar, es estimulada por iones calcio y por bicarbonato [10,11]. A este respecto, cabe mencionar que la capacitación requiere estrictamente de la presencia de calcio extracelular y es notablemente estimulada, en el espermatozoide humano, por el bicarbonato (ambos iones son componentes que se requieren en el medio de capacitación *in vitro*). El aumento en el AMPc, y/o la activación de la PKA, trae como consecuencia la activación de tirosina cinasas [11,12,13]. La actividad de las tirosina cinasas también es esencial para la capacitación; ya que su inhibición, por genisteina, previene la reacción acrosomal inducida fisiológicamente por progesterona o ZP3 [14,15,16,17] (ver abajo), lo cual constituye un “marcador funcional” de la capacitación. Entre otros procesos bioquímicos, la capacitación del espermatozoide se acompaña de un aumento discreto en el calcio intracelular de reposo, y de una ligera alcalinización del pH intracelular [18,19,20,21,22].

1.3.3. Reacción acrosomal.

La reacción acrosomal (RA) es un proceso de exocitosis que trae como consecuencia la liberación de enzimas líticas que permiten al espermatozoide penetrar a través de las cubiertas extracelulares del óvulo, y al mismo tiempo, exponer la membrana interna, paso necesario para la fusión del segmento ecuatorial espermático y la membrana plasmática del óvulo [1]. En el espermatozoide de mamífero la RA puede ser inducida por una glicoproteína de la zona pelúcida, que en ratón se conoce como ZP3 [23,24] y por progesterona, una hormona esteroideal presente en el fluido folicular, la cual es liberada por las células de la granulosa que acompañan al óvulo [25]. Estos ligandos actúan sobre receptores membranales (aún no identificados plenamente) y como consecuencia disparan rápidamente un influjo de calcio que, a juzgar por el efecto inductor de los ionóforos de calcio, promueven la RA *per se*. Con base en el efecto inhibitorio de algunas dihidropiridinas (DHPs) sobre los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) y en la posterior inducción de la RA, se ha postulado que la ZP3 abre CCDV en el espermatozoide, involucrados en la liberación del contenido del acrosoma [26,27,28].

En contraste, el mecanismo de influjo de calcio inducido por la progesterona no involucra la apertura de CCDV [18]. Aunque se desconoce este mecanismo de movilización de calcio, de manera interesante, se ha postulado que la activación de tirosina cinasas regula al presunto canal, ya que la genisteína, un inhibidor de la actividad de fosforilación de tirosinas, inhibe el influjo de calcio inducido por la hormona [29,30]. Recordemos que la inducción de la RA por progesterona (y por ZP3) solo se lleva a cabo en espermatozoides capacitados [25,31]. Consistentemente, el influjo de calcio inducido por progesterona en el espermatozoide capacitado es mucho mayor que en el no capacitado [19,20,21,30,32], y la inhibición que produce la genisteína sobre este influjo (así como en la RA inducida por progesterona) llega hasta los valores de las células no capacitadas [29].

2. Antecedentes.

La participación del calcio intracelular es fundamental en la motilidad, capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide [1] y, en efecto, en todos ellos encontramos que un aumento súbito o moderado en el calcio interno es necesario para que se produzca el fenómeno [1,2,3]. Por ejemplo, la hiperactivación requiere de rápidas incorporaciones de calcio en el flagelo [2], así como la RA requiere del incremento en el calcio interno cuya concentración puede alcanzar 1000 nM en segundos [18,33]. En contraste el calcio intracelular aumenta unos 100 nM durante las 3-4 horas en que se lleva a cabo la capacitación [19,20,21]. El elemento común en estos procesos, es, que se activan sistemas de entrada de calcio en la membrana plasmática [4]. Entre estos sistemas destacan los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV).

2.1. Canales de calcio dependientes de voltaje en el espermatozoide humano.

Debido al tamaño y forma de los espermatozoides es imposible el empleo de técnicas electrofisiológicas para estudiar a los CCDV [4]. Alternativamente, se han utilizado células espermatogénicas para detectar estos y otros canales, extrapolando los resultados al funcionamiento del espermatozoide maduro. Los únicos CCDV que se han detectado en células espermatogénicas de ratón son los canales LVA (tipo T) [26,27,34,35]. Debido a que el espermatozoide maduro carece de capacidad de sintetizar proteínas, se ha propuesto que este canal debe estar presente en las células maduras [36]. Además, el hecho de que la RA sea inhibida por bloqueadores de CCDV tipo T, ha llevado a la hipótesis de que este canal sirve como la vía de permeabilidad de calcio que debe abrirse durante la RA inducida por la ZP3 [26,27,28].

Por otra parte, en el espermatozoide maduro el uso de colorantes sensibles al potencial de membrana y detectores de fluorescencia para calcio han permitido estimar, aunque indirectamente, la presencia de CCDV. En el espermatozoide

humano se ha encontrado que una despolarización con potasio, en presencia del ionóforo valinomicina, produce incrementos transitorios en el calcio intracelular [37]. Este influjo de calcio dependiente de voltaje es insensible a los bloqueadores orgánicos de CCDV como son el verapamil y las dihidropiridinas, pero sensible a níquel [37]. Estos presuntos canales permanecen abiertos por 1.5 minutos en medio sin calcio y se estimulan notablemente por amonio, lo cual sugiere que la alcalinización del pH intracelular los estimula [37]. Toda esta evidencia sugiere fuertemente que el influjo de calcio dependiente de voltaje se debe a la activación de CCDV, aún cuando su clasificación no es fácil de hacer dado su insensibilidad a bloqueadores orgánicos y a su tiempo de apertura aparentemente largo [37]. En este sentido podrían clasificarse como CCDV tipo R (resistant) [18], o alternativamente, podría tratarse de un canal totalmente diferente e identificado con una forma peculiar de CCDV, en el espermatozoide, encontrado con técnicas de biología molecular denominado CatSper [38,39].

Estudios recientes han demostrado que los CCDV del espermatozoide humano aumentan de manera notable su permeabilidad a calcio durante la capacitación [33]. También se estimula su apertura por la acción de la progesterona [33]. Esto ha llevado a la hipótesis de que la capacitación y la progesterona afectan al canal de tal manera que aumentan varias veces su probabilidad de apertura, así, al entrar en contacto con la zona pelúcida, específicamente la ZP3, el influjo de calcio que induce esta glicoproteína se vería enormemente potenciado, ya que se supone moviliza calcio activando CCDV [26,27,28]. Consecuentemente, se posibilitaría o aseguraría una rápida inducción de la RA.

¿Cual es el mecanismo por el cual se estimulan los CCDV durante la capacitación y por acción de la progesterona? Como hipótesis tentativa se piensa que es la activación de tirosina cinasas. Esta actividad está involucrada en la respuesta de calcio que produce la progesterona en el espermatozoide capacitado [30] y, por otra parte, está documentado que la fosforilación de tirosinas puede aumentar la probabilidad de apertura de varios tipos de CCDV en células

excitables [40]. Debido a esto, el planteamiento del presente trabajo versa alrededor del posible efecto de la fosforilación de tirosinas en los CCDV humanos.

3. Hipótesis.

- El incremento en la permeabilidad a calcio de los CCDV en los espermatozoides de humano se debe a una modificación en su funcionalidad por la fosforilación de tirosinas, que ocurre durante la capacitación. Consecuentemente, el inhibidor de la actividad de tirosina cinasas, genisteina, prevendrá la estimulación del influjo de calcio a través de los CCDV durante la capacitación.

- La estimulación de los CCDV que se produce por acción de la progesterona, podría deberse a la fosforilación de tirosinas que dispara la hormona. Por lo consiguiente, la genisteina prevendrá la estimulación de los CCDV por progesterona.

4. Objetivos.

- Analizar la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje y su regulación por fosforilación de tirosinas utilizando detectores ópticos de potencial de membrana y calcio intracelular en espermatozoides humanos tanto capacitados como no capacitados.

- Estudiar el efecto de la genisteina en el influjo de calcio inducido por despolarización de la membrana observando si el inhibidor revierte la estimulación que se observa durante la capacitación y por la acción de la progesterona sobre los CCDV.

5. Metodología

5.1. Colecta y purificación de los espermatozoides.

Se utilizó semen humano obtenido de un grupo de 16 donadores sanos (entre 18 y 25 años de edad). Las características de selección fueron las utilizadas en el protocolo de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Mediante espermatobioscopia se seleccionaron aquellas muestras con las siguientes características de normalidad: color de semen blanco grisáceo, tiempo de licuefacción de 20-60 minutos a temperatura ambiente, volumen de 2-5 ml, pH de 7.2-7.8, movilidad y viabilidad \geq al 60%, ausencia de aglutinación y concentración de leucocitos no mayor a 10^6 /ml [41].

El semen se incubó a 37 °C, 30 min para reducir su viscosidad y, subsecuentemente, los espermatozoides se separaron por gradientes isotónicos de densidad discontinuos de percoll de acuerdo a Suárez *et al* [42]. El semen se colocó sobre un gradiente formado por 1 ml de percoll al 75% y 1 ml de Percoll al 50% (ambos amortiguados a pH 7.4 con HEPES 10 mM, NaCl 150 mM) y fue centrifugado a 300 X g, 20 min. La pastilla de espermatozoides (encontrada al fondo de la fase de Percoll al 75%) fue separada y lavada dos veces por centrifugación a 300 g, 10 min, en medio HSM-H (NaCl 117.5 mM, KCl 8.6 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 0.49 mM, NaH₂PO₄ 0.3 mM, glucosa 2 mM, Na-piruvato 0.25 mM, Na-lactato 25 mM, HEPES 25 mM, pH 7.5).

5.2. Incorporación de fura-2 AM.

Después de la última centrifugación, las células se resuspendieron en 1 ml de HSM-H y se cargaron con 3 μ M de fura-2 AM (acetoximetil éster), para determinar la concentración de calcio intracelular, incubándolas durante 40 minutos a 37° C. Posteriormente, se separó la pastilla por centrifugación a 300 X g durante 5 minutos para eliminar el excedente del colorante no incorporado, y finalmente la muestra se incubó entre 5 y 10 minutos (espermatozoides no capacitados) en medio H-HSM, o entre 4 y 6 horas (espermatozoides capacitados) en medio HSM. El medio HSM es el medio de capacitación y tiene la misma composición del

medio H-HSM excepto que el HEPES 25 mM es sustituido por NaHCO_3 25 mM y se agrega BSA 3mg/ml. Estos aditivos son esenciales para la capacitación [1]. La incubación en este medio se hizo a 37 °C bajo 5% CO_2 -95% aire y 100% humedad. Bajo estas condiciones el pH de el HSM se mantuvo entre 7.6-7.8.

