



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

El aumento del sodio intracelular inducido por la eliminación de calcio externo regula la movilidad del espermatozoide humano

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. VÍCTOR MANUEL TORRES FLORES

TUTOR: DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ
DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/134/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **06 de septiembre de 2010**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **TORRES FLORES VÍCTOR MANUEL** con número de cuenta **91602947** con la tesis titulada: **"El aumento del sodio intracelular inducido por la eliminación de calcio externo regula la movilidad del espermatozoide humano"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL**:

Presidente:	DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO
Vocal:	DR. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU
Vocal:	DR. JAIME EDUARDO CALIXTO GONZALEZ
Vocal:	DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMIREZ
Secretario:	DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

De acuerdo con lo anterior, el(a) alumno(a) se acogió a la nueva normatividad, con base en el artículo QUINTO TRANSITORIO en apego a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (9 octubre de 2006).

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 03 de marzo de 2011.

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/ipp

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La presente investigación se realizó gracias al programa de apoyo de investigación (PAPIIT) y a CONACY en el proyecto titulado "Modulación del contenido de calcio intracelular en el espermatozoide humano" (49517).

Agradezco a los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Alberto Darszon Israel

Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez

Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Marco Tulio González Martínez y el Dr. Alberto Darszon Israel. En el laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México, gracias por mi lugar en las aulas, por la educación y la cultura, por el presente y el futuro.

Quiero agradecer en 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 apoyo, por compartir sus conocimientos.

Gracias al Dr. Alberto Darszon Israel, por su incalculable apoyo, profesionalismo, consejos estímulos y mucha paciencia que me ayudaron a que este trabajo se concluyera.

Agradezco a los miembros del jurado:

Dra. Patricia Rosas Saucedo
Dr. Takuya Nishigaki Shimiku
Dr. Jaime Eduardo Calixto González
Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez
Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros

Por sus finas atenciones, valiosas sugerencias, orientación y apoyo en el proceso de la elaboración de esta tesis.

A los Doctores Luis Manuel Montaña Ramírez, Juan Arcadio Molina Guarneros, y a la Dra. Claudia Treviño, por su incalculable apoyo, profesionalismo, consejos estímulos y mucha paciencia que me ayudaron a que este trabajo se concluyera.

A los Doctores Guillermo Robles Díaz, Nicandro Mendoza Patiño y Alfredo Saldivar González, por su apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A la Bióloga Yadira Libertad Hernández Rueda, por la colaboración en el análisis de fluorescencia y de movilidad espermática.

Al Biólogo Giovanni Picazo Juárez, por su colaboración en el análisis de movilidad espermática.

A Araceli, por su valioso apoyo en el trabajo de laboratorio.

DEDICATORIAS

ESTA MEMORIA REPRESENTA TAN SOLO UNA PARTE DE MI VIDA, DONDE CADA UNO DE USTEDES HAN SIDO LOS PROTAGONISTAS EN TODO MOMENTO.

CON CARIÑO A MIS HIJOS: **VIVIAN Y VÍCTOR ANDRES**

QUIENES LE HA DADO UN SIGNIFICADO A MI VIDA ESPERO QUE EN EL FUTURO ESTO SEA UN MOTIVO DE SUPERACIÓN.

CON AMOR A MI ESPOSA **VIANNEY**

POR ESTAR A MI LADO, POR TODO EL APOYO TANTO EN CASA COMO PROFESIONALMENTE, PERO SOBRE TODO POR EL CARIÑO Y COMPRENSIÓN QUE HE RECIBIDO DURANTE TODO ESTE TIEMPO

A MIS PADRES

POR DARME EL SER Y BRINDARME SU APOYO Y CONFIANZA PARA SEGUIR ADELANTE Y CON LA SEGURIDAD DE CONTAR SIEMPRE CON USTEDES.

