



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DEL SODIO INTRACELULAR SOBRE LA
MOVILIDAD DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS
INCUBADOS EN MEDIO SIN CALCIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

GIOVANNI PICAZO JUÁREZ



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. VÍCTOR TORRES FLORES
2009**



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.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Picazo
Juárez
Giovanni
55 46 93 41
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
301014560

2. Datos del tutor

M. en C.
Víctor Manuel
Torres
Flores

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Manuel
Miranda
Anaya

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Jaime Eduardo
Calixto
González

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Miguel Ángel
Palomino
Garibay

6. Datos del sinodal 4

Biol.
Vania Patricia
Carmona
Alcocer

7. Datos del trabajo escrito

Efecto del sodio intracelular sobre la movilidad de espermatozoides humanos incubados en medio sin calcio
57 pp.
2009

**EFEECTO DEL SODIO INTRACELULAR SOBRE LA
MOVILIDAD DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS
INCUBADOS EN MEDIO SIN CALCIO**

Giovanni Picazo Juárez

2009

Gracias a el programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT), por la beca otorgada, en el proyecto titulado “Regulación de la concentración de calcio intracelular en el espermatozoide humano”, clave IN213105.

A mi madre, la persona que más admiro y respeto.
Gracias por cuidarme siempre y apoyarme en todos mis proyectos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero iniciar por agradecer de una forma muy especial al Dr. Marco Tulio González Martínez quien lamentablemente falleció durante el transcurso de la elaboración de este trabajo. Muchas gracias, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su paciencia, por su apoyo, por compartir sus conocimientos conmigo y por su dirección en la elaboración del proyecto.

Gracias al M. en C. Víctor Torres Flores por dirigir esta tesis, por compartirme sus conocimientos, por su comprensión, por su apoyo en la parte experimental del proyecto y en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Manuel Miranda Anaya por brindarme su apoyo durante mi curso en el taller de “ritmos biológicos en animales” durante la licenciatura, así como por sus comentarios para mejorar este trabajo.

Al Dr. Jaime Eduardo Calixto González y al M. en C. Miguel Ángel Palomino Garibay, por su disposición, por su apoyo y comentarios para mejorar este trabajo.

A la Biol. Vania Patricia Carmona Alcocer, por compartir sus conocimientos e instruirme durante mi estancia en el Instituto de Fisiología Celular. Gracias mostrarme la importancia y lo interesante del estudio de los ritmos biológicos, por revisar esta tesis, por tu paciencia, apoyo y amistad.

Al Dr. Raúl Aguilar Roblero por su paciencia y por permitirme estar en su laboratorio durante mi estancia en el Instituto de Fisiología Celular.

A mi madre, Prudencia Juárez por brindarme todo su apoyo incondicional. Eres una gran mujer, gracias por inculcarnos valores y esforzarte en darnos lo mejor a mis hermanos y a mí, te quiero y te admiro.

A mi padre Hilario Picazo y a mis hermanos Hiram y Renata Picazo por apoyarme, por su paciencia, por su comprensión y por todos los momentos que hemos vivido juntos como familia, los quiero mucho.

A mi abuelo Juan Juárez a quien admiro por su incansable lucha por que las cosas sean mejores. Gracias por enseñarme que la educación, la constancia y el trabajo son la mejor vía para lograr el progreso.

A toda la familia Juárez, en especial a mi abuela Sofía Capilla por todos su cariño y cuidados, a mis tíos y tías: Delfino, Napoleón, Jacobo, Joel, Andrés, Ignacio, Rene, José, Caritina, Esther, Juana, Isabel, Claudia y Mirna por participar en mi formación, por brindarme sus cuidados y su apoyo desde mi niñez.

A Alberto Saldaña por la revisión de esta tesis. Gracias por compartir conmigo tu fascinación por la ciencia y la educación, por tu apoyo, por entenderme y por todos los momentos que hemos compartido. Eres alguien muy especial y me da gusto que estés conmigo en esta etapa tan importante de mi vida.

A José Antonio Rodríguez Alba por todo lo que hemos compartido, por pensar en mí, por cuidarme, apoyarme y acompañarme durante gran parte de mi curso en la universidad. Gracias por todo Jogaro, siempre serás especial.

Al Dr. Jorge Iván Rodríguez Martínez por preocuparse por mi educación, pero sobre todo por sus consejos, su apoyo y por compartir conmigo grandes experiencias, eres un gran amigo.

A Iván Cruz Reyes por su amistad, por su apoyo y por escucharme cuando lo he necesitado.

A mi amigo Jorge Arturo Martínez Villegas por su amistad, confianza y apoyo durante prácticamente toda mi licenciatura, a Omar González Zorzano por su amistad y su apoyo durante la realización de mi servicio social en el jardín botánico y Ana Lilia Vázquez por su confianza, apoyo, compañía y amistad.

A Citlalli Fuentes, Tania Gil y Marisol Sánchez, por su amistad, apoyo y estímulo durante toda la licenciatura.

A Erendira Suaste, Beatriz Reyes, Margarita Vargas, Eduardo Torres, Luisrael Santiago y José Luís por su apoyo y amistad.

A Yadira Hernández Rueda por su apoyo en la parte experimental de este proyecto, así como por su compañía y amistad durante mi estancia en el Laboratorio de Biomembranas.

A mi compañera de trabajo Elsa Judith García Espinosa por brindarme su confianza, apoyo y amistad.

A Andrés Nieto, Javier Alamilla, Rocío Martínez, Mónica Martínez, Elizabeth, Prisma, Edgar Molina, Serafín Lumbreras, Pascual Dibella, Fernando Cázarez, Sergio Gutierrez y Daniel G. Ochoa por su amistad.

Por último quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y el Laboratorio de Biomembranas del Depto. De Farmacología la Facultad de Medicina por brindarme un lugar donde estudiar y realizar este trabajo.

A todos por su enorme paciencia y comprensión, por que con ustedes he compartido grandes momentos durante esta etapa de mi vida y de ustedes he aprendido muchas cosas útiles e importantes que han influido en mi formación. Gracias por todo.

Sinceramente

Giovanni Picazo Juárez

2009

INDICE

INDICE GENERAL	i
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1.-MARCO TEORICO	4
1.1.-Estructura del espermatozoide.....	4
1.2.-Maduración espermática.....	7
1.2.1.-Maduración en el epidídimo.....	7
1.2.2.-Maduración en el tracto reproductor femenino.....	8
1.2.2.1.-Capacitación.....	8
1.2.2.2.-Reacción acrosomal.....	9
1.2.2.3.-Movilidad espermática.....	10
1.2.2.3.1.-Movilidad en cero Ca^{2+}	13
1.2.2.3.2.-Cuantificación de la movilidad espermática ...	14
1.3.- Ca^{2+} y Canales de Ca^{2+} en el espermatozoide.....	18
1.3.1.-Papel del Ca^{2+} en el espermatozoide.....	18
1.3.2.-Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.....	20
1.3.3.-Canales CatSper.....	21
1.4.-Espermatozoides incubados en medio sin Ca^{2+}	23
1.5.-Papel del Na^+ del espermatozoide.....	27
2.-JUSTIFICACIÓN	30
3.-HIPÓTESIS	31
4.-OBJETIVOS	32
4.1.-General.....	32
4.2.-Particulares.....	32
5.-MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1.-Aislamiento de los espermatozoides.....	34
5.2.-Análisis de movilidad.....	34
5.3.-Análisis estadístico.....	36

6.-RESULTADOS	37
6.1.-Efecto de la remoción de Ca^{2+} del medio en la movilidad espermática.....	37
6.2.-Determinación de la reversibilidad del efecto de la remoción de Ca^{2+} sobre la movilidad espermática.....	38
6.3.-Preservación de la movilidad espermática en medio sin Ca^{2+}	40
6.4.-Efecto de la valinomicina sobre la movilidad espermática en medio sin Ca^{2+}	42
6.5.-Efecto del mibefradil sobre la movilidad espermática en medio sin Ca^{2+}	43
7.-DISCUSIÓN	44
8.-CONCLUSIONES	49
9.-ANEXO	50
10.-BIBLIOGRAFIA	51

INDICE DE FIGURAS, GRAFICAS Y TABLAS

Figura 1. -Estructura del espermatozoide.....	6
Figura 2. -Patrones de movilidad.....	11
Figura 3. -Vías de señalización que participan en la movilidad espermática de mamíferos.....	13
Figura 4. -Captura sucesiva de imágenes en el sistema CASA.....	15
Figura 5. -Despolarización e incremento de la $[Na^+]_i$ inducidos por remoción de Ca^{2+} del medio.....	25
Figura 6. -Efecto de la adición de Ca^{2+} o $MgCl_2$	26
Gráfica 1. -Efecto de la remoción de Ca^{2+} del medio sobre la movilidad espermática...38	
Gráfica 2. -Reversibilidad del efecto de la pérdida de movilidad espermática.....	40
Gráfica 3. -Preservación de la movilidad espermática en medio sin Ca^{2+}	41
Gráfica 4. -Efecto de la valinomicina en la movilidad espermática.....	42
Gráfica 5. -Efecto del mibefradil en la movilidad espermática.....	43
Tabla I. -Principales valores cinemáticos obtenidos por el sistema CASA.....	17
Tabla II. -Tratamientos aplicados a las muestras de espermatozoides.....	35
Tabla III. - Parámetros de la OMS para la evaluación del semen humano.....	50

ABREVIATURAS

ACs	Adenilato ciclasa soluble.
AMPc	Adenosin monofosfato ciclico.
ATP	Adenosin trifosfato.
CaM	Calmodulinas.
capHSM-H	Medio de capacitación para espermatozoides humanos amortiguado con HEPES
CASA	Computer-Assisted Sperm Analysis.
CatSper	Cation Sperm Channel.
Ca _v	Canales de calcio dependientes de voltaje.
EGTA	Ácido etilén glicol tetracético.
E _m	Potencial de membrana.
ENaCs	Canales epiteliales de Na ⁺ .
GMPc	Guanosin monofosfato ciclico.
HEPES	4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-ácido etanosulfónico
HTF	Fluido Tubal Humano.
IP ₃	Inositol trifosfato.
NCX	Intercambiadores de Na ⁺ /Ca ²⁺ .
OMS	Organización mundial de la salud.
pH _i	pH intracelular.
PKA	Proteína cinasa A.
PMCA _s	ATPasas de Ca ²⁺ .
RA	Reacción acrosomal.
RNE	Envoltura nuclear redundante.
sNHE	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺ .
Na _v	Canales de sodio dependientes de voltaje.
ZP	Zona pelúcida.
ZP3	Glicoproteína 3 de la zona pelúcida.

RESUMEN

La movilidad es necesaria para que el espermatozoide pueda alcanzar y fecundar al óvulo. En los mamíferos, los espermatozoides eyaculados son móviles, pero no son capaces de unirse y fecundar al óvulo; para esto el espermatozoide de mamíferos debe experimentar procesos fisiológicos como la hiperactivación de la movilidad, la capacitación y la reacción acrosomal. En estos procesos se producen cambios que involucran la modulación de los mecanismos de entrada de Ca^{2+} al interior del espermatozoide. (González-Martínez, 2003).

Se ha reportado que el espermatozoide de humano experimenta una despolarización del potencial de membrana que es acompañada por un incremento en la concentración de sodio intracelular ($[\text{Na}^+]_i$) y un decremento de la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) causados por remoción de Ca^{2+} del medio. El aumento de Na^+ lleva a la posible activación de la ATPasa Na^+/K^+ , que produce una hiperpolarización sensitiva a ouabaina cuando el Ca^{2+} es restaurado.

En el presente trabajo se estudió el efecto del influjo de Na^+ y la despolarización del potencial de membrana, ambos provocados por la remoción del Ca^{2+} , en la movilidad del espermatozoide humano mediante el uso del sistema CASA, que permite la cuantificación de los niveles de movilidad espermática.

Los resultados muestran que la remoción de Ca^{2+} del medio reduce la movilidad espermática en pocos minutos, un efecto que es reversible, y que esta relacionado al incremento de la $[\text{Na}^+]_i$. En medio bajo en Na^+ o adicionado con MgCl_2 se inhibe la despolarización y el incremento de la $[\text{Na}^+]_i$, además la movilidad es preservada, indicando que su decremento esta relacionado a la carga de Na^+ o a la despolarización. Por otra parte cuando el potencial de membrana fue fijado con valinomicina, la remoción de Ca^{2+} provocó un decremento de la movilidad espermática indicando que esta disminución está relacionado al incremento de Na^+ y no a la despolarización del potencial de membrana.

Por último, el mibefradil, un bloqueador de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, es capaz de preservar también la movilidad espermática.

Probablemente el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ inducido por remoción de Ca^{2+} del medio estimula la función de la ATPasa Na^+/K^+ disminuyendo los niveles de ATP, lo cual puede contribuir a la pérdida de la movilidad.

INTRODUCCIÓN

El espermatozoide y el óvulo tienen que interactuar para que ocurra la fecundación, quizá el evento biológico más importante en las especies con reproducción sexual.

En los mamíferos, los espermatozoides eyaculados son móviles, pero todavía no cuentan con la capacidad para unirse y fecundar al gameto femenino. Para poder fecundar el óvulo el espermatozoide de mamíferos debe experimentar procesos fisiológicos como la capacitación, hiperactivación de movilidad, y reacción acrosomal (Alberts, 2004). En estos procesos suceden cambios que involucran la modulación de los mecanismos de entrada de Ca^{2+} . (González-Martínez, 2003). El Ca^{2+} extracelular juega un papel importante en la movilidad, ya que es requerido para la iniciación y mantenimiento de la movilidad hiperactivada (Suarez y cols., 1993).

El espermatozoide de mamíferos presenta dos formas generales de movilidad: la activada y la hiperactivada. En la mayoría de las especies, los espermatozoides maduros se mantienen inmóviles dentro del epidídimo hasta que son liberados durante la eyaculación con lo cual comienzan rápidamente a nadar, este proceso es conocido como activación de la movilidad.

Registros hechos mediante patch clamp en el espermatozoide de ratón en gotas citoplasmática muestran que el flagelo del espermatozoide contiene un canal selectivo de Ca^{2+} dependiente de voltaje y activado por alcalinidad llamado CatSper (Cation Sperm Channel).

Espermatozoides que pierden este canal o presenta defectos en los heterotetrameros que lo conforman son incapaces de presentar movilidad hiperactivada bajo condiciones de capacitación, por lo cual los machos son infértiles.

Se ha visto que en ausencia de Ca^{2+} externo, este canal conduce Na^+ en una manera independiente del voltaje (Kirichok y cols., 2006).

En el laboratorio de Biomembranas de la Facultad de Medicina de la UNAM, se ha observado que la remoción de Ca^{2+} del medio extracelular causa una disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, provoca una despolarización del potencial de membrana que es dependiente de Na^+ (González-Martínez, 2003) y un incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ (Torres-Flores y cols., 2008).

Probablemente la despolarización y el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$, ambos inducidos por remoción de Ca^{2+} externo, pueden deberse a la apertura del CatSper en medio sin Ca^{2+} .

Consecuentemente, el CatSper puede contribuir a el establecimiento de la $[Ca^{2+}]_i$ en reposo (*Torres-Flores y cols., 2008*).

En esta tesis se explora el papel que puede tener la despolarización de membrana y el incremento en la $[Na^+]_i$ sobre la movilidad en espermatozoides humanos en medio sin Ca^{2+} .

1.-MARCO TEÓRICO

1.1.-ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es el producto final de la gametogénesis masculina. Se trata de una célula con un núcleo haploide. Morfológicamente puede ser dividido en dos componentes principales: la cabeza y el flagelo o cola. La cabeza de los espermatozoides de mamífero presenta importantes variaciones en la forma entre las diferentes especies. Por ejemplo, es ovoide y discoidal en conejo, toro y cerdo; falciforme en ratón, rata y hámster, y algo aplastada y elipsoide en el hombre. En el espermatozoide humano la cabeza tiene una longitud de 5-6 μm y su ancho va de 2.5-3.5 μm (Álvarez, 2003).

En la cabeza se distingue: el núcleo, el acrosoma, una pequeña cantidad de estructuras citoesqueléticas y un reducido citoplasma (Figura 1).

El acrosoma es una vesícula, membranosa y aplanada que cubre la parte superior del núcleo (30-70% en humanos), variando considerablemente su tamaño y forma entre las distintas especies, es derivada del aparato de Golgi y contiene enzimas como la acrosina que digieren proteínas y glúcidos complejos. Las enzimas almacenadas en el acrosoma son utilizadas para degradar y atravesar la cubierta externa del gameto femenino (Álvarez, 2003).

El flagelo del espermatozoide de mamífero esta constituido por cuatro regiones distintas: el cuello o pieza conectiva, la pieza intermedia, el segmento principal y el terminal. La longitud total del flagelo en humanos es de 55-60 μm y un diámetro de 1 μm en la pieza intermedia. Los principales componentes en el flagelo son el axonema, el complejo mitocondrial, la vaina fibrosa y las fibras densas externas.