5.3. Sistema de detección simultanea de calcio intracelular y potencial de membrana.

Para detectar el potencial de membrana y el calcio intracelular simultáneamente, se utilizó el colorante sensible a potencial de membrana, yoduro de diisopropiltiodiocarbocianina ($\text{diSC}_3(5)$), un compuesto catiónico fluorescente capaz de introducirse electroforéticamente a la célula siguiendo un potencial negativo formando agregados no fluorescentes en el interior, lo que hace su distribución, y su fluorescencia, dependiente del potencial de membrana (figura 2). El $\text{diSC}_3(5)$ tiene una excitación a 600 nm y una emisión a 670 nm, ofreciendo la ventaja de no interferir con la fluorescencia del fura-2. El $\text{diSC}_3(5)$ (500 nM) se agregó a la celda de fluorescencia 5 segundos después de depositar los espermatozoides en medio HSM-H adicionado con bicarbonato 5 mM, realizando inmediatamente después los registros simultáneos.

El detector fura-2, cambia sus propiedades espectroscópicas al unirse al Ca^{2+} . Esto hace que al unir calcio aumente su fluorescencia (detectada a 488 nm) cuando se excita a 340 y la disminuya cuando se excita a 380 nm. En su forma de acetoximetil éster (fura-2 AM), permea al interior celular, donde la acción de esterasas lo hidrolizan a su forma de compuesto impermeable, fura-2, comportándose como un detector intracelular de calcio [43] (figura 3).

La fluorescencia se midió con un espectrofluorómetro de Photon Technology International Inc (PTI). Este equipo está formado por una caja protegida de entradas de luz, a excepción de cuatro aperturas, dos para la excitación de la muestra y dos para coleccionar la fluorescencia emitida; en el centro tiene un portacelda con agitación magnética constante y temperatura regulable a través de un baño de incubación. La emisión de señales fue amplificada y analizada por dos fotomultiplicadores (FMs) colocados uno frente al otro a 90° con

respecto a una fuente de excitación de Xenón. El fura-2 AM se excitó a 340 y 380 nm con un monocromador automático del sistema PTI; el diSC₃(5) se excitó con una fuente de luz adicional de haluro (tri-lite, WPI) con un filtro de 600 nm (Hansatech Instruments). Esta fuente adicional de luz se colocó frente a la fuente de luz de Xenón del sistema PTI. Para coleccionar ambas señales simultáneamente, un FM cuenta con un filtro de interferencia a 670 nm para detectar fluorescencia de diSC₃(5) y el otro FM con un filtro de interferencia de 488 nm para detectar fura-2. Ambos registros de fluorescencia, esto es, la lectura de relación 340/380 nm de fura-2 y la lectura única (600 nm) del diSC₃(5), fueron detectadas simultáneamente a 90° con respecto de sus fuentes de luz. Los registros simultáneos se obtuvieron a una frecuencia de 0.85 Hz y los datos fueron coleccionados y digitalizados con la interfase computarizada del PTI (figura 4).

5.4. Calibración en la detección simultánea de calcio intracelular con fura-2 y potencial de membrana con diSC₃(5).

Calibración de la señal del fura-2. Los registros de calcio se calibraron según Linares-Hernández, *et al* [37], con la ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d (R-R_{min})/(R_{max}-R) (F_{f380}/F_{b380})$$

el valor de relación máxima (R_{max}) de la razón 340/380 y el de fluorescencia unida a 380 nm de excitación (F_{b380}) se obtuvo a partir de la saturación del calcio intracelular por la adición de 1 μM del ionóforo de calcio ionomicina; la relación mínima (R_{min}) y la fluorescencia libre, o en ausencia de calcio, a 380 nm de excitación (F_{f380}) se consiguieron después de agregar, primero, Tritón X100 al 0.1% (v/v), y posteriormente EGTA 6 mM. La constante de disociación del fluoróforo (K_d = 224 nM) fue obtenida de Grynkiewicz *et al* [43]. La adición de Tritón X100 fue necesaria para obtener una rápida R_{min}, ya que, por razones que desconocemos, la disminución de calcio interno inducido solamente con EGTA

produce una disminución extremadamente lenta, aún cuando los valores de fluorescencia llegan a la misma R_{min} (figura 5).

Calibración de la señal de diSC3(5). La calibración de la fluorescencia de diSC₃(5) se llevó a cabo en espermatozoides cargados con fura-2 AM, como se describe en González-Martínez [44], agregando 1.5 μ M de valinomicina, un ionóforo de potasio que conduce el potencial de membrana a valores del equilibrio de potencial de Nernst para la distribución de potasio:

$$E_K = -61.54 \text{ mV } \log [K]_{in}/[K]_{ext}$$

tomando en cuenta que la concentración de potasio intracelular ($[K]_{in}$) en espermatozoide humano es de 120 mM [37] a una temperatura de 36° C, el valor de equilibrio de potencial de Nernst para la distribución de potasio (E_K) estimada en poblaciones de espermatozoide humano en HSM-H ($[K]_{ext} = 8.6$ mM) es de -71 mV. Un minuto después de agregar valinomicina, se indujo una despolarización gradual a -43, -30, y -15 mV cada 30 segundos con adiciones consecutivas de 15, 15 y 30 mM KCl, estas despolarizaciones al mismo tiempo incrementaron la fluorescencia de diSC₃(5).

Existe una relación lineal entre el cambio fraccional de fluorescencia de diSC₃(5) ($f = F - F_o/F_o$, donde F_o es el valor obtenido de fluorescencia después de la adición de valinomicina y F es el valor real de fluorescencia) y el potencial de membrana [45] con una pendiente que en el espermatozoide se encuentra entre 0.018 y 0.025 (cambio fraccional de fluorescencia por milivolt). Tomando en cuenta los parámetros de calibración, los valores reales de fluorescencia se transformaron a valores de potencial de membrana (V_m) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$V_m = F/mF_o - 1/m - b/m$$

donde m y b son los parámetros de la curva lineal de calibración (la pendiente y el valor fraccional del cambio de fluorescencia en el eje “y” a 0 mV, respectivamente). Se hizo una curva de calibración para cada trazo usando el método descrito anteriormente con un valor máximo de calibración de -15 mV.

Es importante hacer notar que el potencial mitocondrial no contribuye a la señal de $\text{diSC}_3(5)$ en el espermatozoide humano [46], lo cual es consistente con el ínfimo papel de este organelo en sustentar la motilidad en el espermatozoide humano [47,48], así, la medición simultánea de calcio intracelular y potencial de membrana se llevó a cabo en ausencia de inhibidores o desacopladores mitocondriales.

6. Resultados y Discusión.

6.1. Efecto de la genisteina en los CCDV de los espermatozoides capacitados.

La figura 6 muestra un registro simultáneo de potencial de membrana y calcio intracelular en el que se evalúa el influjo de calcio dependiente de el voltaje en espermatozoides no capacitados. En la figura se incluyen los trazos de fluorescencia de fura excitando a 340 y 380 nm. La adición de valinomicina produjo un notable apagamiento de la fluorescencia de el $\text{diSC}_3(5)$, indicando hiperpolarización, que de acuerdo a la ecuación de Nernst es de alrededor de -71 mV. La fluorescencia del fura-2, excitada a 340 y 380 nm mostró un ligero aumento en la primera longitud de onda y una ligera disminución en la segunda, indicando, como se ve en el trazo calibrado de calcio, que la valinomicina produjo un ligero aumento en el calcio intracelular. La adición de 60 mM de KCl, que lleva el potencial de membrana a -15 mV, consistentemente produjo un rápido aumento en la fluorescencia del $\text{diSC}_3(5)$ y concomitantemente, el registro de calcio intracelular mostró un rápido aumento seguido de una recuperación a valores cercanos al reposo. Nuevamente, la fluorescencia a 340 nm subió y la de 380 nm bajó, corroborando de manera clara que la señal es efectivamente de calcio y que se dispara por despolarización con potasio.

La apertura de los CCDV se examinó en células no capacitadas y en células capacitadas (figura 7). De acuerdo a lo esperado, en células capacitadas se ve claramente que la despolarización de -71 a -15 mV induce una aumento en el calcio intracelular mucho mayor que en el espermatozoide no capacitado. Cabe hacer notar que en el trazo simultáneo de potencial de membrana se muestra que, tanto en el espermatozoide capacitado como en el no capacitado, la despolarización que induce el potasio sobre el potencial de membrana, en presencia de valinomicina, es prácticamente el mismo. Con esto se descarta que el notable aumento en el influjo de calcio dependiente de voltaje se deba a diferentes sensibilidades al potasio en una u otra célula y que, efectivamente, existe un aumento en la probabilidad de apertura de los CCDV del espermatozoide humano. Asimismo, se observó que el valor del calcio intracelular en reposo se

incrementó ~100 nM, lo cual es característico de los espermatozoides capacitados [19,20,21].

Con el objeto de explorar si la actividad de fosforilación de tirosinas participa en la estimulación de los CCDV, estudiamos el efecto de la genisteína (que es un inhibidor de la actividad de tirosina cinasas) en el influjo de calcio dependiente de voltaje estimulado por capacitación (figura 8). La adición de 60 μ M de genisteína, que es una concentración que se ha probado inhibe la fosforilación de tirosinas en el espermatozoide humano, produjo un rápido apagamiento inespecífico en la fluorescencia excitada a 340 y 380 nm. Este apagamiento afectó los valores de la razón 340/380 nm de manera diferente y por tanto el valor calibrado presentó una caída abrupta, no atribuible a una señal de calcio. Estimamos que la obtención de R_{max} y R_{min} en estas condiciones podría dar valores confiables de calcio (sin embargo véase más adelante), ya que pareció que el registro podía “absorber” el error producido por el apagamiento inespecífico. Hecha esta reflexión, podemos observar que, después del rápido apagamiento inespecífico, la genisteína produjo una pequeña y lenta, pero genuina disminución en el calcio intracelular, como se puede apreciar en el hecho que la fluorescencia excitada a 340 nm desciende y la de 380 nm aumenta, probablemente debido a la estimulación (Ca^{2+} -ATPasas membranales) o inhibición (canales de calcio que establecen la concentración intracelular de reposo) de los mecanismos dependientes de la actividad de tirosina cinasas [49]. Posterior a la adición de valinomicina y potasio se puede ver una notable inhibición sobre el influjo de calcio dependiente de voltaje. En principio, esta observación apoyaba la hipótesis de que el influjo de calcio dependiente de voltaje se estimularía por fosforilación de tirosinas, proceso que se lleva a cabo durante la capacitación [14,17].