A MIS HERMANOS

POR TENER UN CARÁCTER DE LUCHA Y SOBRE TODO POR FORMAR PARTE DE MI FAMILIA

Dr. MARCO TULIO GONZALEZ

Me es grato dirigir estas palabras a un gran hombre, maestro, ejemplo y un gran amigo.

Maestro de maestros, ya te has ido a la región de la que no se vuelve, mas tu recuerdo de hombre tan querido como un manto de luz hoy nos envuelve, y aunque el pecho se siente adolorido por tu ausencia que soledad devuelve, nuestras voces en cruel melancolía quieren rendirte eterna pleitesía.

Honor a tu obra limpia y justa, venciendo todo obstáculo, para hacer que tu ciencia, que forjaste, fuera amor a tu limpia trayectoria.

Hoy que te has ido, el corazón ya gime con el solo recuerdo a tu memoria; maestro de maestros, tu grandeza, perdura en tu vigor y entereza.

Maestro insigne, hoy que reconozco tu virtud humana, el valor de la dignidad contemplo, y en un instante de emoción y encanto yo te digo maestro: ¡fuiste el mejor!

Todavía aletea en el laboratorio tu firme voz, que al darla con sapiencia, supo forjar en los alumnos, el ensueño por recibir la ciencia...y en la lógica de las emociones. Alentabas con el gesto feliz de tu sonrisa.

Maestro de maestros, en tu frente colocamos los lauros de la gloria, tus trabajos y enseñanzas dejaron en el laboratorio, ejemplos de honradez, justicia, constancia y superación que recordaremos en tu fiel memoria.
Dr. Marco Tulio hombre cabal hoy te rendimos, póstumo tributo

ÍNDICE

INDICE GENERAL	vi
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCION	5
1.1 Espermatogénesis.....	8
1.2.- Maduración del espermatozoide.....	10
1.2.1.- Maduración en el epidídimo.....	10
1.2.2.-Maduración en el tracto genital femenino.....	12
1.2.2.1. Capacitación espermática.....	12
1.2.2.2. Movilidad espermática.....	14
1.2.2.2.1. Cuantificación de la movilidad espermática.....	15
1.3.- Ca ²⁺ y canales de Ca ²⁺ en el espermatozoide.....	17
1.3.1. Canales de calcio.....	18
1.3.1.1 Canales de calcio dependientes de voltaje.....	19
1.3.1.1.1. Clasificación.....	20
1.3.1.1.2. Localización y estudio molecular.....	22
1.3.1.2. Canales catiónicos del espermatozoide.....	23
1.3.1.2.1. Relación Catsper- movilidad.....	25
1.3.2. Espermatozoides incubados en medio sin Ca ²⁺	25
II. JUSTIFICACIÓN	28
III. HIPÓTESIS	29
IV. OBJETIVOS	30
V. MATERIALES Y MÉTODO	31
5.1 Materiales y medios.....	31
5.2 Purificación de los espermatozoides.....	31
5.3 Carga con Fura-2, AM para la determinación de calcio.....	31

5.4. Mediciones simultáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ y el potencial de membrana.....	32
5.4.1. Calibración de la $[Ca^{2+}]_i$	33
5.4.2. Calibraciones del potencial de membrana.....	33
5.5. Cargado del detector de sodio SBFI-AM	35
5.5.1. Calibración de la $[Na^+]_i$	35
5.6. Carga con BCECF-AM para la determinación de pH_i	36
5.7. Ensayos de Movilidad.....	37
5.8. Cuantificación del AMPc.....	38
5.9. Medición del contenido de ATP.....	38
5.10. Ensayos experimentales.....	39
5.11. Análisis estadístico.....	39
VI. RESULTADOS.....	40
6.1 Determinación cinética del influjo de calcio.....	40
6.2. Efecto de la concentración de sodio externo.....	41
6.3. Variaciones en el potencial de membrana	43
6.4. El mibefradil hiperpolariza e inhibe parte de la entrada de Ca^{2+}	44
6.5. Efecto del pH sobre el sodio y el potencial de membrana.....	47
6.6. Efecto de la disminución de Ca^{2+} extracelular - sobre la movilidad espermática.....	49
6.7. Movilidad espermática y mecanismos de transporte iónico.....	51
6.8. Contenido de AMPc. y ATP.....	54
VII. DISCUSIÓN.....	55
VIII. CONCLUSIONES.....	60
IX. PERSPECTIVAS.....	61
X. BIBLIOGRAFIA.....	62
XI ANEXOS.....	71