La cabeza del espermatozoide se conecta con el flagelo a través de una estrecha franja conocida como cuello. Las partes principales del cuello son el capítulo, columnas estriadas, placa basal y anillo posterior. Estas estructuras están alineadas con el centriolo, estructura de la que se originan las fibras y microtúbulos de la cola, y que sirve como centro organizador en la formación del axonema y columnas estriadas.

El centro del axonema consiste en dos microtúbulos centrales rodeados por una hilera de nueve dobletes de microtúbulos. En realidad sólo un microtúbulo de cada doblete

esta completo, el otro tiene forma de C. Estos protofilamentos están formados por dímeros de las proteínas α y β -tubulina (Álvarez, 2003; Alberts y cols. 2004).

Aunque la tubulina es la base de la estructura del flagelo, otras proteínas también son críticas para la función flagelar. La fuerza del impulso del espermatozoide es proporcionado por la dineína, una proteína adherida a los microtúbulos. La dineína hidroliza moléculas de ATP y convierte la energía química liberada en energía mecánica que impulsa al espermatozoide. Esta energía permite el deslizamiento del doblete externo de microtúbulos, haciendo que el flagelo se doble.

Otra proteína flagelar de importancia parece ser la histona H1 que estabiliza a los microtúbulos del flagelo de tal modo que no lleguen a desensamblarse.

La organización “9 + 2” de los microtúbulos con brazos de dineína ha sido conservada en los axonemas a través de todos los eucariontes, lo que sugiere que esta organización es sumamente efectiva en la transmisión de energía para el movimiento (Alberts y cols. 2004; Gilbert, 2006.)

Tras el cuello, el flagelo presenta una región llamada pieza intermedia, que contiene, bajo la membrana plasmática, mitocondrias dispuestas helicoidalmente que envuelven el axonema, y que son las responsables de producir el ATP necesario para agitar el flagelo e impulsar al espermatozoide.

Otras estructuras presentes en el flagelo son las llamadas fibras densas externas, que en número de nueve rodean el complejo del axonema a lo largo de la pieza intermedia y parte del segmento principal. En la pieza principal sólo recorren el flagelo 7 fibras densas, que confieren propiedades elásticas que facilitan la propagación del movimiento ondulatorio a través del flagelo y además fortalecen la cola del espermatozoide (Álvarez, 2003).

La estructura del citoesqueleto, característica de espermatozoides de mamífero, consiste en un cilindro hueco formado por dos columnas longitudinales unidas por anillos circulares. Las columnas se sitúan en la región en la que dos de las fibras densas no están presentes, recorriendo toda la pieza principal. Los anillos de la vaina están compuestos por filamentos orientados circularmente que presentan un fuerte empaquetamiento. El grosor de estos anillos disminuye conforme se aproximan al extremo de la cola, terminando abruptamente en la parte final del segmento principal. La vaina fibrosa parece estar implicada en la modulación del plano de batido del flagelo espermático. Finalmente, el segmento terminal presenta una ausencia total de estructuras excepto los túbulos del axonema.

La membrana plasmática del espermatozoide está subdividida en regiones perfectamente definidas que difieren en composición y función. La membrana del espermatozoide contiene altas concentraciones de fosfolípidos unidos a ácidos grasos insaturados de cadena larga, también contiene importantes concentraciones de colesterol, molécula que juega un papel clave en la modulación de la fluidez de la membrana. Los ácidos grasos libres y glicolípidos son poco abundantes. Los principales dominios de la membrana plasmática en la cabeza de la mayoría de los espermatozoides de mamíferos son la región acrosomal (parte anterior de la cabeza) y región postacrosomal (parte posterior de la cabeza y pieza conectiva). A su vez, la región acrosomal se subdivide en segmento marginal (cubre el extremo anterior de la cabeza), segmento principal (cubre la mayor parte del acrosoma), y segmento ecuatorial (cubre la parte posterior del acrosoma). Los segmentos marginal y principal juntos suelen referirse como “capuchón” acrosomal. En la membrana plasmática del flagelo se puede diferenciar un dominio que cubre la envoltura mitocondrial y otro que se extiende desde la pieza intermedia hasta el extremo de la cola. Estos dominios están separados por el *annulus*, complejo fibroso (parte del citoesqueleto), que parece estar adherido a la superficie interna de la membrana plasmática (Álvarez, 2003; Gilbert, 2006).

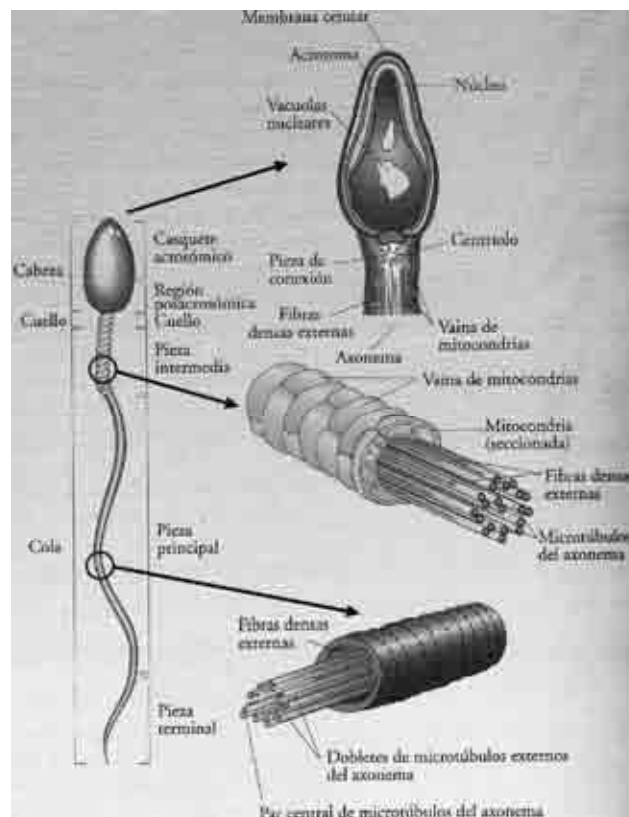


Figura 1. Estructura del espermatozoide (Tomado de Curtis, 2002).

1.2.-MADURACIÓN ESPERMÁTICA

La maduración espermática puede ser definida como el desarrollo de la habilidad del espermatozoide para poder fecundar al ovocito, la cual inicia en el epidídimo y termina en el tracto reproductor femenino (*Cooper, 2007; Sullivan y cols., 2007*).

1.2.1.-MADURACIÓN EN EL EPIDIDÍMO

Cuando el espermatozoide es eyaculado, aun no cuenta con la capacidad para poder fecundar al ovocito; para adquirir una competencia funcional, los espermatozoides deben experimentar un periodo de maduración pos-testicular en el epidídimo (*Baker. y cols., 2003*). Durante su paso y su almacenamiento en el epidídimo, los espermatozoides experimentan una secuencia de cambios morfológicos y bioquímicos, además de cambios en sus características cinemáticas. (*Cooper, 1986*).

El epidídimo es un tubo espiralizado (5-6 m. de longitud, en el caso del hombre) que forma parte del sistema de conductos extratesticulares del sistema reproductor masculino; se encuentra empaquetado en un saco de tejido conectivo, que es una extensión de la túnica albugínea; ubicado entre el conducto eferente y el conducto deferente; este último se comunica a la vez con la uretra, la cual desemboca en el exterior del cuerpo (*Gartner y Hiatt, 2002; Hernández, 2008*).

El epidídimo puede ser dividido en tres regiones: la cabeza, el cuerpo y la cauda o cola. En cada región se realizan distintas funciones, en la cabeza y en el cuerpo, se producen los eventos de maduración temprana y tardía, respectivamente, mientras que la cauda es principalmente un sitio de almacenamiento para los espermatozoides funcionalmente maduros. Se ha demostrado mediante estudios de perfil de genes, que en el epidídimo de humano existe una determinada expresión de RNAm y proteínas específica de cada región. (*Cornwall., 2009*).

Una de las funciones principales del epidídimo es la secreción de proteínas denominadas factores estabilizantes del acrosoma o factores discapacitantes, cuya función es evitar que se dé la reacción acrosomal (RA) en el tracto reproductor masculino (*Jones. 1998*).

El cambio en la morfología de los espermatozoides que ha mostrado ser más constante en las diferentes especies de mamíferos, es la migración de la gota citoplasmática desde

una posición proximal hasta una posición distal en la pieza intermedia, y su posterior desprendimiento del flagelo. Otros cambios morfológicos, que se han descrito son cambios en el tamaño, la forma y estructura interna del acrosoma de los espermatozoides durante su tránsito a través del tracto genital masculino.

Entre los cambios bioquímicos que ocurren se encuentran modificaciones en la composición lipídica de los espermatozoides y especialmente de sus membranas las cuales varían durante su paso a través del epidídimo: la cantidad de colesterol disminuye mientras aumentan las de desmosterol y sulfato de colesterol. También cambia la composición en fosfolípidos y ácidos grasos (*Álvarez, 2003*).

La actividad metabólica de los espermatozoides también se ve modificada durante su trayecto por el epidídimo: se da una modificación en su actividad glicolítica y en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) como resultado de la actividad de la enzima adenilato-ciclasa y una disminución de la fosfodiesterasa de AMPc (*Hoskins y Vijayaraghavan, 1990; Hernández, 2008*)

1.2.2.-MADURACIÓN EN EL TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO

Como se menciona anteriormente para que el espermatozoide logre fecundar al óvulo, los espermatozoides deben pasar por tres procesos: la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosomal (RA). Estos estadios finales de la maduración del espermatozoide no se producen hasta que estos se encuentran dentro del tracto reproductor femenino por un cierto período de tiempo (*Gilbert, 2006*).

1.2.2.1.-CAPACITACIÓN

La capacitación es definida como la serie de transformaciones que el espermatozoide experimenta durante su migración a través del tracto genital femenino, para poder alcanzar y unirse a la zona pelúcida (ZP), experimentando la RA y fertilizando al ovocito (*Lamirande y cols., 1997*). La capacitación involucra varios cambios en el espermatozoide, entre los que se incluyen: reorganización de la membrana plasmática como una consecuencia del removimiento del colesterol, debido al contenido rico en albúmina y lipoproteínas de alta densidad (HDL) del fluido oviductal. Estos dos componentes son capaces de retirar el colesterol de la membrana del espermatozoide, lo

que la hace más fluída y permeable, dando lugar a un aumento en el transporte de HCO_3^- al interior de la célula (Neri-Vidaurre, 2007).

El HCO_3^- activa una adenilato ciclasa soluble (ACs), también dependiente de Ca^{2+} (Litvin y cols., 2003), consecuentemente, se produce AMPc a partir de ATP, que a su vez activa a la PKA (Proteína cinasa A) dando como resultado un incremento en la fosforilación de proteínas y en la activación de una cinasa de tirosina, de esta forma la capacitación y la fosforilación de tirosinas han mostrado ser reguladas por la vía que involucra a la PKA dependiente de AMPc (Visconti y cols., 2002).

Por otra parte durante la capacitación destaca un ligero aumento en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, de alrededor de 80 nM, una ligera alcalinización del pH_i , que va de pH_i 6.7 a pH_i 6.85, así como una hiperpolarización del potencial de membrana que va de ~ -40 mV en espermatozoides no capacitados a ~ -80 mV durante la capacitación, (Darszon y cols. 2006; Neri-Vidaurre, 2007).

Finalmente la capacitación también se asocia con la aparición de la movilidad hiperactivada, la cual algunos autores consideran parte de la capacitación (Visconti y cols., 2002; Suarez y Ho, 2003). Todos estos cambios preparan al espermatozoide para responder a la ZP, la capa extracelular del ovocito que induce la RA.

1.2.2.2.-REACCIÓN ACROSOMAL

Una vez capacitado, el espermatozoide es susceptible de presentar RA inducida fisiológicamente, por la ZP3, una glicoproteína de la ZP que rodea al ovocito, y por la progesterona, una hormona esteroide presente en el líquido folicular producida por las células de la granulosa que acompañan al ovocito (Baldi y cols., 1996; González-Martínez y cols., 2002). Este proceso es acompañado por la liberación de enzimas líticas, principalmente acrosina, y por la fusión del acrosoma con la membrana plasmática en la cabeza del espermatozoide.

La RA se dispara por un influjo de Ca^{2+} que incrementa el calcio intracelular y hace que se fusionen la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide con la membrana acrosómica externa, próxima a ella. El proceso de fusión parece involucrar la activación de proteínas de intercambio de nucleótidos dependiente de AMPc, una ruta metabólica que no utiliza a la PKA (Branham y cols., 2006; Neri-Vidaurre, 2007).

Existen dos principales mecanismos por los cuales el espermatozoide incrementa el Ca^{2+} citosólico. El primero es un influjo de Ca^{2+} a través de canales iónicos en la

membrana plasmática, en tanto que el segundo utiliza un incremento en el Ca^{2+} citosólico a través de un eflujo de Ca^{2+} secuestrado dentro de almacenes intracelulares vía canales operados por ligando en organelos membranosos (*Darszon y cols., 2006*). Se ha visto que el espermatozoide de ratón capacitado secuestra altos niveles de Ca^{2+} dentro del acrosoma, y que este almacenamiento es mantenido por una ATPasa de Ca^{2+} acrosomal, la movilización de este Ca^{2+} almacenado es suficiente para disparar la exocitosis acrosomal (*Herrick, 2005*).

Durante la RA también se eleva el pH_i , se producen cambios en el potencial de membrana, se involucran procesos como fosforilación de proteínas, metabolismo de fosfolípidos y niveles de AMPc (*Darszon y cols., 2006*).

1.2.2.3.-MOVILIDAD ESPERMÁTICA

El espermatozoide de mamíferos tiene dos formas generales de movilidad: la activada y la hiperactivada.

En la mayoría de las especies, el espermatozoide maduro se mantiene inmóvil dentro del epidídimo hasta que son eyaculados con lo cual comienzan rápidamente a nadar, este proceso es conocido como “activación de la movilidad”.

El flagelo de un espermatozoide con “movilidad activada” genera un batido de baja amplitud que impulsa al espermatozoide en una trayectoria más o menos en línea recta en un medio relativamente no viscoso, como lo es el plasma seminal (Figura 2a). Es probable que esta forma de movilidad ayude a la propulsión del espermatozoide durante estados iniciales de su trayecto a través del tracto reproductor femenino. Esto es estimulado por fosforilación de Ser/Thr y Tyr de proteínas flagelares. La cascada de fosforilación es regulada en parte por la vía de la ACs/PKA.

La movilidad hiperactivada es observada en espermatozoides aislados de regiones superiores del tracto reproductor femenino. En un espermatozoide hiperactivado, la amplitud del batido flagelar se incrementa, lo cual produce un patrón de batido que es altamente asimétrico, causando que el espermatozoide nade en “forma de ocho” en un medio de baja viscosidad como el plasma seminal (Figura 2b), mientras que en un medio de alta viscosidad como el del oviducto, la movilidad hiperactivada es más progresiva (Figura 2c) (*Darszon y cols., 2006*).

En contraste el batido de un espermatozoide activado es insuficiente para impulsar progresivamente al espermatozoide a través del oviducto (*Yanagimachi, 1970*).

La movilidad hiperactivada, es crítica para la fertilización ya que ayuda al espermatozoide a separarse del epitelio oviductal y a la progresión del espermatozoide a través del medio altamente viscoso del tracto reproductor femenino, además de que es requerida para la penetración de la zona pelúcida (Suarez y Ho, 2003; Suarez, 2008;). Por otra parte este tipo de movilidad a menudo se asocia con el inicio de la capacitación, sin embargo se ha observado que estos dos procesos son separados o divergen por que la hiperactivación y la capacitación pueden ocurrir independientemente una de la otra (Turner, 2006).

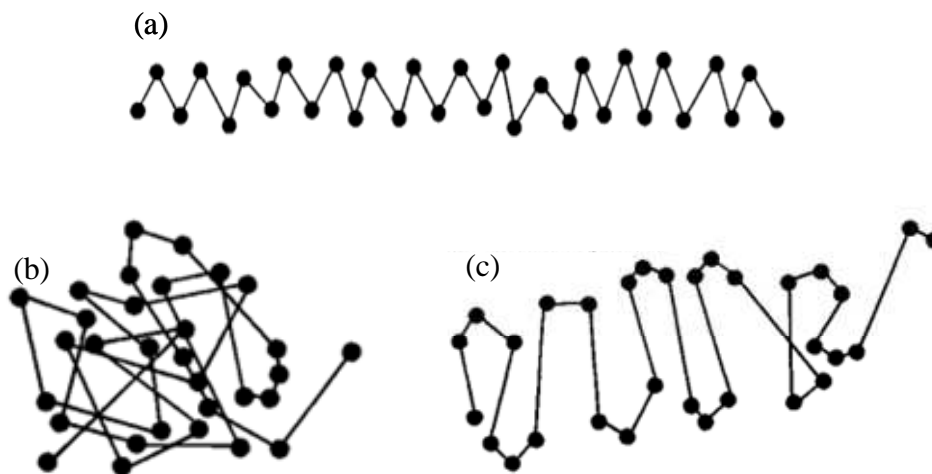


Figura 2. Patrones de movilidad. Espermatozoides no hiperactivados presentan trayectorias más o menos regulares (a). Los espermatozoides hiperactivados en un medio de baja viscosidad presentan trayectorias menos progresivas (b), en tanto que en medio de alta viscosidad, la movilidad hiperactivada es más progresiva(c) (Modificado de Mortimer, 2000).