Siguiendo este protocolo, decidimos explorar el efecto de diferentes concentraciones de genisteína, incluyendo concentraciones menores de 60 μ M para disminuir el apagamiento inespecífico, en el influjo de calcio dependiente de voltaje en el espermatozoide capacitado en los trazos de la lectura *ratimétrica* (razón 340/380 nm). La figura 9 muestra que a mayor adición de genisteína mayor es el efecto inhibitorio sobre los CCDV del espermatozoide, con valores de

saturación entre 40 y 60 μM . A estos dos valores se produce un descenso saturante en el calcio intracelular de reposo y una inhibición de los CCDV en los espermatozoides capacitados, que llegan a alcanzar valores cercanos al espermatozoide no capacitado. Si bien estos resultados parecían claros, aún cuando la genisteina indujera una genuina disminución en el calcio intracelular, quedaba la posibilidad de que los valores fueran sesgados dado el apagamiento inespecífico del fura-2. En este sentido, la posibilidad de que la genisteina generara sesgo en las medidas nos puso en la necesidad de calibrar la señal en cada trazo y de manera rápida.

Las calibraciones de los valores de fura-2 (al final de los trazos) en los experimentos hasta ahora expuestos, tomaron en cuenta valores promedio de R_{max} y R_{min} , obtenidos de varios experimentos control, es decir, hechos sin aditivos como la genisteina. El uso de estos valores promedio facilitaban las lecturas ya que, por razones que aún desconocemos, la obtención del valor de R_{min} , después de la adición de ionomicina, es tan lenta que lleva alrededor de 20 minutos llegar a valores cercanos a 0.8 (valor promedio de R_{min}). Esto dificultaba la calibración individual para cada trazo, que debía hacerse al final de cada experimento. Para resolver este problema decidimos añadir Tritón X100 junto con el EGTA y alcanzamos rápidamente un valor de R_{min} cercano a los valores promedio obtenidos en ausencia del detergente pero después de 20 minutos (ver figura 5 Metodología). Esto permitió calibrar, en 3-4 minutos, las señales al final de cada experimento.

La figura 10 muestra el efecto de la genisteina sobre los CCDV en el espermatozoide humano cuando se calibra la señal para cada trazo. Observamos que a pesar de que en el registro de calcio intracelular no se presentaba una disminución inespecífica, el valor de R_{max} disminuía notablemente (de valores entre 6 y 7 a valores entre 5 y 6) en función de la concentración de genisteina añadida, y esto hacía que, basándose en las calibraciones individuales, los registros no presentaran diferencias en el influjo de calcio dependiente de voltaje entre el control y las células tratadas con genisteina. Este resultado indicaba,

contrario a la conclusión escrita arriba, que los CCDV de los espermatozoides humanos no eran afectados por la fosforilación de tirosinas.

Esto nos planteó dudas respecto a la confiabilidad de los resultados, ya que, si bien la calibración individual era más confiable, no podíamos saber si otras propiedades del fura-2 estarían afectadas en presencia de la genisteina, como la K_d , o incluso el grado de inclinación de la curva de unión con respecto a la concentración de calcio.

En este sentido decidimos cambiar los procedimientos para estudiar el efecto de la genisteina. Este cambio consistió, fundamentalmente, en incubar las células con la genisteina en el medio de capacitación y llevar a cabo la medición de fura-2 en medio sin genisteina. Por otra parte, decidimos despolarizar a -30 mV en lugar de a -15 mV con el fin de reducir el influjo de calcio dependiente de voltaje. Esto se hizo para evitar que los valores del pico de calcio intracelular inducido por despolarización llegaran a valores de saturación de fura-2, como frecuentemente sucedía al inducir despolarización a -15 mV, máxime que la genisteina podría disminuir los valores de R_{max} .

La figura 11A muestra el efecto de incubar los espermatozoides en medio de capacitación por 4 horas con diferentes concentraciones de genisteina. Los espermatozoides fueron centrifugados y lavados del medio de capacitación con la genisteina, mientras la pastilla de células se añadió a la celda de cuarzo para medir fluorescencia con medio H-HSM sin genisteina. En estos casos los valores de R_{max} fueron cercanos, todos, al valor del experimento control, indicando que la genisteina fue efectivamente removida de los espermatozoides. Asimismo, encontramos que los valores de calcio intracelular en reposo no se afectaron por la incubación de genisteina en el medio de capacitación. Esto indicó que la disminución del calcio intracelular inducido por la genisteina (figura 8) fue reversible. Se observó que la genisteina (en el intervalo de 30 a 120 μ M) no provocó ningún efecto en el influjo de calcio dependiente de voltaje. En el trazo también se muestra el influjo de calcio dependiente de voltaje, notablemente menor, del espermatozoide no capacitado. Considerablemente, no hubo efecto

estadísticamente significativo (ANOVA; $p= 0.95$; $n= 5$) ni a concentraciones tan altas como 200 μM de genisteina (figura 11B).

6.2 Efecto de la genisteina en los CDDV estimulados por la progesterona.

Si bien, los resultados descritos arriba implicaban que la genisteina no presentaba ningún efecto en los CCDV, quedaba la duda de si la remoción de genisteina del medio producía un regreso al estado natural de las células, es decir, que sus presuntos efectos de inhibición sobre la fosforilación de tirosinas fueran revertidos durante el registro. Teniendo esto en mente se midió el efecto de la genisteina presente durante la incubación de los espermatozoides humanos en medio de capacitación sobre el influjo de calcio inducido por progesterona, y la estimulación en la subsecuente inducción del influjo de calcio dependiente de voltaje.

La figura 12A muestra el efecto de diferentes concentraciones de genisteina (30, 60 y 120 μM), presentes en el medio de capacitación durante la incubación por 4 horas, sobre el influjo de calcio inducido por progesterona (4 μM). Las células fueron centrifugadas (como se describió anteriormente) y el registro de fluorescencia se hizo en medio H-HSM sin genisteina. En los controles observamos de manera consistente que la progesterona indujo un aumento en el influjo de calcio en espermatozoides capacitados comparado con espermatozoides no capacitados. Como habíamos anticipado, la genisteina produjo una notable disminución en el pico de calcio inducido por progesterona en espermatozoide capacitado (sin llegar a valores de espermatozoide no capacitado). El efecto de la genisteina saturó en 30 μM , lo cual es consistente con el hecho de que a estas concentraciones de genisteina se inhibe la fosforilación de tirosinas que se genera durante la capacitación [50] y con los resultados presentados por otros autores en los que se evidencia la vía de permeabilidad “dependiente de fosforilación de tirosinas” que genera la progesterona en su mecanismo de transducción [14,17,30]. Además, este resultado apoyó la hipótesis de que la genisteina, efectivamente, produce un efecto inhibitorio de la capacitación, medida por la disminución del pico de calcio inducido por progesterona.

El influjo de calcio dependiente de voltaje posterior a la estimulación por progesterona fue poco afectado por la genisteina, e incluso, a altas concentraciones del inhibidor, produjo un ligero aumento en la permeabilidad de los CCDV. Es necesario mencionar que la progesterona estimula significativamente el influjo de calcio dependiente de voltaje y que la ligera estimulación a 120 y 200 μM de genisteina, de acuerdo al presente resultado, (figura 12B) no se debe a la fosforilación de tirosinas que induce la progesterona. Además tampoco hubo diferencia estadísticamente significativa (ANOVA; $p= 0.70$; $n= 5$) en ninguna de las concentraciones utilizadas de genisteina (10, 30, 60, 120 y 200 μM).

También se investigó el efecto del tiempo de incubación de la genisteina sobre los influjos de calcio. La figura 13 muestra que basta una hora de incubación con la genisteina 60 μM para producir efectos inhibitorio en el influjo de calcio inducido por progesterona, sin afectar el influjo de calcio dependiente de el voltaje. Estos resultados sugieren que los CCDV no son modulados por la fosforilación de tirosinas que dispara la progesterona.

7. CONCLUSIONES.

1. La genisteina presente en el medio de capacitación, inhibe el influjo de calcio inducido por progesterona en el espermatozoide capacitado.
- 2.- La genisteina presente en el medio de capacitación y a concentraciones que bloquean parcialmente el influjo de calcio inducido por progesterona, no afectan los canales de calcio dependientes de voltaje estimulados por capacitación, pero sí inhibe la estimulación por progesterona.
- 3.- La genisteina produce un ligero, pero reversible, descenso en el calcio intracelular de reposo. Este resultado se puede interpretar como una estimulación de las Ca^{2+} -ATPasas membranales o por una inhibición de los canales de calcio encargados de establecer la concentración intracelular de reposo de éste ión, ambos mecanismos dependientes de fosforilación de tirosinas.
- 4.- La presencia de genisteina durante los registros de calcio, aún cuando no cause variaciones en la relación 340/380 nm debido a la compensación del apagamiento inespecífico de fluorescencia, provoca distorsiones en el sistema de detección óptica, dando valores menores a los obtenidos en trazos realizados sin genisteina.

El influjo de calcio inducido por progesterona es afectado cuando se inhibe la actividad de fosforilación de tirosinas en el espermatozoide humano. Sin embargo, los CCDV no modulan su permeabilidad durante la capacitación a través de la actividad de tirosina cinasas como en el caso de la progesterona. Esto confirma el hecho de que estas dos vías de permeabilidad son diferentes.

Aun cuando la actividad de fosforilación de tirosinas no modula el aumento en la permeabilidad de los CCDV en el espermatozoide humano, existen otros mecanismos que deben ser explorados y que no son excluyentes entre sí: a) Alcalinización del pH intracelular. Durante la capacitación, el pH intracelular se alcaliniza alrededor de 0.14 unidades. Se ha visto que el amonio, que puede alcalinizar el pH intracelular, estimula los CCDV. b) El aumento en la actividad de AMPc durante la capacitación. Se ha observado que los CCDV de espermatozoide de ratón, que requieren de alcalinización extracelular para abrirse, se estimulan

por la presencia de AMPc, con la consiguiente estimulación en la actividad de la proteína cinasa A (PKA). c) La generación de segundos mensajeros lipídicos (por activación de fosfolipasas) como el inositol trifosfato y el diacilglicerol, los cuales promueven el aumento de calcio intracelular en células somáticas y estimulación de la proteína cinasa C (PKC).