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS

Figura 1	9
Representación esquemática de un espermatozoide de mamífero y la estructura del flagelo.	
Figura 2	14
Flujo de iones durante la capacitación y la hiperactivación en espermatozoide de mamíferos.	
Figura 3	17
El sistema CASA.	
Figura 4	20
Estructura y características funcionales de los Ca_v .	
Figura 5	24
Predicción topológica secundaria de CatSper1-4 Humanos.	
Figura 6	32
Representación esquemática del sistema óptico para las mediciones simultáneas de calcio intracelular y potencial de membrana.	
Figura 7	33
Calibración de la señal de calcio.	
Figura 8	35
Calibración del Potencial de Membrana.	
Figura 9	36
Calibración de la señal de sodio.	
Figura 10	37
Calibración del registro de BCECF-AM para el pH_i .	
Figura 11	38
Sistema de análisis automatizado de movilidad espermática (CASA).	
Figura 12	40
Efecto de la disminución de calcio del medio extracelular y su subsiguiente readición.	
Figura 13	42
Aumento de sodio intracelular inducida por la eliminación de calcio en función del sodio externo.	
Figura 14	43
Efecto de la inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ sobre el influjo de sodio inducido por la remoción de calcio en espermatozoides humanos.	

Figura 15	44
Efecto de la disminución de la concentración de calcio y la readición subsiguiente a diferentes voltajes.	
Figura 16	45
El mibefradil hiperpolariza e inhibe parte de la entrada de Ca^{2+} e induce la disminución de la $[\text{Na}^+]_i$ en espermatozoides despolarizados al eliminar el calcio externo.	
Figura 17	46
Efecto de mibefradil sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, PM y $[\text{Na}^+]_i$, en espermatozoides donde se disminuyó el calcio externo.	
Figura 18	47
Inducción de la hiperpolarización dependiente de la ATPasa Na^+/K^+ con mibefradil en espermatozoides donde el PM está despolarizado a causa de la eliminación de calcio.	
Figura 19	48
Efecto del pH_i sobre el sodio y el potencial de membrana.	
Figura 20	50
Efecto de la eliminación de calcio sobre la movilidad espermática.	
Figura 21	52
Efecto de la remoción de calcio y posterior restitución de calcio, sobre la movilidad de espermatozoides utilizados en el registro simultáneo de PM y de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o durante la determinación de la $[\text{Na}^+]_i$.	
Figura 22	53
Efecto de fijar el potencial de membrana sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Na}^+]_i$ y la movilidad espermática de los espermatozoides humano.	
Figura 23	54
Efecto de la eliminación de calcio externo en espermatozoides humanos sobre el contenido de AMPc y ATP.	
 Tabla 1	 22
Clasificación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.	

Anexo I	71
Principales valores cinemáticos aportados por el Sistema CASA para describir la trayectoria de un espermatozoide.	
Anexo II	72
Parámetros establecidos por la OMS para la evaluación del semen humano.	
Anexo III	73
Artículos.	