El Ca^{2+} extracelular se requiere para la movilidad en muestras de espermatozoides extraídos del epidídimo, así como para el inicio y mantenimiento de la movilidad hiperactivada por regulación directa de componentes de la maquinaria axonemal. Por ejemplo en el espermatozoide hiperactivado de hámster, se registraron incrementos transitorios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y se correlacionaron con la frecuencia de batido flagelar (Suarez y cols., 1993). El Ca^{2+} que provoca estos incrementos transitorios parece ser liberado de la envoltura nuclear redundante (RNE), una estructura reticular en el cuello del flagelo. Por otra parte en espermatozoides humanos inmovilizados, un gradiente de progesterona estimula oscilaciones sostenidas en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se originan desde la región de la cabeza del espermatozoide que contiene el RNE. Las oscilaciones correlacionadas con

incrementos en la actividad flagelar que son comparables a éstas ocurren durante la hiperactivación; las oscilaciones de Ca^{2+} son dependientes de la actividad del receptor de rianodina (RyR) (*Darszon y cols., 2006*).

Un mecanismo por el cual el Ca^{2+} está directamente relacionado a la función flagelar es a través de la regulación de la Adenilato ciclasa soluble (ACs), la cual genera AMPc para activar a la proteína cinasa A (PKA). La ACs es requerida para la movilidad espermática siendo es sensible a HCO_3^- y Ca^{2+} . Así, a través de la ACs, la señal del Ca^{2+} puede unirse con la señalización por PKA como parte de una misma vía de señalización. Un mecanismo probable de acción de la PKA es la fosforilación de residuos Ser/Thr de proteínas blanco de la PKA resultando en la activación de una tirosina cinasa o cinasa, no identificada aun, cuyo blanco se localiza en el flagelo (Figura 3). La fosforilación de tirosinas de un conjunto específico de proteínas flagelares da como resultado la movilidad. Un blanco conocido es la dineína axonemal y la fosforilación de esta proteína es un punto regulatorio crítico en la iniciación de la movilidad flagelar (*Turner, 2006*).

Sin embargo, existen datos que sugieren que alguna vía de Ca^{2+} es independiente de la vía de la PKA. En el espermatozoide se han detectado calmodulinas (CaM), estas son proteínas altamente conservadas que sirven clásicamente como receptores de calcio intracelular. Al menos algunos de los efectos del calcio en el flagelo, son probablemente alcanzados a través de CaM, debido a que la inhibición de CaM provoca un decremento en la movilidad espermática. El efecto de la CaM en la movilidad no es alcanzado vía ACs. Lo anterior sugiere la existencia de al menos dos vías de calcio: una que es independiente de CaM como lo es la de la ACs/PKA y otra que es dependiente de CaM. La delección del gen de la ACs resulta en espermatozoides inmóviles, en este caso las CaM no pueden compensar la pérdida de la función de la ACs. Sin embargo, existen datos que sugieren que agonistas de la vía de la PKA pueden restaurar la movilidad cuando las CaM son inhibidas. Así, componentes de la vía de la ACs pueden compensar la pérdida de la función en componentes de la vía Ca^{2+} /CaM (*Si y Olds-Clarke, 2000; Turner, 2006*).

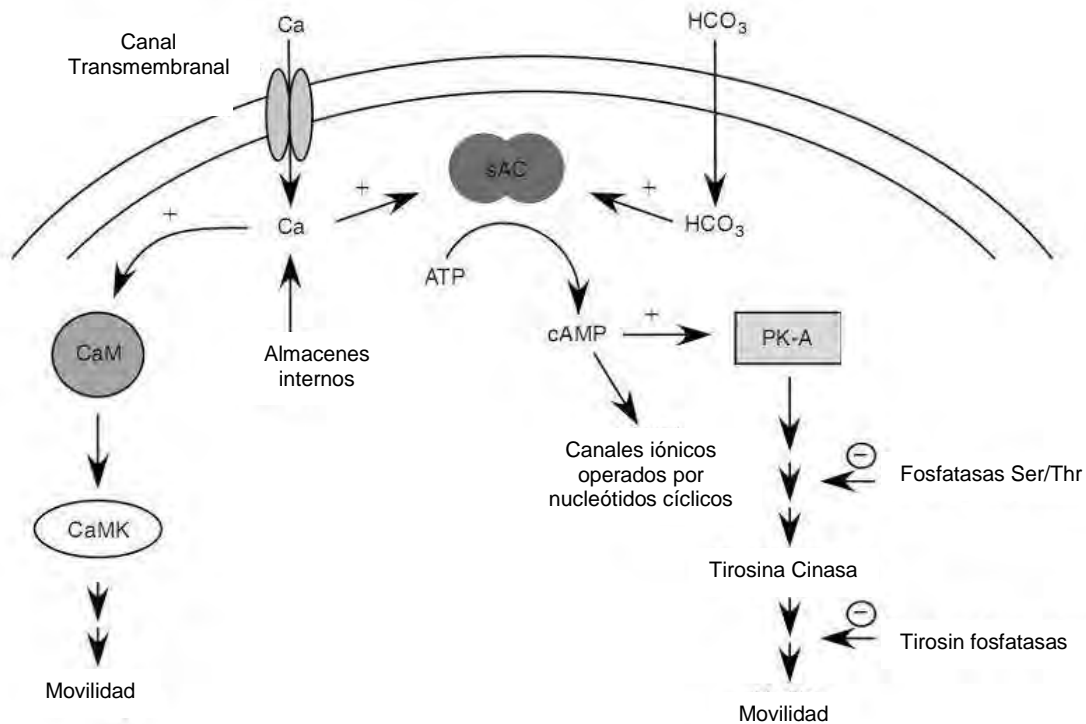


Figura 3. Representación esquemática de las vías de señalización conocidas que participan en la regulación de la movilidad espermática de mamíferos (Modificado de Turner, 2006).

1.2.2.3.1.-MOVILIDAD EN CERO Ca^{2+}

Registros hechos mediante Patch Clamp en gotas citoplasmáticas de espermatozoides de ratón muestran que el flagelo del espermatozoide contiene un canal selectivo de Ca^{2+} llamado CatSper que es activado por voltaje y alcalinidad (Cation Sperm Channel). Espermatozoides que pierden este canal o presenta defectos en los heterotetrameros que lo conforman son incapaces de presentar movilidad hiperactivada bajo condiciones de capacitación, por lo cual los machos son infértiles.

Estudios realizados con ratones knockout para CatSper 3 y 4 demuestran que en medio HTF estos espermatozoides no desarrollan movilidad hiperactivada, incluso 2 horas después de estar en el medio, a diferencia del tipo silvestre que si desarrollan movilidad hiperactivada después de los primeros 30 minutos al ser incubados en este medio. Sin embargo, cuando se transfieren los espermatozoides de medio HTF a medio libre de Ca^{2+} y cationes divalentes, los espermatozoides de tipo silvestre llegan a ser inmóviles dentro de 15 minutos, en tanto que los espermatozoides de ratones knockout para CatSper 3 y 4 aun muestran movilidad. Sugiriendo que en ausencia de CatSper 3 y 4 la

movilidad inicial puede ser sostenida cuando el Ca^{2+} extracelular no esta disponible (*Jin y cols., 2007*).

Estos hallazgos implican que almacenes de Ca^{2+} interno juegan un papel supliendo Ca^{2+} para la movilidad espermática en medio sin Ca^{2+} y acorde a los resultados que se han obtenido en estos estudios, se elevan las posibilidades de que un incremento en el contenido de Na^+ intracelular, una despolarización el potencial de membrana (*Espinosa y Darszon, 1995; González-Martínez, 2003*), o ambos puedan inhibir la liberación de Ca^{2+} de almacenes internos en espermatozoides normales(*Torres-Flores, 2008*).

1.2.2.3.2.-CUANTIFICACIÓN DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA

La movilidad espermática constituye uno de los parámetros fundamentales para valorar la calidad de una muestra seminal. La evaluación de esa calidad se basa en la movilidad lineal y porcentaje de espermatozoides dotados de movimiento. Actualmente existen dos formas de evaluar la movilidad espermática: subjetiva u objetivamente. La valoración subjetiva se realiza colocando la muestra de espermatozoides sobre un portaobjetos o con una cámara de Makler y observando con un microscopio óptico; la estimación se hace directamente y el observador califica la movilidad mediante la siguiente clasificación según la OMS: A, movilidad lineal; B, movilidad curvilínea; C; movilidad *in situ* y D, inmóviles (*WHO, 1999*).

La valoración objetiva se realiza mediante sistemas semiautomáticos y automáticos denominados genéricamente CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) mediante la adquisición de imágenes sucesivas que proporcionan la posición puntual de los espermatozoides en distintos tiempos y la unión de estos puntos origina trayectorias rectilíneas que definen el tipo de desplazamiento espermático. Este tipo de valoración introduce precisión y datos cuantitativos sobre la cinética de los espermatozoides (*Hernández, 2008*).

Los componentes comunes del CASA son: una video cámara, una tarjeta de captura de cuadros de video y una computadora; se usa un software de computadora para identificar y seguir a todos los espermatozoides en las imágenes del video y muestra todos los datos calculados.

Primero, la imagen obtenida del campo del microscopio es enviada a la cámara y es convertida a una imagen digital. La forma más fácil para la máquina de detectar al espermatozoide es usando un campo oscuro, con lo cual la cabeza del espermatozoide se

ve blanca sobre el campo oscuro. El brillo de la imagen de la cabeza permanece constante aún cuando el espermatozoide se mueve debido a que la rotación de su cabeza no cambia la intensidad del blanco de la imagen. La imagen de cada cabeza de espermatozoide es digitalizada, con la computadora, quien determina el número de pixeles que cubre la cabeza del espermatozoide. Existe un rango en el número de pixeles que es aceptable para la cabeza de un espermatozoide, dado el tamaño mínimo y máximo previsto para cada especie, así la computadora reconoce un objeto que cae dentro del rango esperado como la cabeza de un espermatozoide (*Mortimer, 2000*).

A partir de lo anterior el CASA se basa en la captura sucesiva de imágenes de espermatozoides en movimiento, mediante la identificación de la cabeza en un campo obscuro proveniente de un microscopio de contraste de fases (*Mortimer, 2000*).

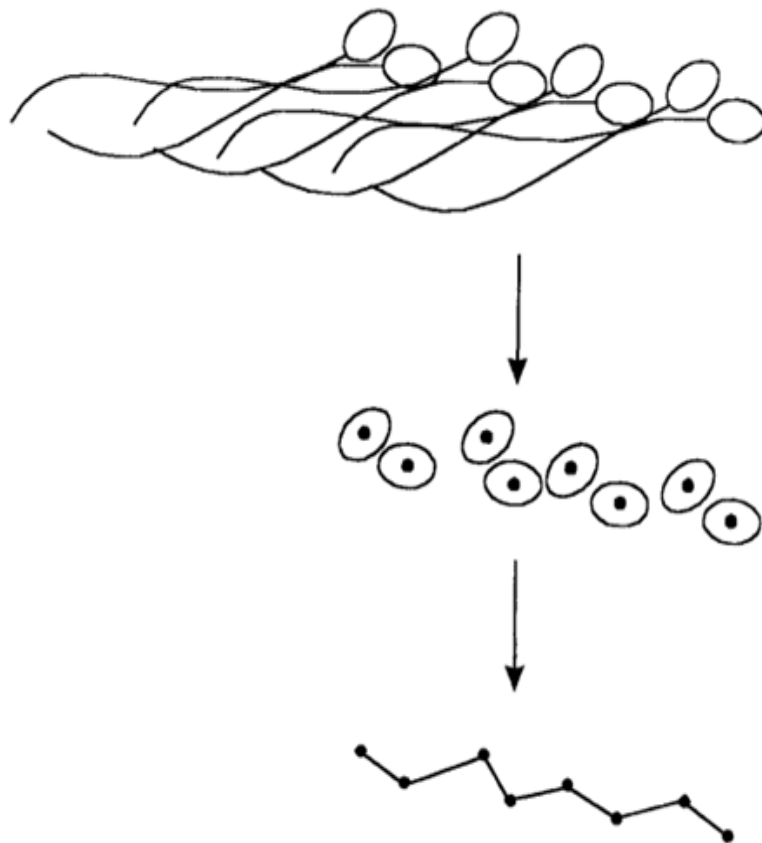


Figura 4. El sistema CASA se basa en la captura sucesiva de imágenes de espermatozoides en movimiento mediante la identificación de la cabeza en un campo obscuro proveniente de un microscopio de contraste de fases (*Mortimer, 2000*).

Existen diversos sistemas de análisis de imagen computarizado en el mercado, y cada uno difiere en el método y algoritmos por los que se obtiene las características del

movimiento espermático, razón por la cuál no se tiene una estandarización de valores normales para todos los CASA (*Hernández, 2008*).

Entre los diferentes CASA se encuentra el *Hamilton Thorne Motility Analyzer*, el cual fue usado para obtener parte de los resultados que se presentan en esta tesis. En este aparato se puede realizar el análisis de movimiento referido a la cabeza espermática y obtener los principales valores cinemáticas que se evalúan a partir de la trayectoria descrita por los espermatozoides, los cuales son mostrados en la tabla I.

Parámetro	Definición
Velocidad Curvilínea (VCL)	Distancia total que la cabeza del espermatozoide recorre en el periodo de observación, es expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$.
Velocidad Rectilínea (VSL)	Distancia en línea recta entre el primer y el último punto de la trayectoria, es expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$.
Velocidad Media de la Trayectoria (VAP)	Distancia que el espermatozoide ha viajado en la dirección promedio del movimiento en el periodo de observación, es expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$.
Linealidad (LIN)	Indica la rectitud de la trayectoria curvilínea, se obtiene de la siguiente forma: $(\text{VSL}/\text{VCL}) * 100\%$.
Rectitud (STR)	Indica la rectitud de la trayectoria media, se obtiene de la siguiente forma: $(\text{VSL}/\text{VAP}) * 100\%$.
Amplitud de la Dislocación Lateral de la Cabeza (ALH)	Anchura del movimiento lateral de la cabeza del espermatozoide (Se calcula como la anchura total de la trayectoria principal) y se expresa en μm .
Frecuencia de Batido Flagelar (BCF)	Indica el número de veces que la velocidad curvilínea cruza la trayectoria media por segundo. En otras palabras, es el número de veces que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección de movimiento y está relacionada con el desarrollo de otra onda flagelar.

Tabla I. Principales valores cinemáticas aportados por el sistema CASA para describir la trayectoria de un espermatozoide (*Mortimer, 2000*).

1.3.- Ca²⁺ Y CANALES Ca²⁺ EN EL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide y el óvulo tienen que interactuar para que ocurra la fecundación, quizá el evento biológico más importante en las especies con reproducción sexual, pues la posibilidad de que las especies subsistan en el tiempo depende del éxito de esta interacción. La forma en la que estos dos gametos, influye el uno sobre el otro, es a través de la regulación del flujo de iones que atraviesan su membrana plasmática, lo cual es parte clave del lenguaje entre ellos. Entre las moléculas de la membrana que permiten el flujo de los iones a través de la membrana tenemos a los canales iónicos. Los canales iónicos son proteínas membranales que forman un poro a través del cual los iones atraviesan las membranas de manera regulada y con gran eficiencia ($\sim 10^7$ - 10^8 iones/seg.). La actividad de estos canales es vital para que las células puedan comunicarse con el mundo externo e interno y entre ellas.

Los gradientes iónicos que se presentan en las membranas de las células no únicamente determinan el potencial de membrana (E_m), si no también permean iones que son capaces de modular enzimas y de influir en la actividad de varios canales, causando cambios adicionales en el E_m y en el flujo de iones.

El E_m regula la tasa y dirección del flujo de iones a través de canales e intercambiadores, modula fluctuaciones de pH_i , $[Ca^{2+}]_i$, y otros segundos mensajeros que tienen una influencia importante en la movilidad flagelar y la RA del espermatozoide. Casi todos los transportadores iónicos y proteínas del espermatozoide se sintetizan durante la espermatogénesis. (*Darszon y cols., 2001; Darszon, 2007*).