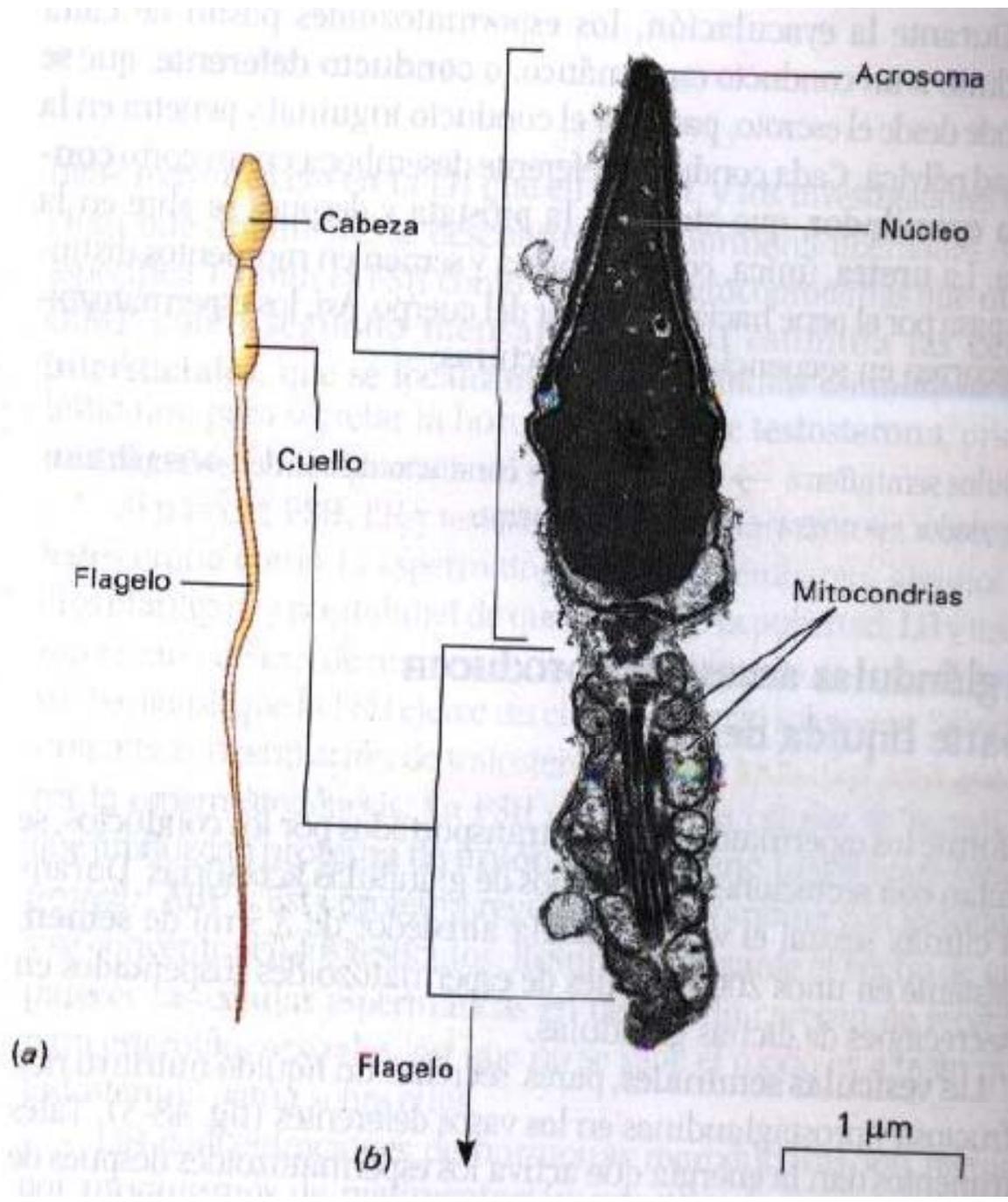


Figura 1. Estructura de un espermatozoide maduro. Figura tomada de Solomon *et al* [51].

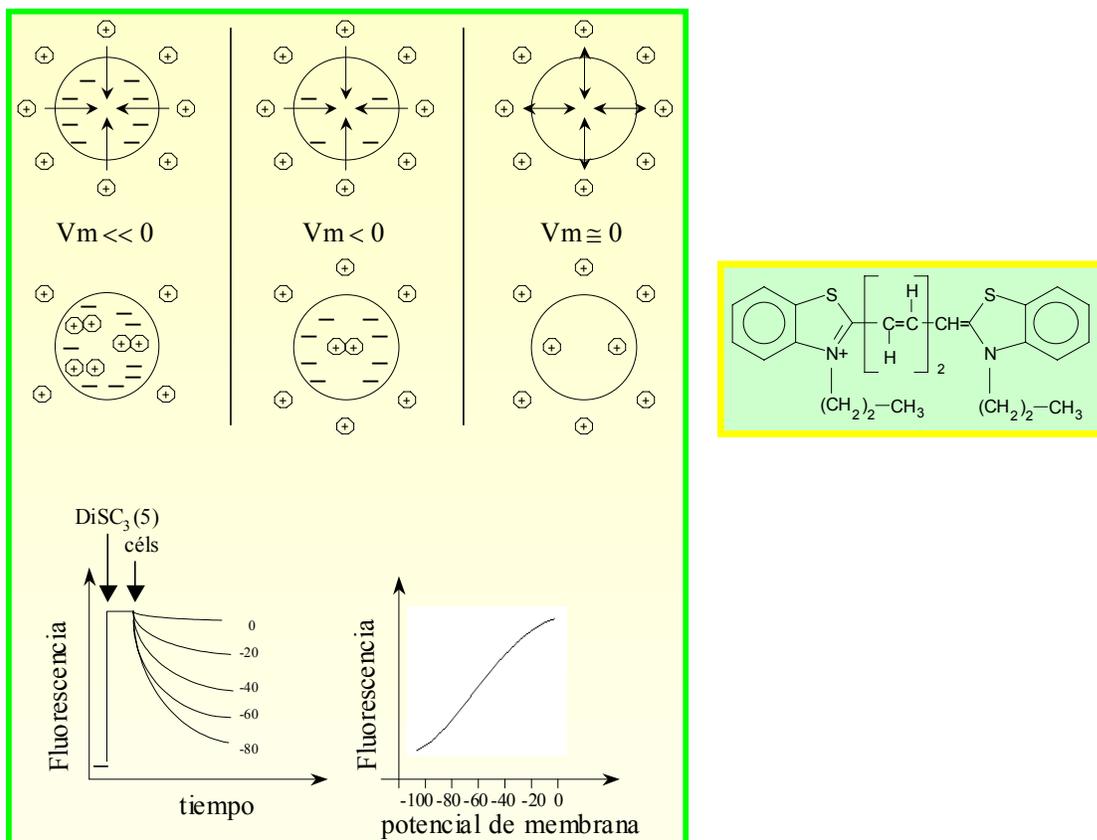


Figura 2. Estructura y mecanismo sensor de voltaje transmembranal de la diisopropiltiodicarbocianina (diSC₃(5)). En la parte superior de la figura se explica la propiedad de movilización del diSC₃(5). En la gráfica inferior izquierda se muestra cómo la adición de células, con potenciales de membrana diferentes, produce un apagamiento de la fluorescencia debido a la captación electroforética del colorante. El cambio porcentual de la fluorescencia es una función lineal de el potencial de membrana. La gráfica inferior derecha se representa la relación lineal entre el apagamiento de fluorescencia y el potencial de membrana. Figura tomada de Guzmán [52].

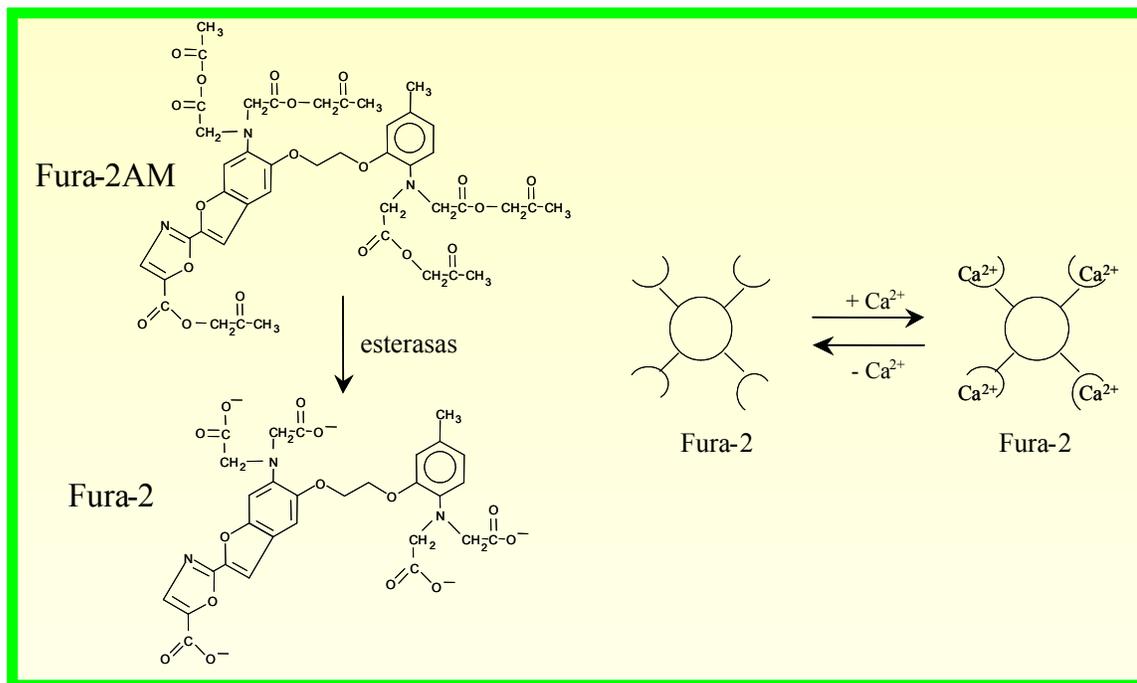


Figura 3. Estructura de el fura-2 AM y el fura-2 activado. Representación de el proceso de unión calcio-fura. Figura tomada de Guzmán [52].