LISTADE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i.	Ca ²⁺ intracelular
[Na⁺]_i.	Sodio intracelular
ACs.	Adenilato ciclasa soluble
AMPc.	Adenosín monofosfato cíclico
CASA.	Computer-Assisted Sperm Analysis
CatSper.	Canales catiónicos específicos del espermatozoide
Ca_v.	Canales de Ca ²⁺ dependientes del voltaje
CP.	Microtúbulos
DA.	Brazos de dineína
DHPs.	1,4-dihidropiridinas
diSC₃ (5).	Diisopropiltiodicarbocianina yoduro
EGTA.	Àcido etilén glicol tetraacético
EM.	Vaina mitocondrial
ENaCs.	Canales epiteliales de Na ⁺
ES.	Error estándar
FD.	Factores descapacitantes
FMP.	Forward Motility Protein
Fura-2 AM.	Acetoximetil éster de Fura-2
GAPDS.	Glicolisis dependiente de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa-S
GNC.	Canales modulados por nucleótidos cíclicos
HCO₃.	Bicarbonato
HDL.	Lipoproteínas de alta densidad
I_{CatSper}.	Corriente de CatSper
LC.	Vaina fibrosa
Na_v.	Canales de sodio dependientes de voltaje
ODFs.	Fibras externas
OMDA.	Microtúbulos externos del axonema
ORF.	Estructura de lectura abierta
PDE.	Fosfodiesterasa
pH_i.	pH intracelular
PKA.	Proteína cinasa A
PM.	Muestra la membrana plasmática
PM.	Potencial de membrana
PTI.	Tecnología de Fotón Internacional
PTK.	Tirosina cinasa
RA.	Reacción acrosomal
RS.	Radiales
sNHE.	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺
SOC.	Canales activados por pozas internas
TR.	Arcos transversales
TRM.	Tracto reproductor masculino
TTX.	Tetrodotoxina
WT.	Ratones de tipo salvaje
ZP.	Zona pelúcida

RESUMEN

La reproducción sexual requiere de una comunicación entre los dos gametos, el espermatozoide y el ovocito, sin embargo los mecanismos moleculares involucrados no se conocen con detalle. Se ha encontrado que los cambios en la permeabilidad iónica de los gametos es una de las formas fundamentales de codificar señales tanto entre ellos como con su entorno.

Los flujos iónicos se llevan a cabo a través de transportadores de membrana como pueden ser canales iónicos, intercambiadores iónicos o ATPasas. El estudio de la identificación y farmacología de los transportadores de membrana, así como su regulación, permite tanto la mejor comprensión de la fisiología del espermatozoide como el desarrollo de mejores fármacos anticonceptivos.

Existe la evidencia que en los espermatozoides de ratón y de humanos, la eliminación del calcio externo produce una despolarización rápida dependiente de sodio que es presumiblemente debida a la entrada de sodio a través de canales de calcio. La restauración del calcio produce una hiperpolarización sensible a ouabaina que lleva al potencial de membrana en reposo a valores con frecuencia más negativo (Espinosa *et al.*, 1995; González-Martínez, 2003). Con base a lo anterior se planteó como objetivo caracterizar los mecanismos de entrada de calcio, estudiando los flujos iónicos que resultan al disminuir significativamente el calcio externo, y como estos regulan la movilidad del espermatozoide humano. Dicho objetivo se llevó a cabo determinando los cambios en la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) y de sodio ($[Na^+]_i$) inducidos por la remoción de calcio extracelular, así como la cuantificación de la movilidad espermática en esta condición.

Se determinó simultáneamente el potencial de membrana (V_m) y la $[Ca^{2+}]_i$ en poblaciones de espermatozoides humanos con las sondas fluorescentes diSC₃ (5) y fura 2 AM, respectivamente. La $[Na^+]_i$ y pH_i se midió de forma independiente de manera similar usando SBFI y BCECF, respectivamente. La motilidad se determinó en un sistema de CASA ("Computer-Assisted Sperm Analysis"), el ATP utilizando el ensayo de luciferina-luciferasa y AMPc por radioinmunoensayo.

En este trabajo se encontró que la remoción de calcio externo produce una entrada de sodio que despolariza al espermatozoide. La restauración del calcio induce una lenta disminución en la $[Na^+]_i$ sensible a ouabaina. El aumento en la $[Na^+]_i$ se inhibe por concentraciones micromolares de calcio y milimolares de magnesio.