1.3.1.-PAPEL DEL Ca²⁺ EN EL ESPERMATOZOIDE

El Ca²⁺ es el mensajero intracelular más común en la señalización celular, está involucrado en la regulación de varias funciones celulares importantes, tales como la secreción, excitación-contracción, transcripción de genes, movilidad, actividad enzimática, transporte, estado de fosforilación de proteínas, así como en varias formas de muerte celular. Existen proteínas sensoras que regulan y detectan la $[Ca^{2+}]_i$, uniéndose reversiblemente y después llevando la señal hacia otros sitios blanco. Existen proteínas que cuentan con sitios de unión al Ca²⁺, entre las que se encuentran las CaM que son de las mejor caracterizadas (*Darszon y cols.2005*).

De los mensajeros intracelulares que son capaces de modular diversos procesos fisiológicos dentro del espermatozoide, podemos mencionar nucleótidos cíclicos (AMPC y GMPc), óxido nítrico y Ca^{2+} . Aunque todos estos mensajeros son de gran importancia, particularmente para la capacitación del espermatozoide, el Ca^{2+} es central.

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regula la RA, el modo de batido flagelar (incluyendo la hiperactivación) y quimiotaxis, a su vez también tiene un importante papel en la capacitación. Así, un espermatozoide debe asegurarse de que cada uno de esta serie de procesos vitales activados por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sea iniciado en el momento apropiado (*Publicover y cols., 2007*).

Las células somáticas pueden generar un patrón espacio-temporal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a diferentes estímulos o diferentes intensidades de estímulo los cuales provocan diferentes señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esto es alcanzado sobre todo por una liberación controlada de Ca^{2+} almacenada en un extenso retículo endoplasmico. Las señales pueden ser localizadas en una zona determinada o bien distribuidas en un mayor rango, movilizand o almacenes de Ca^{2+} a través de la célula.

En el espermatozoide, el retículo endoplasmico y algunos otros organelos membranosos internos son perdidos durante la espermiogénesis. Únicamente el núcleo, el acrosoma y la mitocondria persisten en el espermatozoide maduro (*Publicover y cols., 2007*). Por lo que el influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática es un mecanismo común de la señalización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que explota de manera efectiva los reservorios extracelulares de Ca^{2+} .

La localización selectiva de varios tipos de canales en la membrana plasmática que permiten el influjo de Ca^{2+} proporciona un cierto nivel de flexibilidad en la señalización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La expulsión de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática del espermatozoide se da por medio ATPasas de Ca^{2+} (PMCA) e intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (*Publicover y cols., 2007*).

La proteína de PMCA4 ha sido detectada en espermátidas de rata y en espermatozoide de ratón y se localiza en la pieza principal del flagelo del espermatozoide. Se ha observado que ratones que no cuentan con PMCA4 no desarrollan movilidad hiperactivada, posiblemente debido a la incapacidad de regular la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

El NCX exporta un Ca^{2+} hacia el exterior e importa tres Na^+ hacia el interior, usando energía derivada del gradiente de Na^+ en la membrana celular y así indirectamente de la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ . Evidencia farmacológica indica que la actividad de la NCX es crucial para el mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la movilidad del espermatozoide

humano. Se ha inmunolocalizado a NCX en el área acrosomal y la pieza media (*Publicover y cols., 2007*).

Aunque el espermatozoide haya perdido el retículo endoplasmico, parece que el limitado conjunto de organelos que permanecen pueden proveer a esta célula con al menos dos almacenes intracelulares de Ca^{2+} . El acrosoma del espermatozoide de mamífero tiene receptores IP_3 en su membrana externa y forma un almacén de Ca^{2+} que descarga en el espacio peri-acrosomal. Un segundo almacén de Ca^{2+} parece estar presente en la región del cuello del espermatozoide de mamífero, se trata de la RNE, esta estructura que tiene calreticulina (una proteína de almacenamiento de Ca^{2+}) y receptores IP_3 ; la movilización de Ca^{2+} en este lugar es sensible a rianodina (un canal de Ca^{2+} activado por Ca^{2+}). Se cree que la acumulación y movilización de Ca^{2+} de uno o de ambos almacenes inicia y controla la hiperactivación en el espermatozoide bovino, de ratón y probablemente en otros espermatozoides de mamífero, así como en la regulación del modo de batido flagelar en el espermatozoide humano. El papel de las mitocondrias en la señalización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no ha sido del todo establecida. Estos organelos contribuyen al balance de Ca^{2+} en el espermatozoide de ratón y parecen estar idealmente posicionados para segregar y modular la señalización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los compartimientos de la cabeza y cola (*Publicover y cols., 2007*).

1.3.2.-CANALES DE Ca^{2+} DEPENDIENTES DE VOLTAJE

La mayor función de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) es el de convertir cambios en el potencial de membrana en una señal de Ca^{2+} . Los Ca_v están formados por la subunidad α_1 , la cual es codificada por una familia de al menos 10 genes. La estructura de esta subunidad está basada en cuatro dominios transmembranales repetidos (I-IV) que contienen seis hélices α transmembranales (S1-S6) rodeando un poro central. (*Darszon y cols.2005*).

Experimentos de inmunohistoquímica e hibridación *in-situ* en preparaciones de espermatozoides, western blott de extractos proteínas de espermatozoides y PCR de librerías de cDNA de espermátides indican la presencia de numerosos Ca_v en el espermatozoide (*Publicover y cols., 2007*).

Se puede clasificar a los Ca_v en dos grandes clases funcionales: los canales activados por alto voltaje y los activados por bajo voltaje (HVA y LVA, respectivamente).

Los HVA abren después de fuertes despolarizaciones y han sido clasificados de acuerdo a sus características biofísicas y farmacológicas en Tipo-L, -N, -P/Q y -R. Existen datos que sugieren que los canales HVA pueden estar insertados en la membrana de células germinales masculinas en un estado funcional inactivo y activado en el espermatozoide maduro posiblemente por modificaciones postranscripcionales.

Los canales LVA abren después de débiles despolarizaciones y son codificados por la subfamilia de genes Ca_v3 ($Ca_v3.1$ a $Ca_v3.3$). En contraste a los canales HVA, los cuales funcionan como complejos oligomericos, la subunidad recombinante $Ca_v3\alpha_1$ solamente expresa canales de Ca^{2+} tipo-T en sistemas heterólogos. Estudios con Patch-Clamp han documentado la presencia de corrientes LVA en células espermatogénicas. Los canales tipo-T en células germinales masculinas parecen ser regulados por proteínas cinasas y por CaM.

Los canales Ca_v pueden ser fosforilados por la PKA y otras cinasas. Se sugiere que la fosforilación por PKA incrementa el tiempo de apertura del canal. En adición la PKC puede también modular canales Ca_v y su efecto en corrientes de Ca^{2+} varía dependiendo de el tipo de receptor activado (*Darszon y cols.2005*).

Espermatozoides de ratón y de bovino expuestos a zona solubilizada o ZP3 purificada, muestran un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y experimentan RA. Estas respuestas son dependientes de la $[Ca^{2+}]_e$ (indicando la participación de un influjo de Ca^{2+}), tanto la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ y la inducción de la RA se ven afectadas, en un grado similar, por la inhibición de los Ca_v con antagonistas orgánicos e inorgánicos. Investigaciones farmacológicas que muestran despolarización y elevación de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas con agonistas en el espermatozoide de humano y de ratón, ha sugerido la participación de al menos dos tipos de canales en el influjo de Ca^{2+} (*Publicover y cols., 2007*).

1.3.3.-CANALES CatSper

La familia de los CatSper (Cation channel of Sperm) consta de cuatro miembros (1-4) que son expresados única y exclusivamente en el espermatozoide. Los cuatro comparten una estructura similar de seis segmentos transmembranales, así como un motivo encontrado entre canales de K^+ operados por voltaje. El dominio transmembranal S4 de los miembros de la familia CatSper es similar en secuencia a los dominios sensores de voltaje en otras especies de canales iónicos operados por voltaje y la unión S5-S6 tiene

una secuencia muy similar a la del dominio formador de poro de canales Ca_v . (Darszon y cols., 2005; Xia y cols. 2007)

Los CatSper se encuentran localizados en la membrana plasmática en la pieza principal, y presumiblemente forman un canal catiónico heterotetramero, permeable a Ca^{2+} , dependiente de voltaje y sensible al pH. En ausencia de calcio externo este canal puede conducir sodio de una manera independiente de voltaje (Kirichok y cols., 2006). Existe una subunidad auxiliar CatSper β , que acompaña a las proteínas Catsper formando parte del complejo (Liu y cols. 2007).

La pérdida de alguna de las 4 proteínas CatSper tiene como resultado deficiencias en la movilidad hiperactivada y la rápida pérdida de la movilidad inicial en condiciones de capacitación. Así los defectos en la movilidad en espermatozoides de ratones knockout CatSper 1^{-/-}, CatSper 2^{-/-}, CatSper 3^{-/-}, CatSper 4^{-/-} son muy similares, los ratones knockout de alguno de estos cuatro CatSper son completamente estériles y sus espermatozoides carecen de la capacidad de presentar movilidad hiperactivada, una pérdida gradual de la movilidad inicial y son incapaces de penetrar la zona pelúcida (Jin y cols., 2007). Por ejemplo, en ratones knockout CatSper 1^{-/-}, se ha visto que sus espermatozoides presentan una reducción en su velocidad basal, pierden el batido vigoroso del flagelo, así como la existencia de una menor flexión o curvatura en la región de la cola. Experimentos en estos mismos ratones han demostrado que CatSper 1 es esencial para que se dé un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, evocado por despolarización. El incremento en la entrada de Ca^{2+} permite el aumento del batido flagelar (Carlson, 2003). El decremento en la movilidad de los espermatozoides de ratones knockout puede reflejar la contribución del influjo de Ca^{2+} a través de los canales CatSper para regular otras vías de señalización.

También se ha demostrado que la alcalinización incrementa dramáticamente la conductancia CatSper, además potencia la entrada de Ca^{2+} mediada por $I_{CatSper}$.

$I_{CatSper}$ es una corriente sensitiva a pH y selectiva a Ca^{2+} , que requiere la presencia de los cuatro miembros de la familia CatSper. Lo anterior sugiere que la alcalinización que ocurre durante la capacitación espermática activa $I_{CatSper}$, lo cual lleva a un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ e induce la movilidad hiperactivada (Kirichok y cols., 2006).

La correlación de la adquisición de la movilidad hiperactivada con la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$, sugiere que estos canales están involucrados en este proceso.

1.4.-ESPERMATOZOIDES INCUBADOS EN MEDIO SIN Ca^{2+}

El Ca^{2+} es un importante mensajero intracelular usado en diferentes vías de señalización por lo cual está involucrado en la regulación de varias funciones celulares. Un ejemplo es el espermatozoide de mamíferos que presenta cambios fisiológicos que involucran la modulación de los mecanismos de entrada de Ca^{2+} en procesos como la capacitación, reacción acrosomal y movilidad espermática (*González-Martínez, 2003*).

En ausencia de Ca^{2+} en el medio, no se pueden llevar a cabo ninguno de estos procesos, los cuales permiten al espermatozoide poder encontrar y fecundar al óvulo, ya que al no estar presente este ión se alteran varios factores como por ejemplo: la permeabilidad de la membrana a otros iones y el potencial de membrana.

El espermatozoide de ratón, en medio libre de Ca^{2+} , tiene una sustancial permeabilidad a Na^+ y el potencial de membrana es dependiente de la $[\text{Na}^+]_e$ y no del K^+ extracelular como sucede en medio con Ca^{2+} . La readición de Ca^{2+} induce una hiperpolarización transitoria dependiente de la $\text{ATPase Na}^+/\text{K}^+$. Lo anterior sugiere que en ausencia de Ca^{2+} , el Na^+ puede permear a través de canales de Ca^{2+} (*Espinosa y Darszon, 1995*).

Estudios realizados en el Laboratorio de Biomembranas de la Facultad de Medicina de la UNAM, muestran el efecto del EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), un agente quelante de Ca^{2+} , sobre el potencial de membrana y $[\text{Ca}^{2+}]_i$, medidos simultáneamente en el espermatozoide humano. La adición de EGTA en medio con Ca^{2+} causa un decremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, además provoca una despolarización sostenida, inicialmente rápida, la cual es seguida por una larga fase que alcanza valores de potencial de membrana desde el reposo de $-46 \pm 3\text{mV}$ a $+18 \pm 3.4\text{mV}$. Al restaurar el Ca^{2+} se produce un rápido incremento transitorio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que después decrece a valores basales. Simultáneamente, se produce una lenta hiperpolarización, el potencial alcanza valores en el reposo de $-66 \pm 3.9\text{mV}$.

En experimentos donde se incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con progesterona y después se remueve el Ca^{2+} con EGTA. Se observa una despolarización sostenida causada por un decremento sostenido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la cual es reversible al restaurar el Ca^{2+} . Esto indica que el decremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, no provoca en sí misma la despolarización sostenida inducida por remoción de Ca^{2+} y da paso a la hipótesis de que la despolarización es causada por removimiento de Ca^{2+} de sitios de unión externos (*González-Martínez, 2003*).

Al medir el potencial de membrana en un medio bajo en sodio (donde se sustituye el cloruro de sodio por cloruro de colina) y quelar el Ca^{2+} , se disminuye la despolarización inducida por adición de EGTA, lo que indica que la despolarización inducida por removimiento de Ca^{2+} es atribuida a una corriente de Na^+ .

Esté resultado puede revelar la presencia de un canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática que permite el paso de Na^+ en ausencia de Ca^{2+} externo. También se exploró si la despolarización dependiente de Na^+ inducida por remoción de Ca^{2+} es afectada por Mg^{2+} , esto debido a que se ha establecido que algunos canales de Ca^{2+} permiten un influjo de Na^+ en ausencia de Ca^{2+} , el cual es bloqueado por Mg^{2+} .

Por lo que los experimentos realizados revelan que al incrementar las concentraciones de MgCl_2 , entre 3mM y 6 mM, esto causa una remarcable inhibición de la despolarización dependiente de sodio inducida por remoción de Ca^{2+} con EGTA.

El Mg^{2+} también es capaz de revertir la despolarización inducida por remoción de Ca^{2+} . La hiperpolarización fue dependiente de la $[\text{Mg}^{2+}]$ y no se relaciona con algún cambio en el Ca^{2+} intracelular. Esto sugiere que al menos un considerable grado de la hiperpolarización no depende del influjo de Ca^{2+} o del incremento intracelular de este ión, por adición de Ca^{2+} en espermatozoides tratados con EGTA (*Gonzalez-Martinez, 2003*).

La hiperpolarización inducida por restauración de Ca^{2+} y por Mg^{2+} fue inhibida por ouabaina, sugiriendo también que la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ contribuye considerablemente a la hiperpolarización. La hiperpolarización también fue prevenida en medio sin K^+ , una condición que para la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$. En este trabajo se mostró evidencia que sugiere que el espermatozoide humano está dotado con una conductancia de Na^+ sensitiva a Mg^{2+} que es activada cuando el Ca^{2+} externo es removido del medio (*Guzman-Grenfell y cols., 2000; González-Martínez, 2003*). Por lo que se sugiere la presencia de un posible canal de Ca^{2+} , el cual probablemente contribuye a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en reposo y es capaz de conducir Na^+ en ausencia de Ca^{2+} en el espermatozoide humano.

A partir de esta hipótesis se pensó que la despolarización dependiente de Na^+ puede incrementar la $[\text{Na}^+]_i$, para comprobar esto se llevaron a cabo experimentos en el mismo laboratorio para estudiar si la despolarización dependiente de Na^+ afecta la $[\text{Na}^+]_i$ y lo que se pudo ver es que la despolarización dependiente de Na^+ inducida por remoción de Ca^{2+} externo produce un lento incremento en la $[\text{Na}^+]_i$, que depende del contenido de

Na^+ externo, este incremento puede soportar una alta actividad de la ATPasa de Na^+-K^+ que hiperpolariza la membrana plasmática cuando se restaura el Ca^{2+} (Figura 5).

La restauración de Ca^{2+} produce un pico transitorio de Ca^{2+} , una hiperpolarización dependiente de la ATPasa Na^+-K^+ , y un lento decremento de la $[\text{Na}^+]_i$ (Figura 6).

Tanto el grado de despolarización y el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ inducidos por remoción de Ca^{2+} dependen de la cantidad de Na^+ externo, indicando que ambos fenómenos están relacionados (Figura 5). (Torres-Flores y cols., 2008).

En el caso del Mg^{2+} , la adición de MgCl_2 al medio también puede bloquear el influjo de Na^+ causado por remoción de Ca^{2+} y subsecuentemente produce un lento decremento en la $[\text{Na}^+]_i$, este decremento no se produce en espermatozoides despolarizados tratados con ouabaina. Como se había reportado previamente, no se observó efectos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y una completa hiperpolarización fue producida. También se observó que el agregar MgCl_2 antes que el EGTA, produce un bloqueo en el incremento de la $[\text{Na}^+]_i$ (Figura 6).