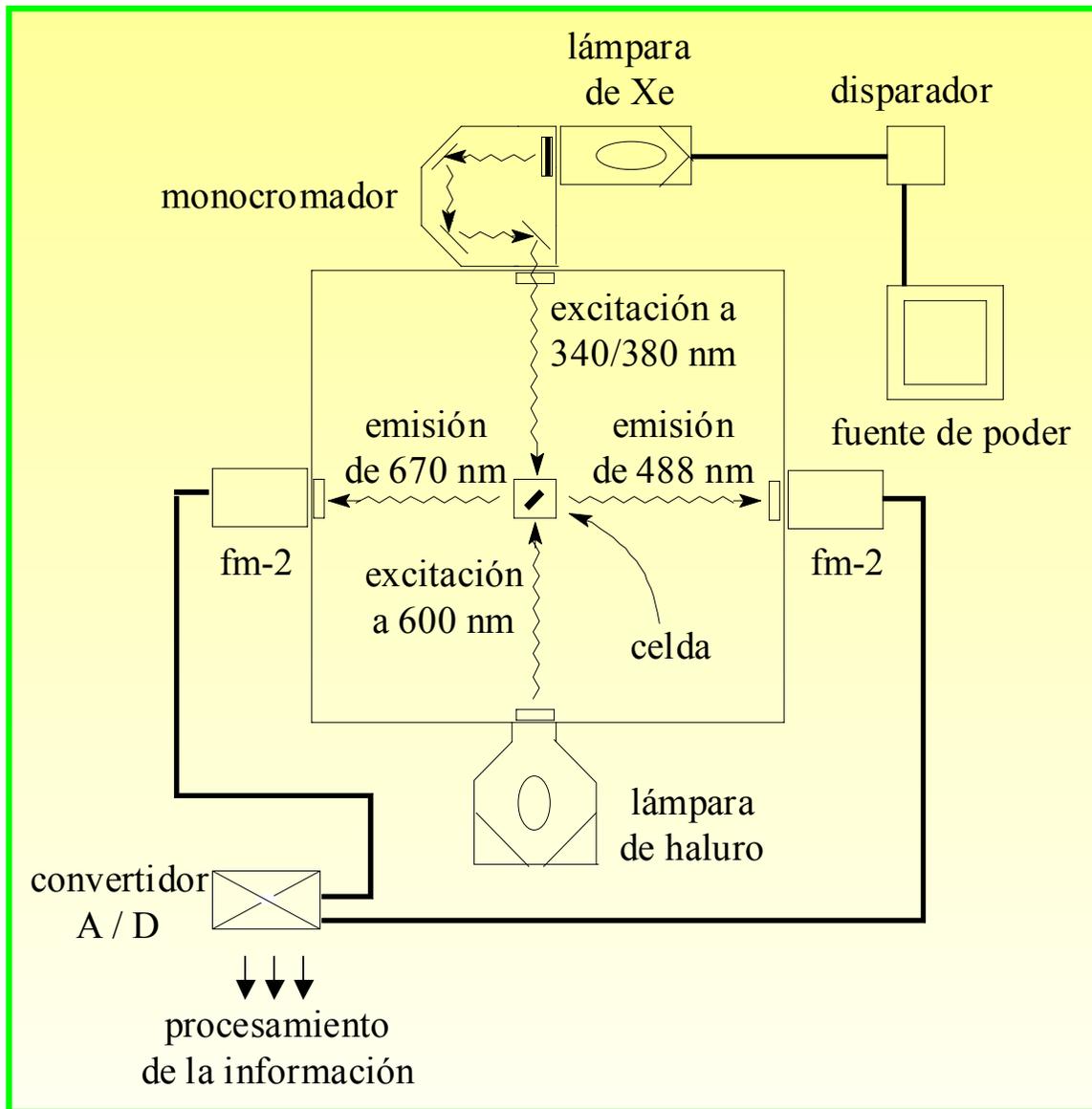


Figura 4. Esquema de el sistema de detección simultánea de calcio y potencial de membrana utilizado en el presente trabajo. Figura tomada de Guzmán [52]

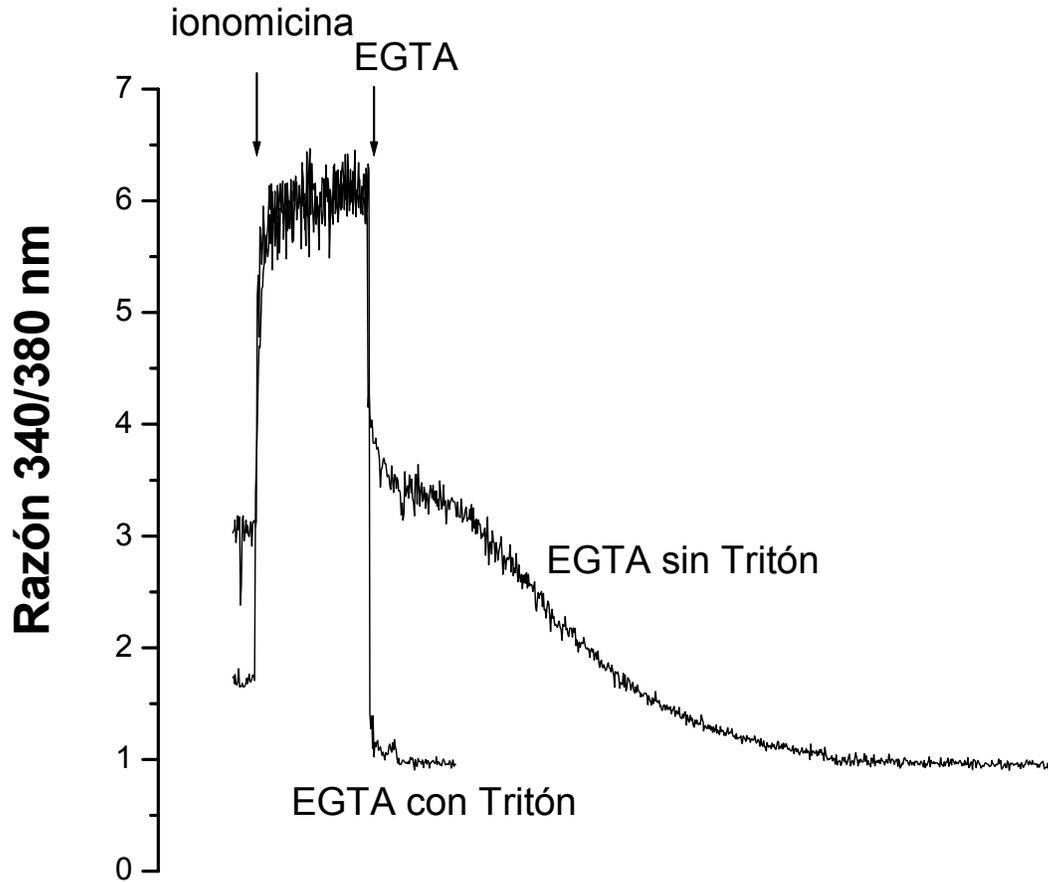


Figura 5. Registro de calibración con fura-2. Los registros de la razón 340/380 nm se calibran agregando ionomicina 2 μ M para obtener el valor de Rmax, y posteriormente EGTA 6mM con o sin Tritón X100 al 0.1% (v/v) opara obtener el valor de Rmin.

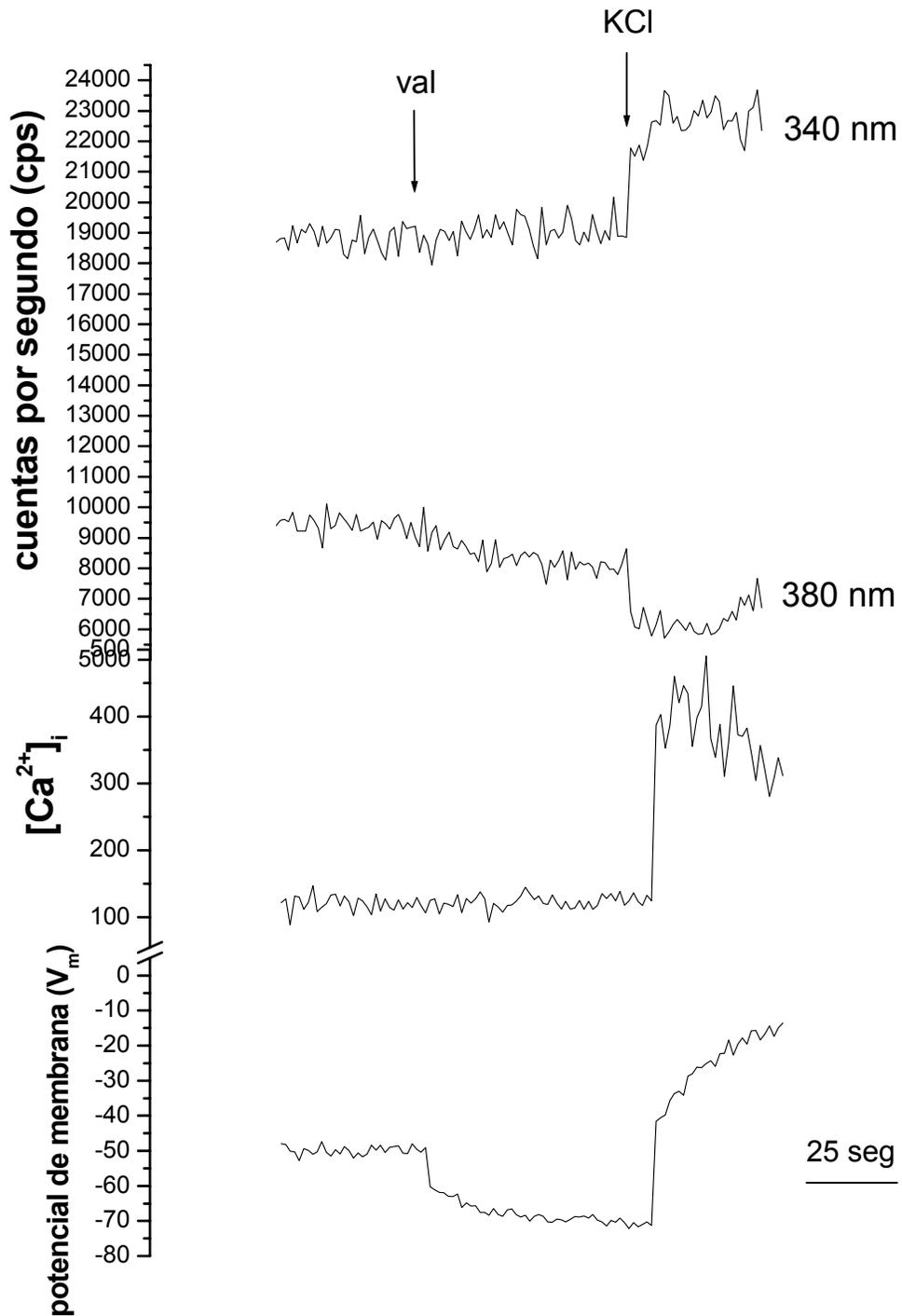


Figura 6. Detección simultánea de la razón 340/380 nm, calcio intracelular y potencial de membrana en espermatozoides no capacitados. Las flechas representan el momento de la adición de valinomicina (val) y KCl 60 mM.