Por otro lado se observó que la eliminación de calcio del medio produce una disminución en la movilidad de forma reversible, en pocos minutos. Este fenómeno está relacionado con el aumento en la $[Na^+]_i$. En un medio que contiene magnesio o con bajo contenido de sodio (substituido por colina), los espermatozoides mantienen su movilidad aun en ausencia de calcio externo. Lo anterior indica que la disminución de la movilidad está relacionada con la acumulación de Na^+ y/o la despolarización dependiente de Na^+ . La eliminación de calcio indujo un aumento en la $[Na^+]_i$ y una disminución de la movilidad, aun cuando el potencial de membrana se fijó en un valor cercano al de reposo con valinomicina, un ionóforo de K^+ . Esta observación descarta el posible papel del potencial de membrana en la inhibición de la movilidad.

El mibefradil, un bloqueador de los canales de calcio, inhibe notablemente la despolarización dependiente de Na^+ y la carga de sodio que ocurre al remover el calcio extracelular. Además, este compuesto conserva la movilidad espermática en estas condiciones. El mibefradil induce una hiperpolarización sensible a ouabaína cuando se agrega después de remover el calcio externo, pero no recupera la movilidad.

Para distinguir si la causa de la pérdida de movilidad del espermatozoide que ocurre al retirar el calcio externo se debe al aumento de $[Na^+]_i$ o a cambios en los niveles de AMPc o ATP que podrían estar ocurriendo, estos se midieron. El contenido de ATP del espermatozoide de humano disminuye en el medio control al tratar con EGTA. En cambio, se mantiene, en presencia o ausencia de EGTA, cuando el medio externo tiene colina en vez de Na^+ , o el medio control tiene 3 mM de Mg^{2+} o 20 μM de mibefradil. Los resultados sugieren que la carga de Na^+ inducida por la eliminación de calcio estimula la ATPasa Na^+/K^+ , disminuyendo el contenido de ATP, por consiguiente, este podría contribuir a detener la movilidad.

CatSper es el transportador responsable de la despolarización dependiente de Na^+ . Este nuevo canal de calcio, presente en los flagelos de espermatozoides de ratón y humano, es necesario para la movilidad hiperactivada y su ausencia conlleva a la infertilidad. Nuestros resultados funcionales y farmacológicos sugieren que la eliminación de calcio externo despolariza y aumenta la $[Na^+]_i$ en el espermatozoide de humano en buena medida debido a CatSper. Estos cambios se eliminan con mibefradil, al igual que en medios que contengan magnesio o bajo sodio. Estos hallazgos indican que mibefradil podría bloquear a CatSper.

ABSTRACT

Sexual reproduction requires communication between the two gametes, the sperm and the oocyte, but the molecular mechanisms involved are not known in detail. It has become apparent that changes in the permeability of gametes are key to encode signals among themselves and with their environment.

The ionic fluxes are carried out through membrane transporters such as ion channels, ion exchangers and ATPases. The identification and study of the pharmacology of membrane transporters (as well as their regulation) allows both a better understanding of the physiology of sperm, and the identification of drugs as potential contraceptives.

Evidence in human sperm indicates that removal of external calcium causes a rapid sodium dependent depolarization, presumably due to sodium influx through calcium channels. Calcium restoration produces a ouabain-sensitive hyperpolarization that brings the membrane potential (V_m) to values frequently more negative than resting (González-Martínez, 2003). Based on the above, the present work has sought to characterize the mechanisms of sodium influx caused by lowering external calcium and how this influx regulates human sperm motility.

V_m and $[Ca^{2+}]_i$ were simultaneously detected in human sperm populations with the fluorescent probes diSC₃(5) and fura 2. $[Na^+]_i$ and pH_i were measured independently in a similar fashion using SBFI and BCECF. Motility was determined in a CASA system, ATP using the luciferine-luciferase assay and cAMP by radioimmunoassay.