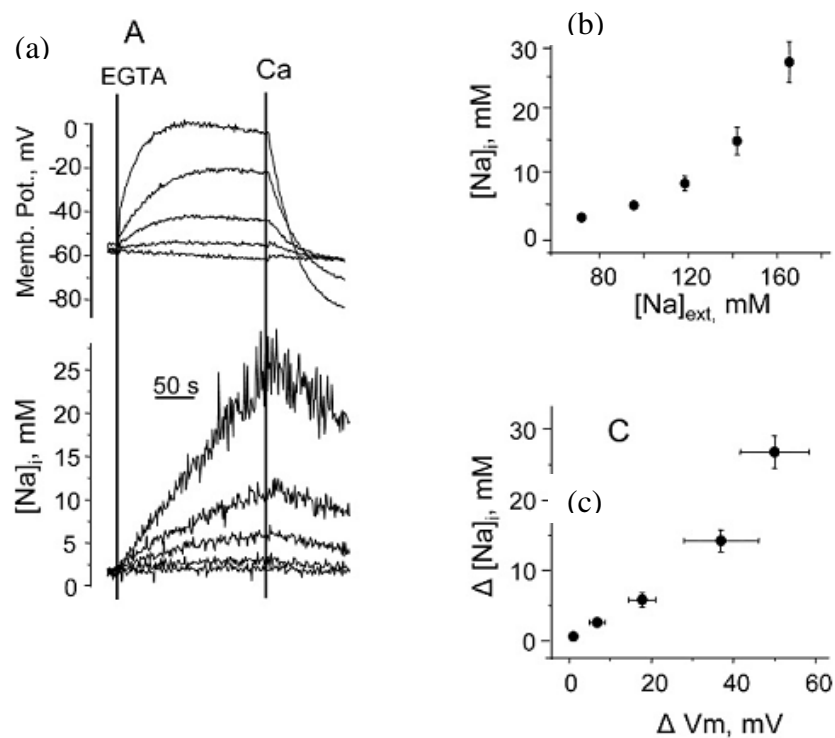


Figura 5. La despolarización e incremento de la $[\text{Na}^+]_i$ inducidos por remoción de Ca^{2+} del medio con EGTA depende de la concentración de Na^+ externo. Trazo representativo de los cambios en el potencial de membrana y la $[\text{Na}^+]_i$ inducidos por remoción de Ca^{2+} del medio con 3.5 mM de EGTA (a). $[\text{Na}^+]_i$ obtenida 3 minutos después de la adición de EGTA, en función de la $[\text{Na}^+]_e$ (b). Incremento de la $[\text{Na}^+]_i$ en función del grado de despolarización del potencial de membrana (c) (modificado de Torres-Flores y cols., 2008).

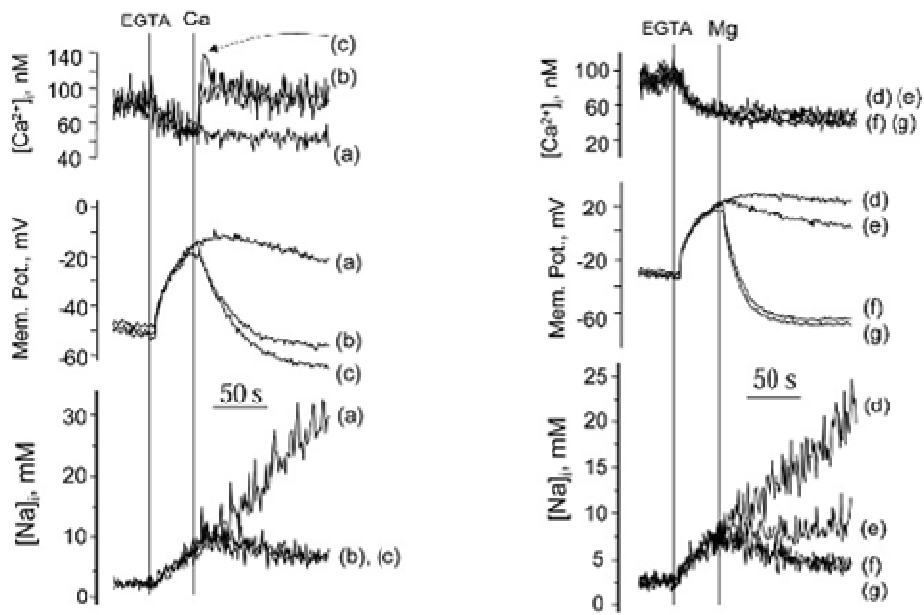


Figura 6. Efecto de la adición de diferentes cantidades de Ca^{2+} , (a) no adición (b) 0.92 mM y (c) 3.5 mM, (panel izquierdo), y MgCl_2 , (d) no adición, (e) 0.25 mM, (f) 1.5 mM) y (g) 2.5 mM (panel derecho), en el incremento de la $[\text{Na}^+]_i$ y la despolarización del potencial de membrana provocado por influjo de Na^+ inducido por remoción de Ca^{2+} del medio con EGTA (Modificado de Torres-Flores y cols. , 2008).

Cabe destacar que el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ inducido por remoción de Ca^{2+} fue considerablemente acelerado por ouabaina, pues se inhibe la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ . Lo anterior indica que el incremento de Na^+ intracelular inducido por remoción de Ca^{2+} resulta de un balance entre el influjo de Na^+ producido por la activación de un posible canal y un mecanismo que expulsa Na^+ , activado por el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ catalizado por la ATPasa Na^+-K^+ . (Torres-Flores y cols., 2008)

Todos estos resultados son consistentes con la hipótesis de que, en condiciones de reposo, hay un canal de Ca^{2+} cuya actividad contribuye al Ca^{2+} intracelular en reposo. La selectividad de este canal puede ser conferida por la unión del Ca^{2+} a un sitio externo, un sitio que también puede ser ocupado por Mg^{2+} . Cuando el Ca^{2+} es removido de este sitio, la selectividad puede ser cambiada a un canal de Na^+ de alta conductancia; esto puede resultar en la despolarización, el decremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado a causa de la actividad de un mecanismo de expulsión de Ca^{2+} presente en la célula (la responsable es la ATPasa de Ca^{2+}) y el incremento observado en la $[\text{Na}^+]_i$.

En esta condición la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ puede ser rápidamente activada por el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$, al oponerse a la entrada masiva de Na^+ . Cuando se da la restauración de Ca^{2+} externo el canal puede recobrar su selectividad a un canal de Ca^{2+} de baja conductancia y luego entonces una reactivación de la ATPasa de Ca^{2+} , llevando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles normales. Consecuentemente, el potencial de membrana puede llegar a ser principalmente dependiente de la alta actividad electrogenica de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ hiperpolarizando a la célula.

La $[\text{Na}^+]_i$ puede tiende a decrecer a valores de reposo, aunque a una tasa menor que la hiperpolarización sostenida, la cual alcanza valores más negativos que el reposo. (Torres-Flores y cols., 2008)

1.5.-PAPEL DEL Na^+ EN EL ESPERMATOZOIDE

Además del Ca^{2+} , existen otros iones como el Na^+ , K^+ , Cl^- , etc. El gradiente a ambos lados de la membrana plasmática y el paso de estos iones a través canales, es importante para que la célula pueda llevar a cabo diferentes procesos fisiológicos.

Por ejemplo las células utilizan el gradiente de sodio, generado por la actividad de la bomba ATPasa Na^+/K^+ . En las células excitables, el potencial de acción se dispara por una corriente de sodio activada por el voltaje. El influjo de sodio a través de canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) produce despolarización durante la fase inicial del potencial de acción de células excitables. El gradiente de sodio sirve también como fuerza impulsora en el transporte de metabolitos, como en el caso del transportador de glucosa, que cotransporta glucosa utilizando el gradiente de sodio (Catterall y cols., 2003; García-Sánchez, 2006).

Los Na_v están compuestos de una subunidad α y una o más subunidades auxiliares β . La subunidad α es una proteína con una alto grado de secuencia de identidad de aminoácidos y puede funcionar con la subunidad β como un canal de Na^+ . Nueve diferentes subunidades α de Na_v han sido clonadas en mamíferos, cada una de las cuales es codificada por un diferente gen. Estos canales pueden ser caracterizados por su sensibilidad a un bloqueador altamente selectivo, la tetrodotoxina (TTX). El papel de la subunidad β aún no está del todo establecido, aunque aparentemente modula la localización celular, la expresión funcional, cinética y la apertura del canal por el voltaje.

Se ha demostrado la existencia de Na_v y que algunos de estos canales son funcionalmente activos en células espermáticas humanas (*Pinto y cols., 2009*).

Registros de canales de Na^+ reportan la participación de un canal de Na^+ sensitivo a amilorida que puede contribuir a la regulación del potencial de membrana en reposo del espermatozoide. Las características de este canal concuerdan con la familia de los canales epiteliales de Na^+ (ENaC) que se encuentran presentes en el espermatozoide. (*Hernández-González, 2006*).

Los canales de Na^+ son abundantemente expresados en el espermatozoide, el gradiente de este ión a través de la membrana plasmática juega un papel central en la regulación del potencial de membrana, un parámetro que regula el grado y dirección del flujo de iones a través de canales e intercambiadores y modula el pH_i .

Es bien sabido que el proceso de capacitación es acompañado por cambios en el potencial de membrana del espermatozoide, como un estado de hiperpolarización acompañado por un incremento en el pH_i . Esta hiperpolarización parece estar relacionada con un incremento en la permeabilidad del K^+ y un decremento en la permeabilidad a K^+ (*Pinto y cols., 2009*).

Se ha investigado el papel funcional de los canales Na_v en el espermatozoide maduro, por ejemplo estudios donde se analizó el efecto del uso veratridina, un activador de Na_v , en la movilidad espermática; el resultado demuestra que la veratridina induce un incremento en la movilidad progresiva que no fue acompañado por cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Por lo que se ha sugerido que la movilidad espermática puede proceder en una manera dependiente de Na^+ (*Pinto y cols., 2009*).

Se han identificado intercambiadores, tales como el intercambiador Na^+/H^+ (sNHE) el cual se encuentra principalmente localizado en el flagelo. La disrupción del gen de la sNHE causa infertilidad y la completa pérdida de la movilidad espermática. La ausencia de sNHE reduce de manera importante la actividad de la ACs en el espermatozoide (*Wang y cols., 2006*). También se ha postulado que el intercambiador Na^+/H^+ interviene en la regulación del pH en el espermatozoide de mamífero (*García-Sánchez, 2006*).

La ATPasa Na^+/K^+ es una proteína integral de membrana que cataliza la translocación electrogénica de tres Na^+ fuera de la célula y de dos K^+ hacia dentro de la célula usando la energía de la hidrólisis de una molécula de ATP. La actividad de esta enzima es requerida para varios procesos celulares como la generación del gradiente de Na^+ necesario para el transporte de algunos iones y otros sustratos a través de la membrana,

el establecimiento del potencial de membrana en reposo, el balance osmótico, así como el volumen y pH celular (*Woo y cols., 2002; Sanchez y cols., 2006*).

En el espermatozoide humano se ha visto que la isoforma $\alpha 4$ de la ATPasa Na^+/K^+ localizada en la cola, predominantemente en la pieza media del flagelo, es importante para la movilidad espermática ya que al ser inhibida con ouabaina decrece significativamente el porcentaje de movilidad (*Sanchez y cols., 2006*).

2.-JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente los estudios con espermatozoides de ratones knockout para CatSper 3 y 4 muestran que en medio de capacitación son incapaces de desarrollar movilidad hiperactivada a diferencia de los espermatozoides de tipo silvestre, sin embargo, esta situación cambia cuando los espermatozoides son incubados en un medio libre de Ca^{2+} y cationes divalentes, en este caso los espermatozoides de tipo silvestre llegan a ser inmóviles dentro de los primeros 15 minutos, en tanto que los espermatozoides de ratones knockout para CatSper 3 y 4 siguen mostrando movilidad inicial (*Jin y cols., 2007*).

A su vez el Ca^{2+} juega un papel fundamental en varios procesos fisiológicos del espermatozoide humano, tales como la capacitación, la reacción acrosomal, la movilidad inicial y la movilidad hiperactivada.

Datos obtenidos en nuestro laboratorio mediante experimentos de remoción del Ca^{2+} extracelular con EGTA muestran que esto trae como consecuencia una reducción en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, una despolarización sostenida del potencial de membrana y un influjo de Na^+ que subsecuentemente aumenta la $[\text{Na}^+]_i$ tienen un efecto sobre la movilidad espermática humana. Tanto la despolarización como el incremento de la concentración de $[\text{Na}^+]_i$ dependen de los niveles de Na^+ en el medio cuando el Ca^{2+} se encuentra ausente (*González-Martínez, 2003; Torres-Flores y cols., 2008*).

Estos mismos datos han permitido a nuestro grupo de trabajo proponer la existencia de un canal de Ca^{2+} cuya actividad contribuye a mantener la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en reposo, sin embargo, en ausencia de Ca^{2+} , la selectividad de este canal puede ser cambiada a uno de Na^+ de alta conductancia (*González-Martínez, 2003; Torres-Flores y cols., 2008*).

Tanto los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio, como los obtenidos por otros grupos de trabajo (*Jin y cols., 2007*), nos sugirieron la existencia de una relación entre la pérdida de la movilidad espermática en ratones de tipo silvestre y los efectos de la remoción de Ca^{2+} extracelular sobre el potencial de membrana y en la $[\text{Na}^+]_i$.

Con base en lo anterior se propone realizar el estudio del efecto que puede tener el influjo de Na^+ y la despolarización del potencial de membrana, causados por remoción de Ca^{2+} con EGTA sobre la movilidad de espermatozoides humanos, lo cual nos permitirá dar aportaciones para lograr un mejor entendimiento de la regulación fisiológica de la movilidad espermática.

3.-HIPÓTESIS

- La remoción de Ca^{2+} extracelular provoca la despolarización del potencial de membrana y el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$, las cuales causan la reducción o la pérdida de la movilidad inicial en espermatozoides humanos.

4.-OBJETIVOS

4.1.-GENERAL

Estudiar el efecto del influjo de sodio sobre la movilidad en espermatozoides humanos incubados en medio sin calcio.

4.2.-PARTICULARES

Estudiar el efecto de la remoción de Ca^{2+} extracelular sobre la movilidad de espermatozoides humanos.

Determinar si el efecto de la remoción de Ca^{2+} extracelular sobre la movilidad de espermatozoides humanos es reversible.

Determinar si la movilidad de espermatozoides humanos puede ser preservada en medio sin Ca^{2+} .

Evaluar el efecto de la valinomicina sobre la movilidad de espermatozoides humanos en medio sin Ca^{2+} .