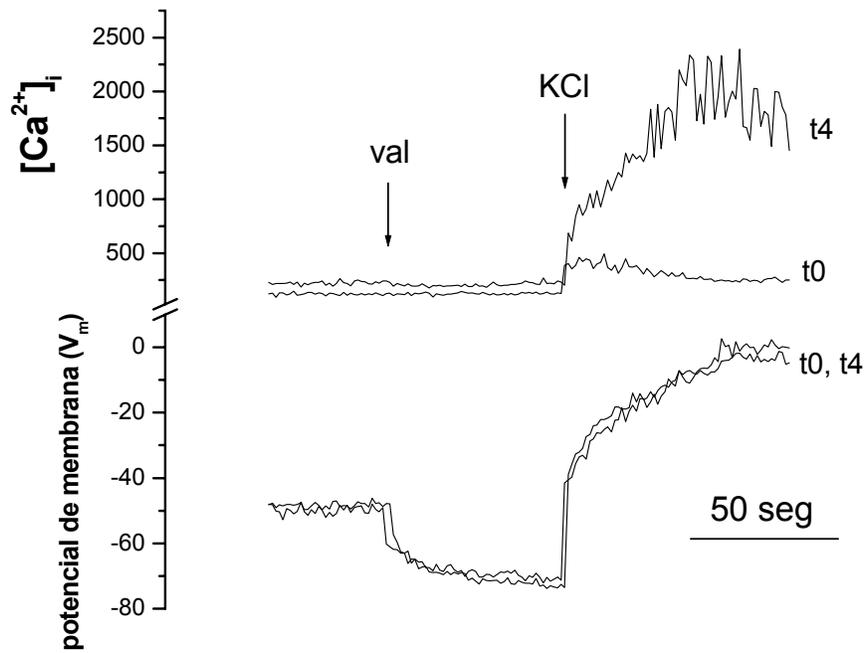


Figura 7. Detección simultánea de calcio intracelular y potencial de membrana en espermatozoides no capacitados (t_0) y capacitados (t_4). Las flechas representan el momento de la adición de valinomicina (val) y KCl 60 mM.

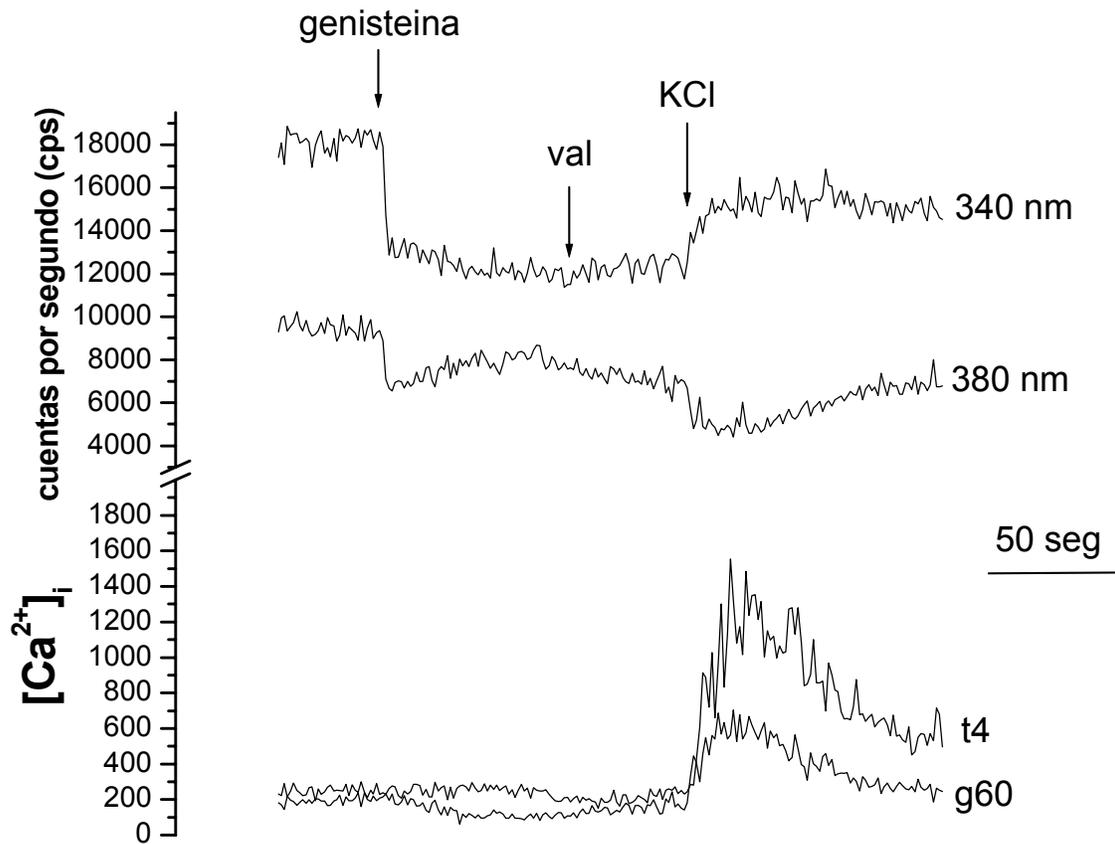


Figura 8. Efecto de la genisteina ($60\mu\text{M}$) sobre el influjo de calcio dependiente de voltaje inducido por KCl en espermatozoides capacitados. En la parte superior de la figura se observa un apagamiento inespecífico en las lecturas de 340 y 380 nm al agregar genisteina. En el registro de calcio intracelular se aprecia una inhibición en el influjo de calcio dependiente de voltaje por el uso de genisteina (g60) en comparación con el control (t4).

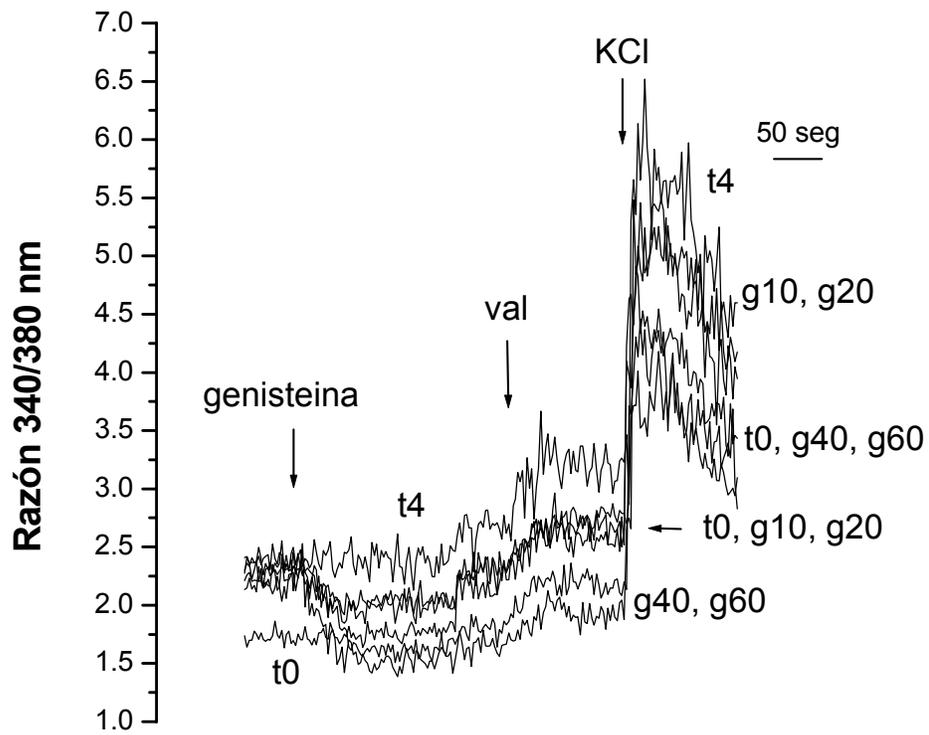


Figura 9. Detección de calcio intracelular en la inducción de influjo de calcio dependiente de voltaje en espermatozoides no capacitados (t0), capacitados (t4) y el efecto de diferentes concentraciones de genisteína 10 (g10), 20 (g20), 40 (g40) y 60 μ M (g60) en la lectura de la razón 340/380 nm señal de fura-2.

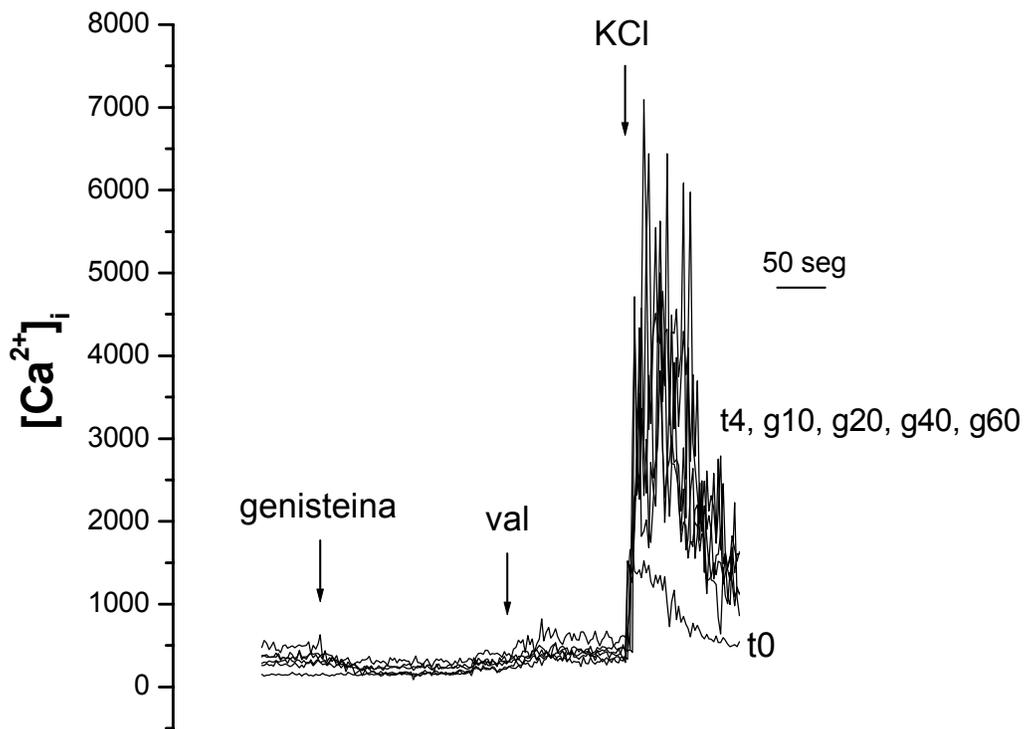


Figura 10. Efecto de la genisteina sobre los CCDV en registros calibrados individualmente. Detección de calcio intracelular en la inducción de influjo de calcio dependiente de voltaje en espermatozoides no capacitados (t0) y capacitados (t4) y el efecto de diferentes concentraciones de genisteina (10, 20, 40 y 60 μ M) en la señal calibrada individualmente para cada trazo obteniendo la concentración de calcio intracelular como se describe en Metodología.