We found that sodium entry produces a Na^+ -dependent depolarization that produces a substantial increase in $[Na^+]_i$. The restoration of calcium produced a slow decrease in $[Na^+]_i$ which was inhibited by ouabain. The increase in $[Na^+]_i$ was inhibited by micromolar calcium and millimolar magnesium.

Human sperm motility reduction after calcium removal is related to the increase in $[Na^+]_i$. In magnesium containing medium, or in low sodium medium, motility did not decrease. Calcium removal induced $[Na^+]_i$ increase and motility decrease in sperm with their V_m clamped with valinomycin, indicating that the decrease was related to sodium loading, not to membrane potential depolarization. Mibefradil, a calcium channel blocker, markedly inhibited the Na -dependent depolarization and sodium loading, and also preserved sperm motility. This blocker induced a ouabain sensitive hyperpolarization in sperm subject to calcium removal-induced depolarization but no motility recovery. In EGTA-treated sperm

both ATP and cAMP decreased by 40 %. In contrast, ATP content was preserved when EGTA treatment was performed in choline medium or in medium containing either 3 mM Mg or 20 μ M mibefradil.

Sperm motility arrest induced by external calcium removal is not due its absence but mainly to sodium loading which stimulates the Na,K-ATPase decreasing the ATP content. CatSper is likely the transporter responsible for Na⁺-dependent depolarization. This new calcium channel in mouse sperm flagella is required for hyperactivated motility and its absence leads to infertility. The results presented suggest that external calcium removal should not depolarize or increase [Na⁺]_i in the CatSper-null mouse spermatozoa (Carlson *et al.*, 2009), as in human sperm incubated with mibefradil, or in media containing magnesium or low sodium. As recently reported, mibefradil blocks CatSper in the absence or presence of external calcium.

I. INTRODUCCIÓN

Entender la reproducción es muy importante no solo para la fisiología y la salud humana, sino para la ganadería, la pesca y para la preservación de las especies. La reproducción sexual requiere de la comunicación entre los gametos: el espermatozoide y el ovocito, sin embargo los mecanismos moleculares involucrados no se conocen con detalle. Los cambios en la permeabilidad iónica de los gametos es una de las formas fundamentales de codificar señales tanto entre ellos como con su entorno. Solo tenemos una visión parcial de la identidad molecular así como de los mecanismos de regulación de los transportadores iónicos involucrados en las funciones del espermatozoide (Darszon *et al.*, 2008; Costello *et al.*, 2009).

El flujo de iones a través de la membrana celular juega un papel fundamental en la fisiología en todas las células (desde bacterias hasta neuronas). El espermatozoide no es la excepción. Actualmente buena parte de la investigación sobre la fisiología espermática está encaminada a comprender como los canales iónicos regulan los eventos relacionados al proceso de la fecundación. Los flujos iónicos se llevan a cabo a través de transportadores de membrana como pueden ser canales iónicos, intercambiadores iónicos o ATPasas. El estudio de la identificación y farmacología de los transportadores de membrana (así como su regulación) permite tanto la mejor comprensión de la fisiología del espermatozoide como la identificación de fármacos con posibles efectos anticonceptivos.

La importancia de los canales iónicos en la fisiología del espermatozoide, y particularmente en aquellos permeables a calcio se ha vuelto cada vez más evidente. Los canales iónicos son instrumentos de dialogo entre el espermatozoide, su medio ambiente y el ovocito. En particular, el Ca^{2+} es un segundo mensajero que participa en la regulación de varios procesos fisiológicos del espermatozoide, tales como la capacitación, la movilidad y la reacción acrosomal.