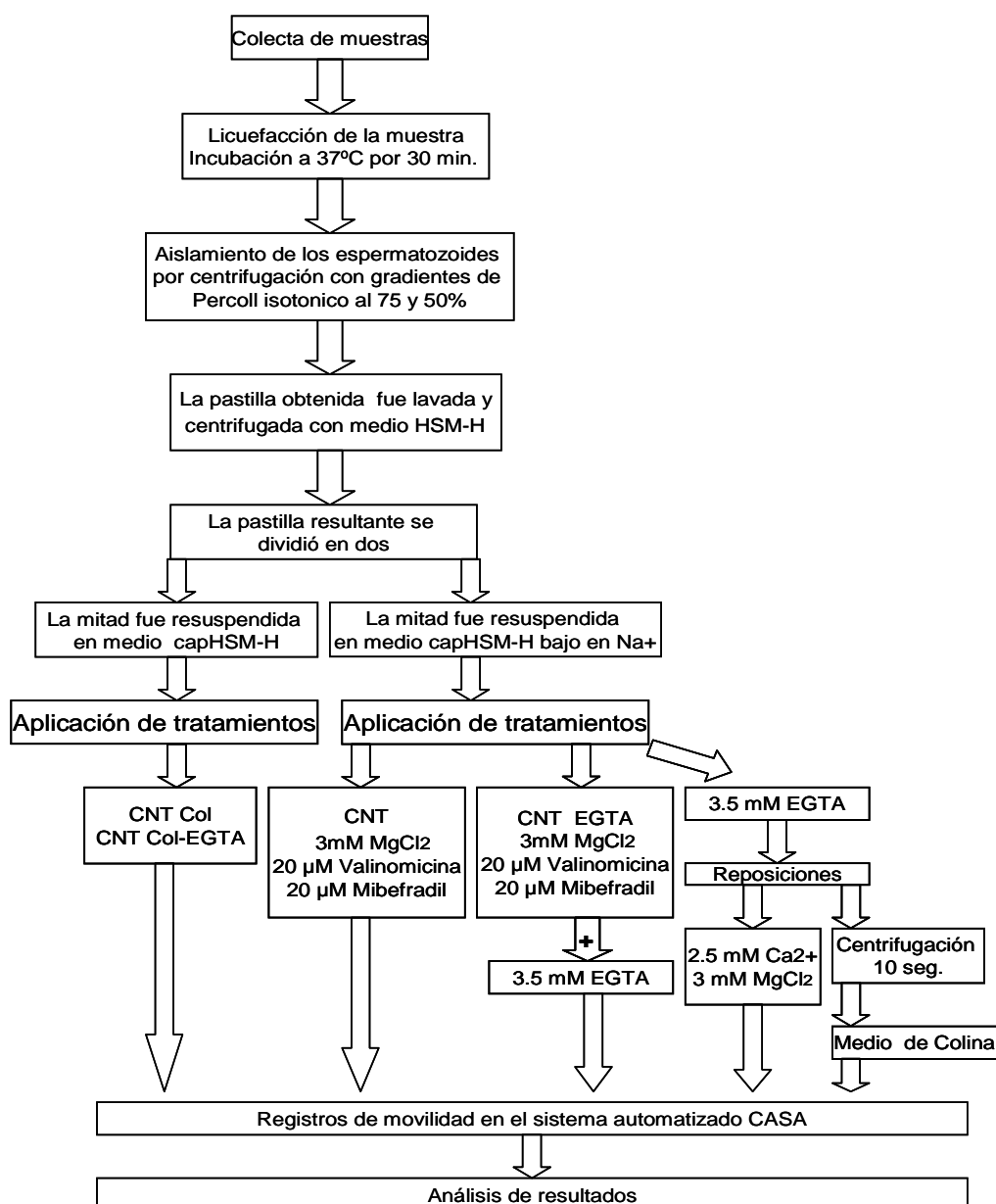
Evaluar el efecto del mibefradil sobre la movilidad de espermatozoides humanos en medio sin Ca^{2+} .

5.-MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de semen humano provenientes de 9 donadores sanos, entre los 22 y 35 años de edad, quienes tuvieron al menos 3 días de abstinencia. Los donadores conocieron y firmaron una carta de consentimiento informado sobre el uso experimental de su muestra, autorizada por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM, que a su vez sigue los lineamientos de la convención de Helsinki sobre el correcto manejo de muestras provenientes de humanos.

Las muestras fueron seleccionadas según las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud (ver Anexo).

En el siguiente diagrama se describe de manera global la metodología que se llevó a cabo en este trabajo, misma que se detalla en los siguientes párrafos.



5.1.-Aislamiento de los espermatozoides.

Una vez que la muestra fue colectada, se incubo 30 minutos dentro de una cámara húmeda a 37° C para promover su licuefacción.

Los espermatozoides vivos fueron separados del plasma seminal mediante gradientes de percoll isotónico a 75% y 50% (a pH 7.4 y ambos amortiguados con HEPES 10 mM y NaCl 150 mM), mediante el siguiente procedimiento: se colocó en el fondo de un tubo cónico de 15 ml 1 ml de percoll 75%, encima de esta se agregó 1 ml de percoll 50% cuidando que ambas fases no se mezclaran, posteriormente se colocó la muestra de semen y se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos. Después de la centrifugación se desechó el sobrenadante y se obtuvo una pastilla que contenía a los espermatozoides, esta fue separada y lavada por centrifugación 5 minutos a 3500 rpm con 5 ml de medio HSM-H cuya composición es la siguiente: NaCl 17.5 mM, KCl 8.6 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 0.49 mM, NaH₂PO₄ 0.3 mM, Na-Piruvato 0.25 mM, Na-Lactato 19 mM, Glucosa 2 mM y HEPES 25 mM, ajustado a pH 7.6 con NaOH.

La pastilla obtenida del lavado fue dividida en dos partes, con la finalidad de ser resuspendidas en medios diferentes: uno en medio normal (HSM-H) y otro en medio de colina (se sustituye el NaCl por cloruro de colina, un medio bajo en sodio) para los análisis de movilidad. La concentración fue de 20×10^6 células/ml.

5.2.-Análisis de movilidad

Los espermatozoides obtenidos fueron resuspendidos en dos medios, en el tubo uno se adicionó 2.2 ml de medio de capacitación HSM-H (capHSM-H) suplementado con 3mg/ml de albúmina bovina y 25 mM de NaHCO₃; en el tubo dos se adicionó 1 ml de medio de capacitación HSM-H bajo en Na⁺.

El tubo uno fue dividido en 11 alícuotas de 200 µl cada una colocadas en tubos eppendorf (1-11), para los diferentes tratamientos (ver tabla II), de las cuales tres fueron usadas para los experimentos de recuperación de la movilidad; el tubo dos fue dividido en cinco alícuotas de 200 µl cada una (12-13), dos alícuotas fueron usadas para los tratamientos y tres de reserva.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
3.5 mM EGTA	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
3 mM Mg ²⁺	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 μM Valinomicina	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
20 μM Mibefradil	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Rep. 2.5 mM Ca ²⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Rep. 3 mM MgCl ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Rep. Colina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabla II.- Tratamientos aplicados a las muestras de espermatozoides. Las alícuotas 1-11 fueron incubadas en medio capHSM-H y de 12-13 en medio capHSM-H bajo en Na⁺ a 37°C.

La alícuota 1 fue usada como control positivo, mientras que la 2 se uso como control negativo para estimar el tiempo de caída de la movilidad a ~10%. El análisis de las muestras se realizó entre 60 y 75 minutos aproximadamente.

A las alícuotas 2 a la 8 se les agrego el tratamiento que se indica en la tabla II e inmediatamente se tomaron 10 μl de cada una, estos fueron colocados en una placa que contiene una cámara de 20 μm de profundidad (Microcell; Conception Technologies, San Diego, CA, USA) para su análisis en el sistema computarizado *Hamilton Thorne Motility Analyzer* (HTM-IVOS v.12). Veinte cuadros fueron adquiridos a 60Hz en campo oscuro, capturados con un objetivo 20x a una temperatura constante de 37°C. De cada tratamiento entre 2000-3000 células fueron cuantificadas.

Las alícuotas 9, 10 y 11 fueron usadas para los experimentos de restauración de movilidad. En estos casos lo primero que se realizo fue la remoción de Ca²⁺ con 3.5 mM de EGTA, se espero el tiempo necesario para que la movilidad cayera a ~10%, para posteriormente reponer el Ca²⁺ o adicionar Mg²⁺ según sea el caso. En el caso de la alícuota 11 después de la caída de la movilidad, se centrifugo 10 segundos la muestra con lo cual se obtuvo una pastilla de espermatozoides, se retiro el sobrenadante del tubo y se le agrego medio HSM-H bajo en Na⁺, que contenía cloruro de colina.

El EGTA usado se tomo de un stock previamente preparado de 0.5 M de EGTA en ~2 M NaOH, en esta condición, el pH del medio apenas llega a variar al adicionar el EGTA, y el [Ca²⁺]_e decrece de 2.5 mM a 68 nM acorde a el programa calculador de la

concentración de Ca^{2+} Maxchelator (V.2.1) escrito por Chris Patton de Hopkins Marine Station, Stanford University (*González-Martínez, 2003*).

5.3.-Análisis estadístico

Los valores obtenidos de la cuantificación de la movilidad espermática, fueron de una $n=9$ para el caso de las alícuotas 1-4 y 12-13, mientras que para las alícuotas 5-11 se obtuvieron valores de una $n=6$. Los resultados numéricos fueron expresados como medias \pm error estándar, n significa el numero de individuos examinados y analizados con una prueba T-student para muestras independientes; valores <0.05 fueron considerados como estadísticamente significativos.

6.-RESULTADOS

6.1.-EFECTO DE LA REMOCIÓN DE Ca^{2+} DEL MEDIO EN LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA

De acuerdo a los antecedentes lo primero que se decidió probar fue la existencia de un posible efecto de la remoción de Ca^{2+} del medio sobre la movilidad inicial.

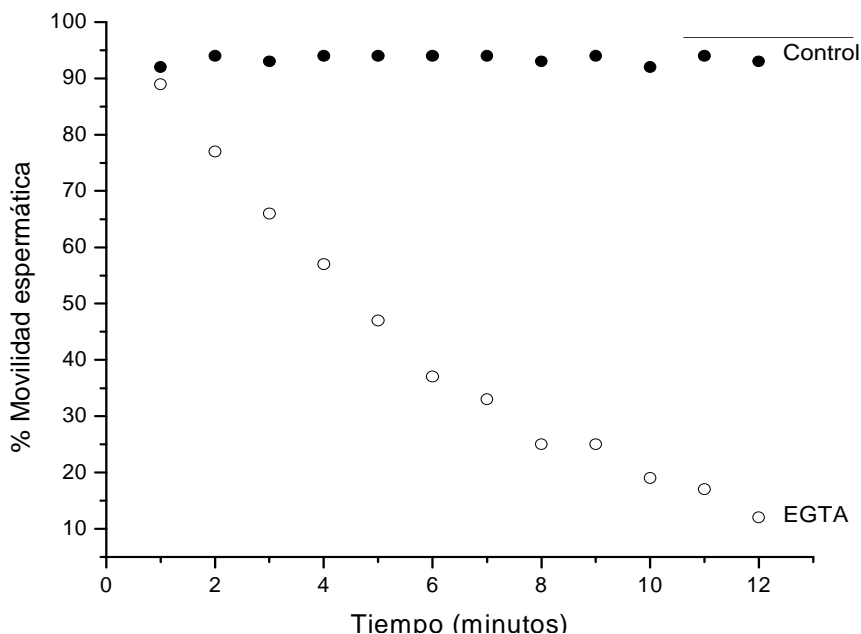
Las alícuotas 1 y 2 fueron utilizadas para investigar el efecto de la remoción de Ca^{2+} del medio en la movilidad espermática. La alícuota 1 fue utilizada como control y fue incubada únicamente en medio capHSM-H, en tanto que la 2 fue incubada con medio capHSM-H al cual posteriormente se le disminuyó el calcio extracelular de 2.5mM en condiciones normales a 68 nM mediante la adición de 3.5 mM de EGTA. En estas condiciones el porcentaje de movilidad espermática disminuye y después de un tiempo la población llega a ser totalmente inmóvil; sin embargo, este efecto es reversible como veremos más adelante. El tiempo de exposición (τ) en el cual la población alcanzó 50% de la condición inmóvil dentro de la cámara del CASA fue $\tau=3.96 \pm 0.87$ min ($n=6$, \pm ES); cabe señalar que el valor de τ muestra un rango de variabilidad que va desde 2.09 a 7.83 minutos. El porcentaje de movilidad fue medido en la placa cada minuto hasta que disminuyó a valores \sim 10%.

En el caso de los espermatozoides incubados en medio con Ca^{2+} , la movilidad espermática permaneció a niveles elevados y sin cambios, durante el mismo periodo de tiempo dentro de la cámara del CASA que los espermatozoides tratados con EGTA; al tiempo τ la movilidad en el control se redujo un promedio de $2.07 \pm 1.62\%$, con un rango máximo y mínimo de 9.27% de decremento y un incremento de 2.17%.

Correlacionando los resultados obtenidos con los antecedentes descritos en el marco teórico de este trabajo, se pensó que el efecto de la pérdida de la movilidad inicial por remoción de Ca^{2+} del medio podría estar relacionado a la despolarización del potencial de membrana y/o al incremento de la $[\text{Na}^+]_i$ debido a influjo de Na^+ provocados también por la remoción de Ca^{2+} del medio, por lo cual se decidió estudiar esta relación como veremos más adelante.

La grafica 1 muestra trazos representativos del efecto de la remoción de Ca^{2+} del medio en la movilidad espermática. Los círculos blancos (EGTA) muestran el porcentaje de movilidad espermática de espermatozoides incubados en medio capHSM-H y 3.5mM de

EGTA, en tanto que los círculos negros (Cnt) muestran el porcentaje de movilidad espermática en la placa de espermatozoides incubados en medio capHSM-H sin EGTA durante el mismo periodo de tiempo.



Gráfica 1. Efecto de la remoción de Ca^{2+} del medio con EGTA sobre la movilidad espermática.

6.2.- DETERMINACIÓN DE LA REVERSIBILIDAD DEL EFECTO DE LA REMOCIÓN DE Ca^{2+} SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA

Posterior a las pruebas realizadas para ver el efecto de la remoción de Ca^{2+} del medio con EGTA, en donde se pierde la movilidad inicial, se investigó si este efecto podía ser reversible.

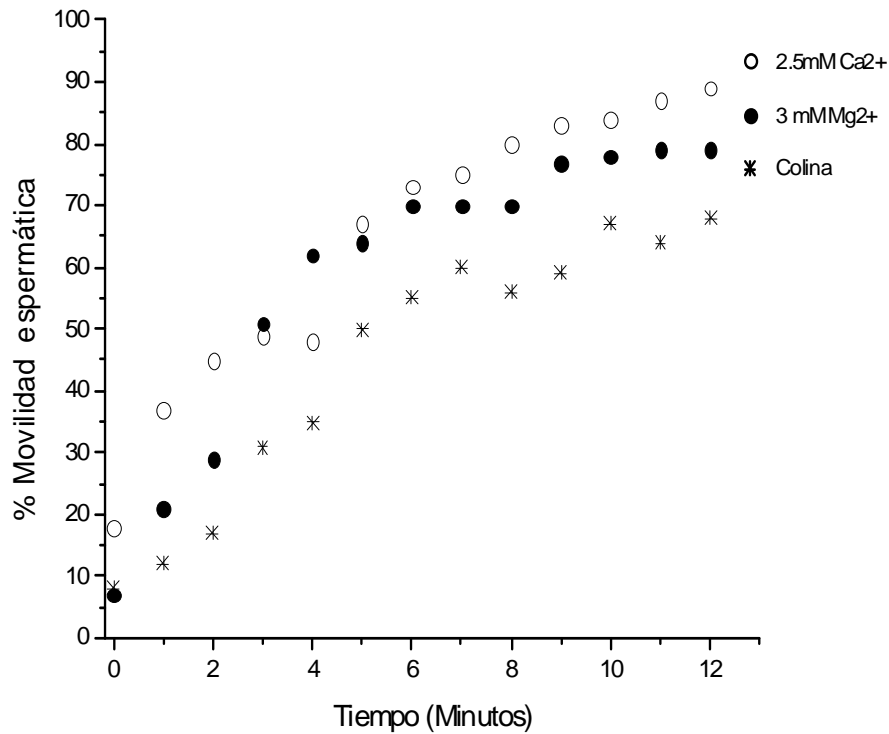
Debido a que la despolarización del potencial de membrana y el incremento en la $[Na^+]_i$ causados por remoción de Ca^{2+} , dependen de la $[Na^+]_e$ (González-Martínez, 2003; Torres-Flores y cols., 2008), se decidió estudiar si el efecto de la pérdida de la movilidad causado por remoción de Ca^{2+} del medio con EGTA puede ser reversible por incubación de espermatozoides en medio capHSM-H bajo en Na^+ .

Además resultados previos muestran que la restauración de Ca^{2+} al medio puede producir un pico transitorio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, una hiperpolarización del potencial de membrana, un bloqueo del influjo de Na^+ y un lento y pequeño decremento de la $[\text{Na}^+]_i$, en tanto que la adición de concentraciones milimolares de MgCl_2 es capaz de revertir la despolarización, bloquear el influjo de Na^+ y subsecuentemente producir un lento decremento en la $[\text{Na}^+]_i$ en los espermatozoides tratados con EGTA (*González-Martínez, 2003; Torres-Flores y cols., 2008*); razones por las que también se decidió investigar si el efecto de la pérdida de la movilidad por remoción de Ca^{2+} es reversible tanto por restauración de 2.5 mM de Ca^{2+} como por adición de 3 mM de MgCl_2 .

Los experimentos de recuperación de movilidad se llevaron a cabo en espermatozoides incubados en medio cap HSM-H con 3.5 mM de EGTA, donde el porcentaje de movilidad disminuyó a valores ~10%.

La grafica 2 muestra trazos representativos de los resultados obtenidos durante los experimentos de recuperación que indican que el efecto de la pérdida de la movilidad espermática por remoción de Ca^{2+} es reversible. Los círculos blancos muestran el efecto de la restauración de Ca^{2+} a 2.5 mM, en tanto que los círculos negros y los asteriscos muestran el efecto de la adición de 3 mM de MgCl_2 y el efecto del cambio de los espermatozoides de medio capHSM-H con 3.5 mM de EGTA a medio capHSM-H bajo en Na^+ , respectivamente. El tiempo requerido para recuperar el 50% de la movilidad espermática (τ_{rec}) fue de: 6.3 ± 1.11 (n=6, \pm ES) minutos para el caso de la restauración de 2.5 mM de Ca^{2+} , 4.17 ± 0.42 minutos en las pruebas realizadas mediante la adición de 3 mM de MgCl_2 y de 6.95 ± 0.78 minutos para la recuperación en medio capHSM-H bajo en Na^+ .