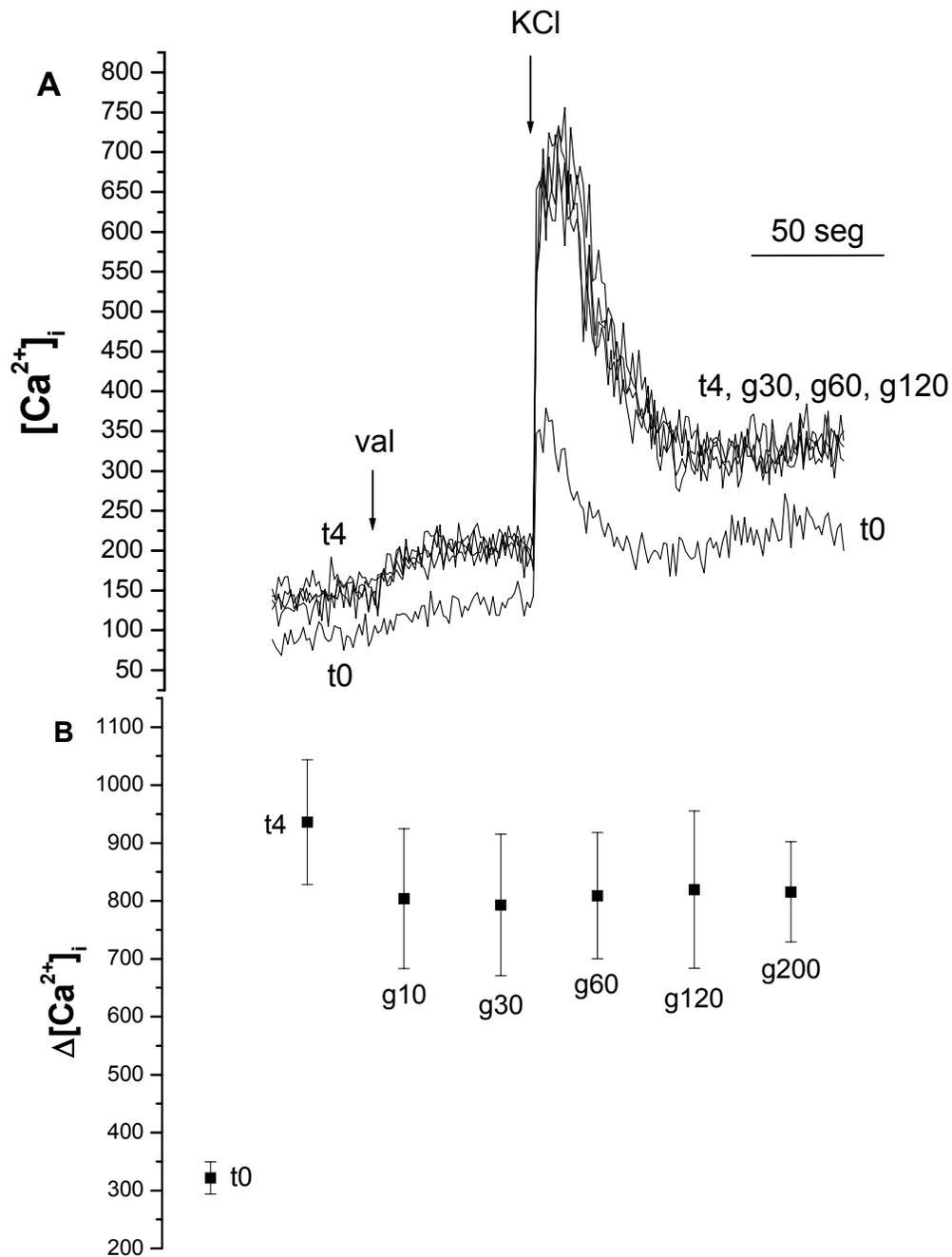


Figura 11. Efecto de la genisteína en el influjo de calcio dependiente de voltaje. Registro de calcio intracelular en espermatozoides no capacitados (t0) y capacitados (t4). (A) Los espermatozoides capacitados fueron tratados con genisteína a 10, 30, 60, 120 y 200 μ M durante la incubación en HSM, posteriormente se llevaron a cabo los registros con influjo de calcio dependiente de voltaje. (B) Diferencias entre los picos de calcio intracelular inducido por despolarización en espermatozoide no capacitado (t0) y capacitado (t4) con (g10, g30, g60, g120 y g200) y sin genisteína. De acuerdo al análisis de varianzas (ANOVA), no hay diferencia significativa entre las medias de cada tratamiento en el espermatozoide capacitado ($p= 0.95$; $n= 5$).

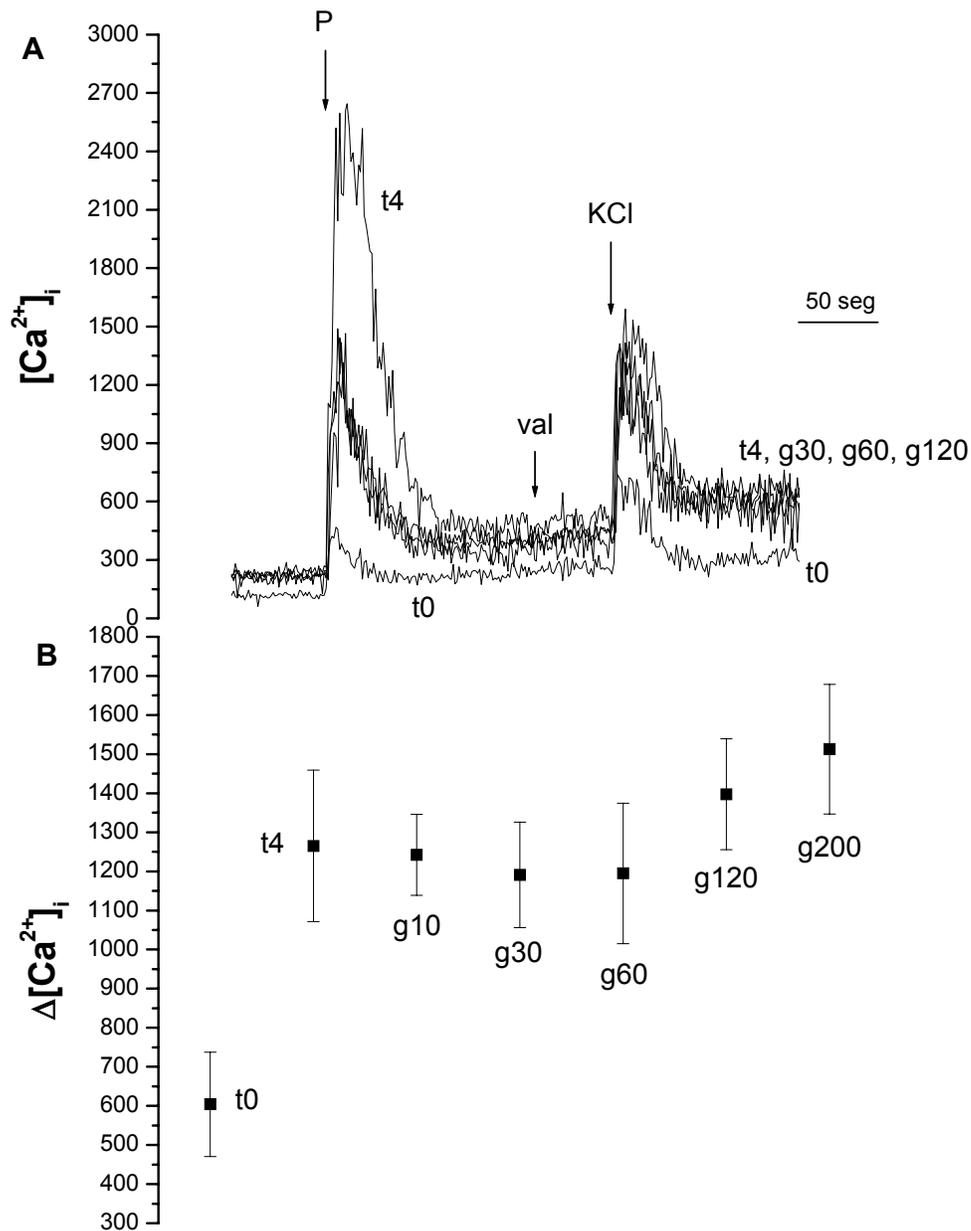


Figura 12. Efecto de la genisteina sobre los CCDV estimulados por progesterona. Registro de calcio intracelular en espermatozoides no capacitados (t0) y capacitados (t4). (A) Los espermatozoides capacitados fueron tratados con genisteina a 10, 30, 60, 120 y 200 μ M durante la incubación en HSM, posteriormente se llevaron a cabo los registros con influjo de calcio inducidos por progesterona (P) y dependiente de voltaje (KCl). (B) Diferencias entre los picos de calcio intracelular inducido por despolarización en espermatozoide no capacitado (t0) y capacitado (t4) con (g10, g30, g60, g120, g200) y sin genisteina. De acuerdo al análisis de varianzas (ANOVA), no hay diferencia significativa entre las medias de cada tratamiento en el espermatozoide capacitado ($p= 0.70$; $n= 5$).