Los espermatozoides maduros de los mamíferos están en reposo en el tracto reproductivo del macho. Después de la eyaculación, se convierten en móviles. A medida que se mueven a través del tracto reproductor femenino se vuelven competentes para fertilizar el ovocito. Durante este período, llamado capacitación, los espermatozoides comienzan a moverse progresivamente, desarrollando la movilidad hiperactivada, y pueden sufrir la reacción acrosomal (RA) (Yanagimachi, 1994). La capacitación requiere cambios en el pH_i , en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en el adenosín monofosfato cíclico (AMPC). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incrementa, ya sea

por la entrada de Ca^{2+} al citoplasma a través de los canales de la membrana plasmática, o por la liberación de Ca^{2+} de pozas internas. Se han propuesto que varios tipos de canales permeables a Ca^{2+} participan en la fisiología del espermatozoides (Darszon *et al.*, 2006), incluyendo los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje (Ca_V), los canales activados por pozas internas (por sus siglas en inglés SOC) los canales modulados por nucleótidos cíclicos (GNC), canales catiónicos específicos del espermatozoide (CatSper1-4) entre otros.

En la mayoría de los mamíferos los espermatozoides muestran dos tipos de movilidad. La movilidad activada que es vigorosa y resulta en una trayectoria casi recta que presentan los espermatozoides recién eyaculados. Por otro lado la movilidad hiperactivada, en la cual la curvatura del flagelo se vuelve más pronunciada y asimétrica, y se observa en el sitio de la fecundación. El proceso parece ser bifásico ya que los espermatozoides experimentan patrones de nado entre el estado activado y el estado hiperactivado (Ho y Suarez, 2001). Aunque la hiperactivación ocurre durante la capacitación, las vías de señalización de estos dos eventos no están completamente acopladas. Aún cuando los dos procesos requieren de Ca^{2+} y bicarbonato (HCO_3^-), cuantitativamente las necesidades son diferentes. La capacitación está asociada a la fosforilación en tirosinas dependiente de AMPc y la proteína cinasa A (PKA) sin embargo la hiperactivación no requiere de estos procesos (Márquez y Suarez, 2004). Existen muchas incógnitas acerca de los mecanismos de regulación de la hiperactivación. El Ca^{2+} externo es necesario y su concentración intracelular aumenta durante este proceso, pero la señal de iniciación se desconoce (Yanagimachi, 1994). La movilidad hiperactivada es crítica para la fecundación *in vivo* ya que le permite al espermatozoide llegar al ovocito a través del lumen del oviducto y penetrar el *cumulus oophorus* (células de la granulosa) y la zona pelúcida (ZP) del ovocito.

En espermatozoides de ratones se ha demostrado que la hiperactivación requiere de la presencia de CatSper1-4, un canal de calcio de una nueva familia que solo está presente en células espermátogénicas y en los flagelos de espermatozoides de mamíferos (Ren *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008). Los CatSpers parecen formar un tetrámero (1-4) que es muy pH_i dependiente y moderadamente voltaje dependiente. En ausencia de calcio externo CatSper funciona como un canal de sodio muy poco independiente de voltaje. Se ha propuesto que un aumento en el calcio intraflagelar producido al activarse CatSper 1-4 por un aumento en el pH_i regula la intensidad del movimiento flagelar típico de la hiperactivación (Kirichok *et al.*, 2006).

Sólo el espermatozoide capacitado penetra a la zona pelúcida y experimenta la RA, un proceso exocitótico necesario para la fusión del ovocito y el espermatozoide (Bleil y Wassarman, 1983; Darszon *et al.*, 2005). Hasta el presente, los mecanismos de transporte de calcio que establecen la $[Ca^{2+}]_i$ en el reposo no se conocen en detalle, ni los mecanismos que hacen que este se eleve durante la capacitación (González-Martínez 2003). Por lo tanto, es evidente que para comprender las bases moleculares de la capacitación y de la RA en espermatozoides humanos es necesario estudiar los sistemas de transporte iónico que regulan la $[Ca^{2+}]_i$ y como el potencial de membrana los afecta.