Al último tiempo de registro, los valores promedio de recuperación de la movilidad espermática alcanzados para cada tratamiento fueron de: $96.40 \pm 3.75\%$ para la recuperación en 2.5 mM de Calcio, $84.24 \pm 1.28\%$ en el caso de la adición de 3 mM de MgCl_2 y de $76.19 \pm 3.27\%$ para la recuperación en medio capHSM-H bajo en Na^+ .



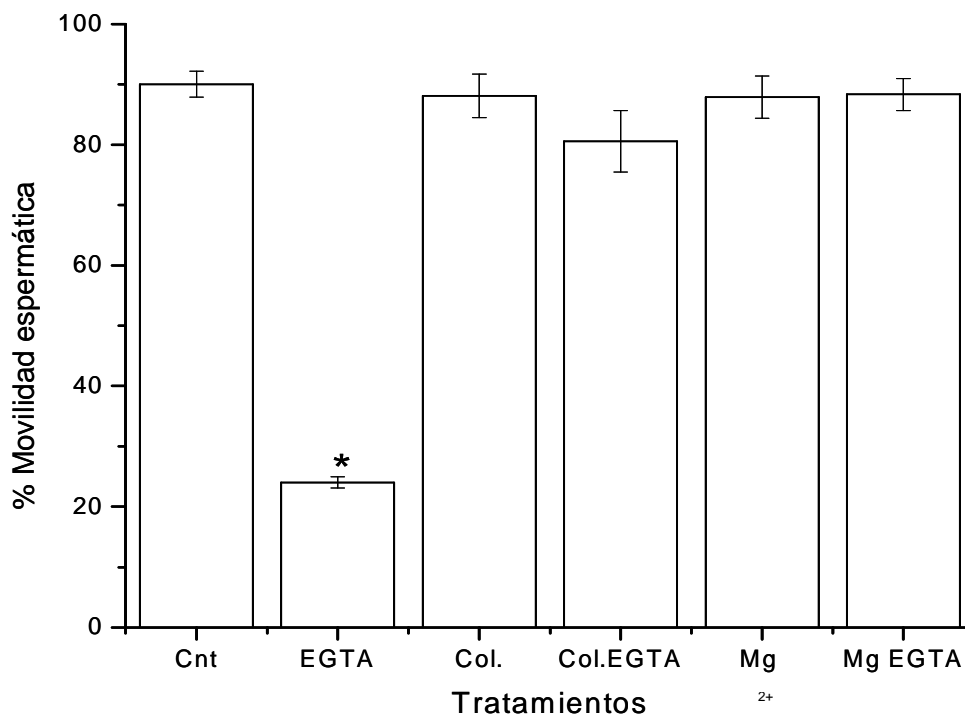
Gráfica 2. Reversibilidad del efecto de la pérdida de movilidad espermática por remoción de Ca^{2+} del medio con EGTA.

6.3.-PRESERVACIÓN DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA EN MEDIO SIN Ca^{2+}

Se realizaron experimentos para probar si la movilidad espermática puede ser preservada por adición de 3.5mM de MgCl_2 antes de la remoción de Ca^{2+} con EGTA o por incubación de los espermatozoides en medio bajo en Na^+ , ya que bajo estas condiciones se puede inhibir la despolarización del potencial de membrana y el influjo de Na^+ causados por remoción de Ca^{2+} .

Debido a que el tiempo que tarda el efecto de la remoción de Ca^{2+} del medio con EGTA es muy variable, se decidió esperar el tiempo necesario para reducir la movilidad espermática a valores menores a 25% y en ese mismo periodo de tiempo probar el efecto, tanto de la previa adición de 3 mM de MgCl_2 como de la incubación de los espermatozoides en medio capHSM-H bajo en Na^+ , antes de la remoción de Ca^{2+} del medio con EGTA.

Como se puede observar en la gráfica 3 ($n=9 \pm ES$), el control siempre mostró niveles elevados de movilidad ($90 \pm 2.14\%$), mientras que en el caso de los espermatozoides tratados con EGTA hubo una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de movilidad ($24 \pm 0.92\%$). En el caso de la incubación de espermatozoides en medio capHSM-H bajo en Na^+ no se observa algún efecto sobre la movilidad espermática ($88.11 \pm 3.59\%$) y al momento de remover el Ca^{2+} de este medio con EGTA la movilidad disminuye muy poco respecto del control sin haber diferencias significativas ($80.55 \pm 5.09\%$). También se observa que la previa adición de 3.5 mM de $MgCl_2$ a espermatozoides incubados en medio capHSM-H no causa efecto en la movilidad espermática ($87.88 \pm 3.47\%$) y al igual que el medio bajo en Na^+ previene la pérdida de la movilidad espermática tras la remoción de Ca^{2+} del medio con EGTA ($88.33 \pm 2.64\%$).

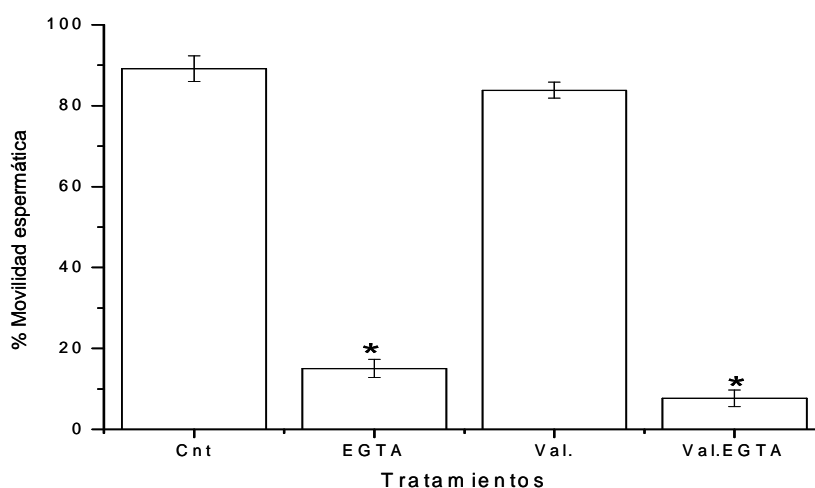


Gráfica 3. La incubación de espermatozoides en medio capHSM-H bajo en Na^+ y la previa adición de 3.5 mM $MgCl_2$ a espermatozoides incubados en medio capHSM-H previene la pérdida de la movilidad por remoción del Ca^{2+} del medio con EGTA (* $p < 0.05$).

6.4.-EFECTO DE LA VALINOMICINA SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA EN MEDIO SIN Ca^{2+} .

Para probar la posible participación de la despolarización del potencial de membrana a causa de la remoción de Ca^{2+} con EGTA, en la pérdida de la movilidad espermática, se realizaron experimentos donde se utilizó valinomicina, un ionóforo de K^+ , que lleva los valores del potencial de membrana a valores cercanos a los de la distribución del K^+ a través de la membrana plasmática (E_k) para la ecuación de Nernst, en el caso del espermatozoide humano el valor que alcanza el potencial de membrana es de -71 mV (González-Martínez, 2003).

En la gráfica 4 ($n=6$, $\pm\text{ES}$) se observa que la fijación del potencial de membrana con valinomicina, de espermatozoides incubados en medio capHSM-H, no causa diferencias significativas en los niveles de movilidad espermática ($83.33 \pm 1.99\%$), comparado con el control ($89.16 \pm 3.17\%$). Sin embargo, la remoción de Ca^{2+} del medio con EGTA en espermatozoides tratados previamente con valinomicina, también causa una disminución de la movilidad espermática ($7.66 \pm 2.07\%$), similar a lo observado en los espermatozoides tratados únicamente con EGTA ($15 \pm 2.26\%$). En este caso el porcentaje de movilidad fue determinado al tiempo en que la movilidad alcanzó valores inferiores a 15% en espermatozoides incubados en medio capHSM-H y 3.5mM de EGTA.



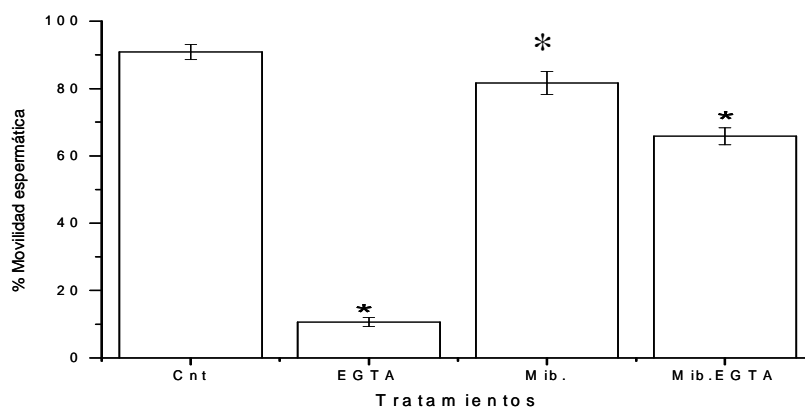
Gráfica 4. Efecto de la fijación del potencial de membrana con valinomicina en la movilidad espermática en medio sin Ca^{2+} (* $p < 0.05$).

6.5.-EFECTO DEL MIBEFRADIL SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA EN MEDIO SIN Ca^{2+} .

Como se mencionó en el marco teórico, existe la hipótesis de que en condiciones de reposo, hay un canal de Ca^{2+} cuya actividad contribuye al Ca^{2+} intracelular en reposo y la selectividad de este canal puede ser conferida por la unión del Ca^{2+} a un sitio externo, un sitio que también puede ser ocupado por Mg^{2+} , sin embargo, cuando el Ca^{2+} es removido la selectividad puede ser cambiada a un canal de Na^+ de alta conductancia, lo que puede resultar en la despolarización del potencial de membrana, el decremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el incremento observado en la $[\text{Na}^+]_i$ (Torres-Flores y cols., 2008).

Por lo anterior se decidió probar el efecto de 20 μM de mibefradil, un bloqueador de canales de Ca^{2+} , sobre la movilidad espermática.

En la gráfica 5 ($n=6$, $\pm\text{ES}$) se observa que la adición de 20 μM de mibefradil a espermatozoides incubados en medio capHSM-H, causa una pequeña reducción de la movilidad espermática ($81.66 \pm 3.41\%$), teniendo diferencias significativas respecto al control ($90.83 \pm 2.24\%$), en tanto que para el caso de los espermatozoides incubados con 20 μM de mibefradil y 3.5 mM de EGTA, existe una mayor reducción de la movilidad espermática ($65.83 \pm 2.49\%$), que también presenta diferencias significativas respecto del control, aunque no en el grado como los espermatozoides incubados sólo en medio capHSM-H y 3.5 mM de EGTA ($10.66 \pm 1.30\%$). También en este caso el porcentaje de movilidad fue determinado al tiempo cuando la movilidad alcanzó valores inferiores a 15% en espermatozoides incubados en medio capHSM-H y 3.5 mM de EGTA.



Gráfica 5. Efecto del mibefradil en la movilidad de espermatozoides incubados en medio sin Ca^{2+} (* $p < 0.05$).

7.- DISCUSIÓN

En el presente trabajo se buscó estudiar el efecto que tiene la remoción de Ca^{2+} del medio sobre la movilidad en espermatozoides humanos. Para abordar este problema se llevó a cabo el análisis de la movilidad espermática con ayuda del sistema automatizado CASA bajo diferentes condiciones de incubación.

En el apartado 6.1 se realizaron estudios para evaluar el efecto de la remoción de Ca^{2+} extracelular sobre la movilidad de espermatozoides humanos, debido a que la remoción de Ca^{2+} extracelular provoca la despolarización del potencial de membrana y el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$; lo cual podría afectar la movilidad espermática.

Los resultados indican que la remoción de Ca^{2+} del medio con 3.5 mM de EGTA causa la pérdida progresiva de la movilidad inicial, hasta llegar a un estado donde la población de espermatozoides humanos puede ser completamente inmóvil después de un tiempo, en tanto que la movilidad espermática es conservada a niveles altos en espermatozoides incubados en medio capHSM-H durante el mismo periodo de tiempo en la placa de registro dentro del CASA.

Después de observar la pérdida de la movilidad espermática por remoción de Ca^{2+} investigamos si este efecto era reversible, los resultados del apartado 6.2 muestran un alto nivel de recuperación de la movilidad espermática por restauración de 2.5 mM de Ca^{2+} , por adición de 3 mM de MgCl_2 y por incubación de espermatozoides en medio capHSM-H bajo en Na^+ .

La recuperación de la movilidad puede ser explicada gracias estudios realizados previamente (*González-Martínez, 2003; Torres-Flores y cols., 2008*), de la siguiente forma: la restauración de 2.5 mM de Ca^{2+} podría estar produciendo un pico transitorio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que ayuda a recuperar los niveles de Ca^{2+} intracelular, posiblemente implicando a los canales de calcio dependientes de voltaje ó de CatSper ó ambos, hiperpolarizando el potencial de membrana, bloqueando el influjo de Na^+ y produciendo un lento y pequeño decremento de la $[\text{Na}^+]_i$; la adición de 3 mM de MgCl_2 estaría revirtiendo la despolarización del potencial de membrana, bloqueando el influjo de Na^+ y subsecuentemente produciría un lento decremento en la $[\text{Na}^+]_i$. Por otra parte es probable que los espermatozoides tratados con EGTA y que recuperan la movilidad por incubación en medio capHSM-H bajo en Na^+ , lo hagan debido a que la falta de Na^+ en el medio estaría inhibiendo la despolarización del potencial de membrana y el

incremento en la $[Na^+]_i$ causados por remoción de Ca^{2+} y debido a que ambos fenómenos dependen de la $[Na^+]_e$.

Los estudios del apartado 6.3 realizados para probar si es posible prevenir la pérdida de la movilidad espermática, demuestran que ésta puede ser mantenida a niveles similares a los de espermatozoides incubados sólo en medio capHSM-H, por adición de 3.5mM de $MgCl_2$ antes de la remoción de Ca^{2+} con EGTA o por incubación de los espermatozoides en medio bajo en Na^+ , probablemente debido a que bajo estas condiciones se puede inhibir la despolarización del potencial de membrana y el influjo de Na^+ causados por remoción de Ca^{2+} (González-Martínez, 2003; Torres-Flores y cols., 2008).

El hecho de que la caída de la movilidad no suceda cuando los espermatozoides son incubados en medio bajo en Na^+ , indicó que probablemente la despolarización del potencial de membrana, el influjo de Na^+ y el subsecuente aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, provocado por remoción de Ca^{2+} del medio, pudieran estar relacionados con la pérdida de la movilidad espermática.

Sin embargo, al realizar los experimentos descritos en el apartado 6.4 donde la valinomicina por si sola no causa un efecto sobre la movilidad espermática, se descartó que la despolarización del potencial de membrana estuviera relacionada con la pérdida de la movilidad espermática causada por remoción de Ca^{2+} del medio, ya que la movilidad espermática disminuye al remover el Ca^{2+} del medio, aún cuando el potencial de membrana se encuentra fijado a valores de aproximadamente -71 mV, lo cual evita la despolarización del potencial de membrana causada por remoción de Ca^{2+} .

Lo anterior nos señala que la pérdida de movilidad espermática causada por remoción de Ca^{2+} está probablemente relacionada sólo con el influjo de Na^+ y el subsecuente aumento en la $[Na^+]_i$, y no con la despolarización del potencial de membrana causados por remoción de Ca^{2+} del medio.

En el apartado 6.5, por último, probamos el efecto del mibefradil, un inhibidor de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo T y L, que además también puede bloquear canales de Na^+ (McNulty y cols., 2004) y canales de K^+ (Gomora y cols., 1999), sobre la movilidad de espermatozoides incubados en medio sin Ca^{2+} .

Los resultados obtenidos muestran que el mibefradil es capaz de conservar parcialmente la movilidad espermática en medio sin Ca^{2+} y que por si mismo causa una ligera reducción de la movilidad espermática estadísticamente significativa respecto al control.

Posiblemente el mibefradil tiene otro efecto el cual resulta en un decremento en la movilidad espermática, como se ha sugerido por el hecho de que la movilidad espermática se reduce 10% en medio con Ca^{2+} , un fenómeno previamente observado (Treviño y cols., 2004). En este sentido, el mibefradil es capaz de bloquear Ca_v tipo-T en células espermáticas (Arnoult, y cols., 1998), un influjo de Ca^{2+} inducido por K^+ externo (Blackmore y cols., 1999) y un canal de K^+ encontrado en el flagelo del espermatozoide (Navarro y cols., 2007).