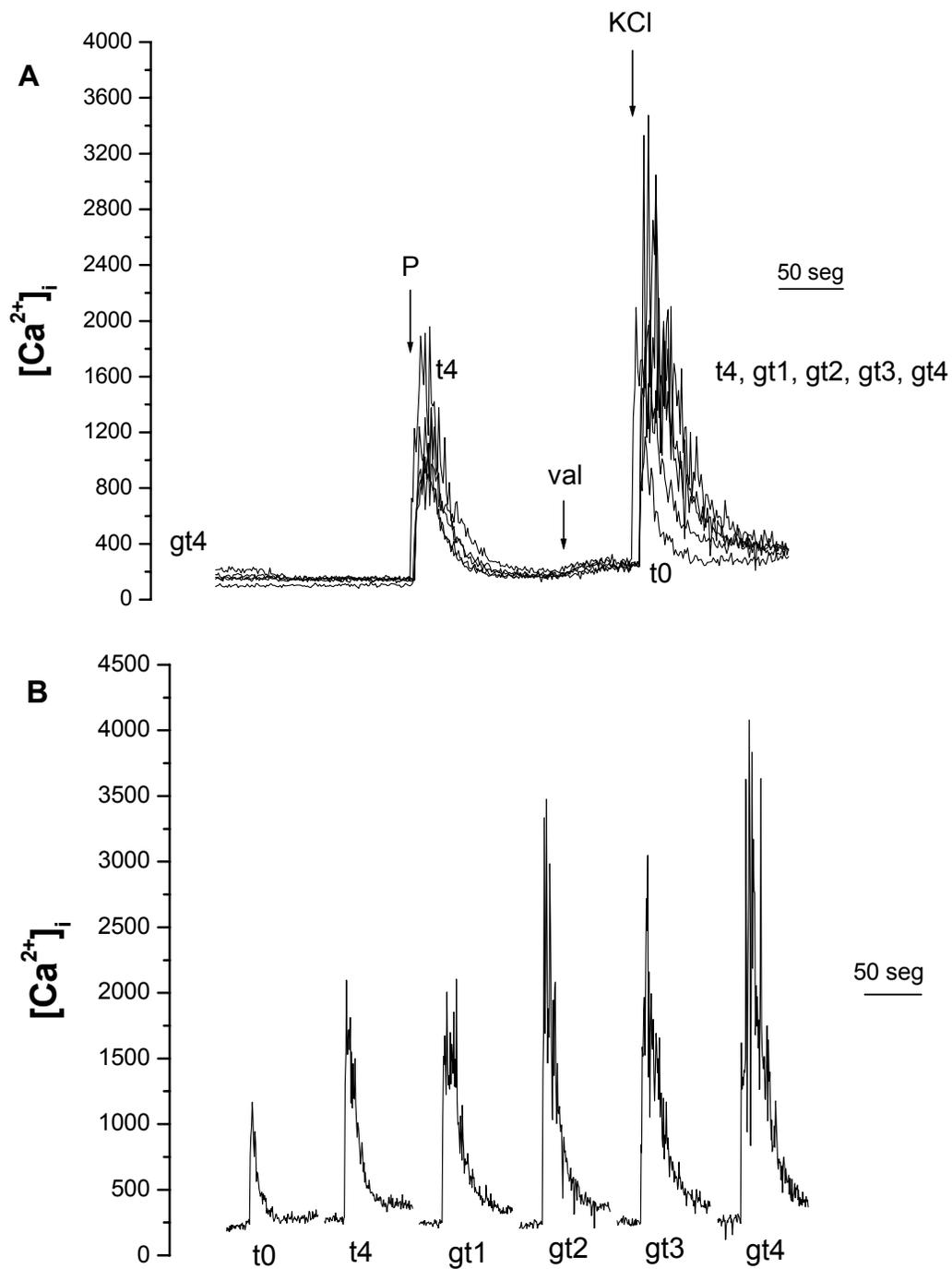


Figura 13. Efecto de $60 \mu\text{M}$ de genisteina en CCDV a diferentes tiempos de incubación. (A) Registros de calcio intracelular en espermatozoides no capacitados sin genisteina (t0), capacitados sin genisteina (t4), con una (gt1), dos (gt2), y tres horas de incubación con genisteina (gt3), además de la adición de genisteina durante el registro (gt4) sobre el influjo de calcio inducido por progesterona (P) y el dependiente de voltaje del espermatozoide humano capacitado. (B) Registros por separado del efecto de la genisteina a diferentes tiempos de incubación sobre los CCDV.

8. Bibliografía.

- [1] Yanagimachi R. (1994) Mammalian Fertilization, en: E. Knobil, J. Neil (Eds.), The Physiology of Reproduction, 2nd edn., Raven Press, NY, pp. 189-217.
- [2] Ho H.C. y Suarez S.S. (2001) Hyperactivation of mammalian spermatozoa: Function and regulation. *Reproduction*. 122: 519-526.
- [3] Dan J.C. (1954) Studies in the acrosome. III. Effect of Ca²⁺ deficiency. *Biol. Bull.* 107: 335-349.
- [4] Darszon A., Labarca P., Nishigaki K.T. y Espinosa F. (1999) Ion channels in sperm physiology. *Physiol. Rev.* 79: 481-510.
- [5] Yanagimachi R. y Usui N. (1974) Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Ex. Cell. Res.* 89: 161-174.
- [6] Cross N.L. (1998) Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 7-11.
- [7] Aitken R.J., Wang Y.F., Liu J., Best F. y Richardson D.W. (1983) The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int. J. Androl.* 6: 180-193.
- [8] Garbers D.L. (1992) Molecular basis of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 719-742.
- [9] Morisawa M. (1994) Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zool. Sci.* 11: 647-662.
- [10] Morisawa M. e Ishida K. (1987) Short-term changes in levels of cyclic AMP, adenylate cyclase, and phosphodiesterase during the initiation of sperm motility in rainbow trout. *J. Exp. Zool.* 242: 199-204.
- [11] Visconti P.E., Moore G.D., Bailey J.L. Leclerc P., Connors S.A., Pan D., Olds-Clarke P. y Kopf G.S. (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a camp-dependent pathway. *Development.* 121: 1139-1150.
- [12] Visconti P. E. y Kopf G.S. (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 1-6.
- [13] Visconti P.E., Bailey J.L., Moore G.D., Pan D., Olds-Clarke P. y Kopf G.S. (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 12: 1129-1137.

- [14] Luconi M., Bonaccorsi L., Krausz C., Gervasi G., Forti G. y Baldi E. (1995) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by platelet-activating factor and progesterone in human spermatozoa. *Mol. Cell. Endocrinol.* 108: 35-42.
- [15] Leyton L., LeGuen P., Bunch D. y Sailing P. (1992) Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11692-11695.
- [16] Pukazhenthil B.S., Wildt D.E., Ottinger M.A. y Howar J. (1998) Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. *Mol. Reprod. Dev.* 49: 48-57.
- [17] Tesarik J., Moos J. y Mendoza C. (1993) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology.* 133: 328-335.
- [18] Guzmán-Grenfell A.M. y González-Martínez M.T. (2004) Lack of voltage-dependent calcium channel opening during the calcium influx induced by progesterone in human sperm. Effect of calcium channel deactivation and inactivation. *J. Androl.* 25: 117-122.
- [19] Baldi E., Casano C., Falsetti C., Rausz C., Maggi M. y Forti G. (1991) Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl.* 12: 323-330.
- [20] Blackmore P.F. (1993) Thapsigargin elevates and potentiates the ability of progesterone to increase intracellular free calcium in human sperm: possible role of perinuclear calcium. *Cell Calcium.* 14: 53-60.
- [21] Mendoza C. y Tesarik J. (1993) A plasma-membrane progesterone receptor in human sperm is switched on by increasing intracellular free calcium. *FEBS Lett.* 330: 57-60.
- [22] Cross N.L. y Razy-Faulkner P. (1997) Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol. Reprod.* 56: 1169-1174.
- [23] Bleil J.D. y Wassarman P.M. (1983) Sperm egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95: 317-324.
- [24] Lee M.A., Trucco G.S., Bechtol K.B., Wummer N., Kopf G.S., Blasco L. y Storey B.T. (1987) Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil. Steril.* 48: 649-658.

- [25] Osman R.A., Andria M.L., Jones A.D. y Meizel S. (1989) Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, pp 828-833.
- [26] Liévano A., Santi C.M., Serrano C.J., Treviño C.L., Bellve A.R., Hernández-Cruz A. y Darszon A. (1996) T-type Ca^{2+} channels and alpha1E expresión in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.* 338: 150-154.
- [27] Santi C., Darszon A. y Hernández-Cruz A. (1996) A dihydropiridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes, *Am. J. Physiol.* 271: C1583- C1593.
- [28] Arnoult C., Zeng Y. y Florman H.M. (1996) ZP3-dependant activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization, *J. Cell. Biol.* 134: 637-645.
- [29] Bonaccorsi L., Luconi M., Forti G. y Baldi E. (1995) Tyrosine kinase inhibition reduces the plateau phase of the calcium increase in response to progesterone in human sperm. *FEBS Lett.* 364: 83-86.
- [30] Tesarik J., Carrera A. y Mendoza C. (1996) Single cell analysis of tyrosine kinase dependent and independent Ca^{2+} fluxes in progesterone induced acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 225-232.
- [31] Blackmore P.F., Neulen J., Lattanzio F. y Beebe J. (1991) Cell surface binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J. Biol. Chem.* 266: 19655-18659.
- [32] Garcia M.A. y Meizel S. (1999) Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type calcium channels. *Biol. Reprod.* 60: 102-109.
- [33] González-Martínez M.T., Bonilla-Hernández M.A. y Guzmán-Grenfell A.M. (2002) Stimulation of voltage-dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 408: 205-210.
- [34] Hagiwara S. y Kawa K. (1984) Calcium and potassium currents in spermatogenic cells dissociated from rat seminiferous tubules. *J. Physiol.* 346: 135-149.
- [35] Arnoult C., Cardullo R.A., Lemos J.R. y Florman H.M. (1996) Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1): 3004-3009.
- [36] Arnoult C., Kazan I.G., Visconti P.E., Kopf G.S., Villaz M. Y Florman H.M. (1999) Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by

egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 6757-6762.

[37] Linares-Hernández L., Guzmán-Grenfell A.M., Hicks-Gomez J.J. y González-Martínez M.T. (1998) Voltage dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. Biochim. Biophys. Acta 1372: 1-12.

[38] Carlson A.E., Westenbroek R.E., Quill T., Dejian R., Clapham D.E., Hille B., Garbers D.L. y Babcock D.F. (2003) CatSper1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 14864-14868.

[39] Quill T.A., Sugden S.A., Kristen L.R., Doolittle L.K., Hammer R.E. y Garbers D.L. (2003) Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 14869-14874.

[40] Hille B. (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. 3a ed. Sunderland, Mass: Sinauer.

[41] Manual de laboratorio para la examinación de semen humano y de interacciones semen-mucus cervical (1987). 2ª ed. Ed. Panamericana. pp. 9-77

[42] Suarez S.S., Wolf D.P. y Meizel S. (1986) Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. Gamete Res. 14: 107-121.

[43] Grynkiewicz G., Poenie M. y Tiesen R.Y. (1985) A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. J. Biol. Chem. 260: 3440-3450.

[44] González-Martínez M.T. (2003) Induction of a sodium-dependent depolarization by external calcium removal in human sperm. J. Biol. Chem. 278: 36304-36310.

[45] Wagoner A.S. (1979) Dye indicators of membrane potential. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 8: 47-68.

[46] Guzmán-Grenfell A.M., Bonilla-Hernández M.A. y González-Martínez M.T. (2000) Glucose induces a Na^+ , K^+ -ATPase-dependent transient hyperpolarization in human sperm. Induction of changes in plasma membrane potential by the proton ionophore CCCP. Biochim. Biophys. Acta. 1464: 188-198.

[47] Hong C.Y., Chiang B.N y Wei Y.H. (1983) Mitochondrial respiration inhibitors and human sperm motility: implications in the development of spermatocytes. Br. J. Clin. Pharmacol. 16: 487-490.

[48] Makler A., Makler-Shiran E., Stoller J., Lissak A., Abramovici H. y Blumenfeld Z. (1992) Use of a scaled mini-chamber to investigate human sperm motility in real time under aerobic and anaerobic conditions. *Arch. Androl.* 29: 255-261.

[49] Wennemuth G., Babcock D.F. y Hille B. (2003) Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *J. Gen. Physiol.* 122, pp 115-128.

[50] Carrera A., Moos J., Ning X.P., Gerton G.L., Tesarik J., Kopf G.S. y Moss S.B. (1996) Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation, *Dev. Biol.* 180: 284-296.

[51] Solomon E. P., Berg L. R. y Martín D. W. (2001) *Biología*. 5ª ed. McGrawhill Interamericana Editores. pp 1053.

[52] Guzmán Grenfell M. A. (2002) Identificación de un sistema de influjo de calcio dependiente de voltaje en el espermatozoide humano: Regulación por progesterona y su participación en la reacción acrosomal. Tesis de doctorado. IPN-ENCB.