Por otra parte, el hecho de que el mibefradil ayude a preservar la movilidad espermática en ausencia de Ca^{2+} en el medio, puede deberse también a que evita el influjo de Na^+ , como sucede con la adición de 3 mM de MgCl_2 ó en la incubación de espermatozoides en medio bajo en Na^+ .

Todo lo anterior es consistente con la hipótesis de que en condiciones de reposo, hay un canal de Ca^{2+} cuya actividad contribuye al Ca^{2+} intracelular en reposo y la selectividad de este canal puede ser conferida por la unión del Ca^{2+} a un sitio externo, un sitio que también puede ser ocupado por Mg^{2+} , sin embargo, cuando el Ca^{2+} es removido la selectividad puede ser cambiada a un canal de Na^+ de alta conductancia (Torres-Flores y cols., 2008) y es probable que el mibefradil pudiese bloquear también este canal.

Los resultados mostrados en este trabajo revelan que la pérdida progresiva de la movilidad espermática inducida por remoción de Ca^{2+} externo no está relacionada al decremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pero sí al influjo de Na^+ y al subsecuente aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ o a una consecuencia indirecta de esta, es posible que el influjo de Na^+ se dé a través de un canal de Ca^{2+} que permite el paso de Na^+ cuando el Ca^{2+} es removido del medio.

Estos hallazgos son consistentes con los hechos en espermatozoides desmembrados (Feng y cols., 1988), que muestran que la movilidad inicial no requiere calcio y que la posterior pérdida de la movilidad espermática es debida a diferentes procesos en la membrana.

Se ha visto que en ausencia de Ca^{2+} externo CatSper puede conducir Na^+ de una manera independiente de voltaje (Kirichok y cols., 2006), por lo cual podría estar relacionado también con la despolarización del potencial de membrana y con la pérdida de la movilidad espermática causadas por remoción de Ca^{2+} del medio.

A partir de esto es posible que CatSper pudiera ser el canal responsable del influjo de Na^+ que se da en ausencia de Ca^{2+} . Consecuentemente, CatSper puede contribuir al establecimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en reposo (Torres-Flores y cols., 2008).

En conjunto, lo anterior podría explicar la pérdida de movilidad observada en espermatozoides de tipo silvestre y el mantenimiento de ésta en espermatozoides de ratones knockout para CatSper 3 y 4 (*Jin y cols., 2007*).

Por lo cual, es probable que acorde a los resultados mostrados en este trabajo, la remoción de Ca^{2+} externo no despolariza el potencial de membrana ni incrementa la $[\text{Na}^+]_i$ en los espermatozoides de ratones knockout para CatSper, como ocurre en los espermatozoides humanos incubados con mibefradil, medio bajo en Na^+ y medio adicionado con 3 mM de MgCl_2 .

Siendo CatSper un canal que también es activado por pH (*Kirichok y cols., 2006*), hace falta estudiar el papel que puede tener el pH sobre la movilidad de espermatozoides incubados en medio sin Ca^{2+} .

Por otro lado, canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo-T han sido detectados en espermatozoides de ratón (*Arnoult y cols., 1996*) y humano (*Jagannathan y cols., 2002*), los cuales en células pituitarias GH3 también permiten el paso de Na^+ en la ausencia de Ca^{2+} externo, han sido inmunodetectados en espermatozoides maduros de ratón y humano (*Treviño y cols., 2004*), de tal forma que este tipo de canales pudieran también estar involucrados en los procesos que se han expuesto aquí (*Torres-Flores y cols., 2008*).

Como se mencionó en el marco teórico, se ha propuesto que el Na^+ , puede permear a través de canales de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} externo y que incrementa la $[\text{Na}^+]_i$, también puede estimular la función de la ATPasa Na^+/K^+ (*Espinosa y Darszon, 1995*). De igual forma, se ha indicado que el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ inducido por remoción de Ca^{2+} del medio, puede soportar una alta actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ . Bajo estas condiciones el potencial de membrana depende principalmente de la actividad de este transportador que hiperpolariza la membrana plasmática sobre la restauración de Ca^{2+} (*González-Martínez, 2003*).

Así, es posible pensar que probablemente cuando los espermatozoides son incubados en ausencia de Ca^{2+} externo, la entrada de Na^+ causa un alto gasto energético, necesario para poder soportar la elevación en la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ que estaría tratando de mantener baja la $[\text{Na}^+]_i$; por lo tanto, posiblemente el ATP usado para este propósito estaría teniendo una disponibilidad limitada para poder sostener la actividad de la dineína que hidroliza moléculas de ATP y convierte la energía química liberada en energía mecánica, que permite el activo deslizamiento del doblete externo de microtúbulos, haciendo que el flagelo se doble y el espermatozoide se pueda desplazar.

Probablemente la disminución de los niveles de ATP también puede provocar que la ACs produzca niveles mas bajos de AMPc y por tanto no se estimule a la PKA, lo cual inhibiría la fosforilación de proteínas flagelares que participan en la movilidad espermática, haciendo que esta disminuya.

Para corroborar lo mencionado anteriormente sería necesario realizar experimentos de medición de los niveles de ATP y de AMPc en espermatozoides humanos incubados en medio sin Ca^{2+} .

9.-CONCLUSIONES

- La remoción de Ca^{2+} con EGTA está relacionado con la pérdida de la movilidad inicial en el espermatozoide humano.

-La pérdida de la movilidad inicial en el espermatozoide humano, inducido por remoción de Ca^{2+} con EGTA, es reversible con restitución de Ca^{2+} , similar a la adición de 3mM de MgCl_2 y parcialmente cuando el medio de capacitación HSM-H es remplazado por el medio de capacitación HSM-H bajo en Na^+ .

-La pérdida de la movilidad inicial en espermatozoides humanos, causada por remoción de Ca^{2+} con EGTA, puede ser prevenida por adición previa de 3mM de MgCl_2 al medio o por incubación en medio bajo en Na^+ .

-La despolarización del potencial de membrana inducida por remoción de Ca^{2+} con EGTA no está relacionada con la pérdida de la movilidad inicial en el espermatozoide humano.

-El influjo de Na^+ inducido por remoción de Ca^{2+} con EGTA está relacionado con la pérdida de la movilidad inicial en el espermatozoide humano.

-La incubación con 20 μM de mibefradil causa una pequeña reducción del porcentaje de movilidad espermática y previene parcialmente la pérdida de la movilidad inicial causada por remoción de Ca^{2+} con EGTA en espermatozoides humanos.

9.-ANEXO

En el manual de laboratorio para la examinación de semen humano y la interacción entre semen y moco cervical de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se establecen los procedimientos y parámetros considerados como estándares en la evaluación del semen humano, los cuales podemos observar en la tabla III que se presenta a continuación:

Parámetro	Valor
Volumen	$\geq 2\text{ml}$
Ph	7.2-7.8
Concentración espermática	$\geq 20 \times 10^6$ espermatozoides/ml
Cantidad total de espermatozoides	$\geq 40 \times 10^6$
Movilidad	$\geq 50\%$ con movilidad progresiva o $\geq 25\%$ con movilidad progresiva lineal
Morfología	$\geq 50\%$ espermatozoides con morfología normal
Viabilidad	$\geq 50\%$ espermatozoides vivos

Tabla III.- Parámetros establecidos por la OMS para la evaluación del semen humano (WHO, 1999).

10.-BIBLIOGRAFÍA

- [1] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2004. Molecular biology of the cell. Garland Publishing. 4^a ed.; Cap.20, 1083-1109.
- [2] Álvarez L.C. 2003. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del sperm class analyzer. Tesis doctoral. Departamento de biología funcional y antropología física. Universidad de Valencia; 17-22.
- [3] Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. 1996. Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. Proc Natl Acad Sci.; 93,13004–13009.
- [4] Arnoult, C., Villaz, M. and Florman, H.M. 1998. Pharmacological Properties of the T-Type Ca²⁺ Current of Mouse Spermatogenic Cells. Mol Pharmacol.; 53, 1104-1111.
- [5] Baker M., Lewis B., Hetherington L. y Aitken R.J. 2003. Development of the signalling pathways associated with sperm capacitation during epididymal maturation. Molecular Reproduction and Development; 64, 446–457 .
- [6] Baldi E., Luconi M., Bonaccorsi L., Krausz C. y Forti G. 1996. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodeling pathways. Frontiers in Bioscience; 1,189-205.
- [7] Blackmore, P.F. and Eisoldt, S. 1999. The neoglycoprotein mannose–bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-type calcium channels in human spermatozoa. Mol Hum Reprod.; 5, 498-506.
- [8] Branham M.T., Mayorga L.S. y Tomes C.N. 2006. Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein Kinase A-independent, Epac-mediated pathway. The Journal of Biological Chemistry; 281 (13) ,8656–8666.

- [9] Carlson A.E., Westenbroek R.E., Quill T., Ren D., 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. PNAS; 100 (25), 14864-14868.
- [10] Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. 2003. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. Pharmacol.; 55, 575-578.
- [11] Cooper, T.G. 1986. The epididymis, sperm maturation and fertilization. Springer Verlag, Heidelberg.
- [12] Cooper, T.G. 2007. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. Asian J. Androl.; 9 (4), 533–539.
- [13] Cornwall G.A. 2009. New insights into epididymal biology and function. Human Reproduction Update; 15 (2), 213–227.
- [14] Darszon A. Beltrán C., Felix R., Nishigaki T. and Treviño C.L. 2001. Ion transport in sperm signaling. Developmental Biology; 240, 1-14.
- [15] Darszon A., Takuya N., Wood C., Treviño C.L., Felix R. y Beltrán C. 2005. Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology. International Review of Cytology; 243, 83-100.
- [16] Darszon A., Acevedo J., Galindo B., Hernández-González E., Nishigaki T., Treviño C., Wood C. y Beltran C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. Reproduction Review; 131, 977-988.
- [17] Darszon A. 2007. Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM. 25 Aniversario; .14, 29-42.
- [18] Espinosa F. y Darszon A. 1995. Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca^{2+} . FEBS Lett. 372; Pp.:119–125.

- [19] Feng, B., Bhattacharya, A. and Yanagimachi, R. 1988. Ca^{2+} is essential for the motility of plasma membrane-intact, but not of demembrated, hamster spermatozoa. *Andrologia*. 20, 155-162.
- [20] García-Sánchez N.L. 2006. Detección y calibración del contenido de sodio intracelular por fluorescencia de isoftalato de benzofurano (SBFI) en el espermatozoide humano. Tesis de Licenciatura. Capítulo 4, Pp 14-15.
- [21] Gartner P.L. y Hiatt L.J. 2002. Texto atlas de histología. McGraw-Hill 2ª Ed.; 463-483.
- [22] Gilbert F.S. 2006. Biología del desarrollo. Médica panamericana. 7ª ed. Cap7; 198-201. Cap.19; 671-673.
- [23] Gomora, J.C., Enyeart, J.A. and Enyeart, J.J. 1999. Mibefradil potently blocks ATP-activated K^+ channels in adrenal cells. *Mol Pharmacol.*; 56, 1192-119.
- [24] González-Martínez M.T., Bonilla-Hernández M.A. y Guzman-Grenfell A.M. 2002. Stimulation of voltage-dependent calcium channels during capacitation and by progesterona in human sperm. *Archives in Biochemistry and Biophysics*; 408, 205-210.
- [25] González-Martínez M.T. 2003. Induction of a sodium-dependent depolarization by external calcium removal in human sperm. *Journal of biological chemistry*; 278 (38), 36304–36310.
- [26] 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. I. Induction of changes in plasma membrane potential by the proton ionophore CCCP. *Biochim. Biophys. Acta*; 1464, 188–198.
- [27] Hernández-González E.O., Sosnik J., Edwards J., Acevedo J.J., Mendoza-Lujambio I., López-González I., Demarco I., Wertheimer E, Darszon A. y Visconti P.E. 2006. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the

capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *The Journal of Biological Chemistry*; 281 (9), 5623-5633.

[28] Hernández-Rueda Y.L. 2008. Efecto de la papaverina y la pentoxifilina en la movilidad y en el influjo de calcio inducido por la progesterona en el espermatozoide humano. Tesis de licenciatura; 5-12.

[29] Herrick S.B. 2005. The acrosomal Vesicle of Mouse sperm is a calcium store. *Journal of cellular physiology*; 202, 663-671.

[30] Hoskins DD y Vijayaraghavan S. 1990. A new theory on the acquisition of sperm motility during epididymal transit. En Gagnon C, PH.D. (ed). *controls of sperm motility biological and clinical aspects*. CRC press; 53-62.

[31] Jagannathan S., Punt EL, Gu Y., Arnoult C, Sakkas D, Barratt C.L., Publicover S.J. 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.

[32] Jin J., Jin N., Zheng H., Ro S., Tafolla D., Sanders K.M. y Yan W. 2007. *Catsper3* and *catsper4* are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility; *Biol Reprod.*; 77, 37–44.

[33] Jones R. 1998. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J reprod fert suppl.*; 53, 73-84.

[34] Kirichok Y., Navarro B. y Clapham D.E. 2006. Whole-cell Patch-Clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature*; 439, 737–740.

[35] Lamirande E y Gagnon C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular human reproduction*; 3 (3), 175-194.

- [36] Litvin T., Kamenetsky M., Zarifyan A., Buck J. y Levin L. 2003. Kinetic Properties of “Soluble” Adenylyl Cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem.*; 278 (18), 15922-15926.
- [37] Liu J., Xia J., Cho K., Clapham D.E. y Ren D. 2007. CatSper β , a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *Journal of Biological Chemistry*; 286 (26), 18945-18952.
- [38] McNulty, M.M. y Hanck, D.A. 2004. State-dependent mibefradil block of Na⁺ channels. *State. Mol Pharmacol.*; 66, 1652-1661.
- [39] Mortimer S.T. 2000. CASA-Practical aspects. *Journal of Andrology*; 515-524.
- [40] Navarro, B, Kirichok, Y. and Clapham, D.E. 2007. KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci.*; 104, 7688-7692.
- [41] Neri-Vidaurri P. 2007. Sensibilidad de los canales de calcio dependientes de voltaje al pH_i en el espermatozoide humano capacitado. Efecto modulador del AMPc. Tesis de maestría en ciencias biológicas; 8-10.
- [42] Pinto F.M., Ravina C.G., Fernández-Sánchez M., Gallardo-Castro M., Cejudo-Román A. y Candenas L. 2009. Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channels in human sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 7, 71.
- [43] Publicover S., Harper C.V. y Barratt C. 2007. [Ca²⁺]_i signalling in sperm-making the most of what you've got. *Nature Cell Biology*; 9 (3), 235-242.
- [44] Sanchez G., Nguyen A.N.T., Timmerberg B., Tash J.S. y Blanco G. 2006. The Na,K-ATPase $\alpha 4$ isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. *Molecular Human Reproduction*; 12 (9), 565–576.
- [45] Si Y. y Olds-Clarke P. 2000. Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol. Reprod.*; 62, 1231-1239.

- [46] Suarez S.S., Varosi S.M. y Dai X. 1993. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. PNAS; 90, 4660-4664.
- [47] Suarez S.S. y Ho HC. 2003. Hyperactivation of mammalian sperm. Cellular and molecular biology; 49 (3), 351-356.
- [48] Suarez S.S. 2008. Control of hyperactivation in sperm. Human Reproduction Update; 14 (6), 647-657.
- [49] Sullivan R., Frenette G. y Girouard J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. Asian J andrology; 9, 483-491.
- [50] Torres-Flores V., García-Sánchez N. y González-Martínez. 2008. Intracellular sodium increase induced by external calcium removal in human sperm. Journal of Andrology; 29 (1), 63-69.
- [51] Trevino CL, Felix R, Castellano LE, Gutierrez C, Rodriguez D, Pacheco J, Lopez-Gonzalez I, Gomora J, Tsutsumi V, Hernandez-Cruz A, Fiordelisio 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.
- [52] Turner R.M. 2006. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. Reproduction, Fertility and Development; 18; 25-38.
- [53] Visconti P.E., Westbrook V.A., Chertihin O., Demarco I., Sleight S. y Diekman A.B. 2002 Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. Journal of reproductive immunology; 53, 133-150.
- [54] Wang D., Hu J., Bobulescu I.A., Quill T.A., McLeroy P., Moe O.W. y Garbers D.L. 2007. A sperm-specific Na^+/H^+ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). PNAS; 104 (22), 9325-9330.

- [55] WHO. 1999. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 128 (Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press, Cambridge, U.K; New York, N.Y.).
- [56] Woo A.L., James P.F. y Lingrel J.B. 2002. Roles of the Na,K-ATPase $\alpha 4$ isoform and the Na⁺/H⁺ exchanger in sperm motility. *Molecular Reproduction and Development*; 62, 348-356.
- [57] Xia J., Reigada D., Mitchell C.H. y Ren D. 2007. CATSPER Channel-Mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to head propagation. *Biology of Reproduction*; 77, 551-559.
- [58] Yanagimachi, R. 1970. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J. Reprod. Fertil.* 23, 193-196.