Los métodos ópticos para detectar el potencial de membrana y los cambios en las concentraciones de iones intracelulares han proporcionado información valiosa con respecto a los mecanismos de transporte iónico en espermatozoides de mamíferos. El potencial de membrana de reposo obtenido con colorantes fluorescentes en poblaciones de espermatozoides de ratón y humanas oscila entre -60 y -20 mV (Espinosa y Darszon, 1995; Zeng, *et al.*, 1995; Brewis, *et al.*, 2000; González-Martínez, *et al.*, 2002; González-Martínez, 2003; Torres-Flores *et al.*, 2008). Se reportó que en un medio sin calcio, el potencial de membrana de reposo en espermatozoides tanto de ratón (Espinosa y Darszon, 1995) como de humanos se despolariza con respecto a los valores en un medio con calcio (Foresta *et al.*, 1993; Guzmán-Grenfell *et al.*, 2000). En espermatozoides de ratón, la adición de calcio a los espermatozoides incubados en medio sin calcio produce una hiperpolarización transitoria de la membrana plasmática que en parte es sensible a ouabaina, un inhibidor de la ATPasa Na^+/K^+ (Espinosa y Darszon, 1995). Lo anterior ocurre también en humano (González-Martínez, 2003; Torres-Flores *et al.*, 2008). Esta evidencia sugiere que el calcio puede regular el potencial de membrana del espermatozoide de mamíferos a través de un canal de calcio que contribuiría a la $[Ca^{2+}]_i$ en el reposo y que en ausencia de calcio externo despolarizaría a la célula al dejar pasar sodio.

El proyecto aquí planteado se realizó basándose en mediciones ópticas de la $[Ca^{2+}]_i$, potencial de membrana (PM) y sodio intracelular ($[Na^+]_i$) en poblaciones de espermatozoides humanos. Exploramos los mecanismos de entrada de calcio que participarían en el establecimiento de la $[Ca^{2+}]_i$ al disminuir el calcio externo y como este regula la movilidad del espermatozoide humano. El trabajo se centra en el estudio de un posible canal de calcio que en condiciones de bajo calcio contribuiría significativamente a la entrada al calcio intracelular en espermatozoide humano.

1.1-. ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es la sucesión de acontecimientos mediante los cuales las espermatogonias se transforman en espermatozoides dentro de los testículos. Este proceso de maduración se inicia en la pubertad (13-16 años) y continúa hasta la edad avanzada.

Estas espermatogonias, que estuvieron inactivas en los túbulos seminíferos de los testículos desde el periodo fetal tardío, comienzan a aumentar de número en la pubertad. Después de varias divisiones celulares mitóticas, crecen y sufren cambios graduales que las transforman en espermatocitos primarios, las células germinativas más grandes en los túbulos seminíferos. De manera posterior, cada espermatocito primario sufre una división de reducción, que se llama primera división meiótica, que tienen casi la mitad del tamaño de los espermatocitos primarios para formar dos espermatocitos secundarios haploides. Después los espermatocitos secundarios sufren una segunda división meiótica para formar cuatro espermátides haploides que tienen casi la mitad del tamaño de los espermatocitos secundarios. Durante esta división, ya no se reduce más el número de los cromosomas. De manera gradual, las espermátides se transforman en cuatro espermatozoides maduros por un proceso que se conoce como espermiogénesis. Durante esta metamorfosis, se condensa el núcleo, se forma el acrosoma y se elimina la mayor parte del citoplasma. La espermatogénesis, que incluye la espermiogénesis, requiere aproximadamente dos meses para que se complete y continúa de manera normal durante toda la vida reproductiva de un varón. Cuando termina la espermiogénesis, los espermatozoides pasan a la luz de los túbulos seminíferos y se desplazan hacia el epidídimo, en donde se almacenan y maduran funcionalmente.

El espermatozoide maduro es una célula con movilidad activa, que nada de manera libre, constituido por una cabeza y un flagelo (Figura 1). La unión entre la cabeza y el flagelo se llama pieza intermedia del espermatozoide. La cabeza del espermatozoide, que contiene la mayor parte del volumen del espermatozoide, también el contiene el núcleo de la célula que en el caso del humano posee 23 cromosomas (Gilbert, 2006).

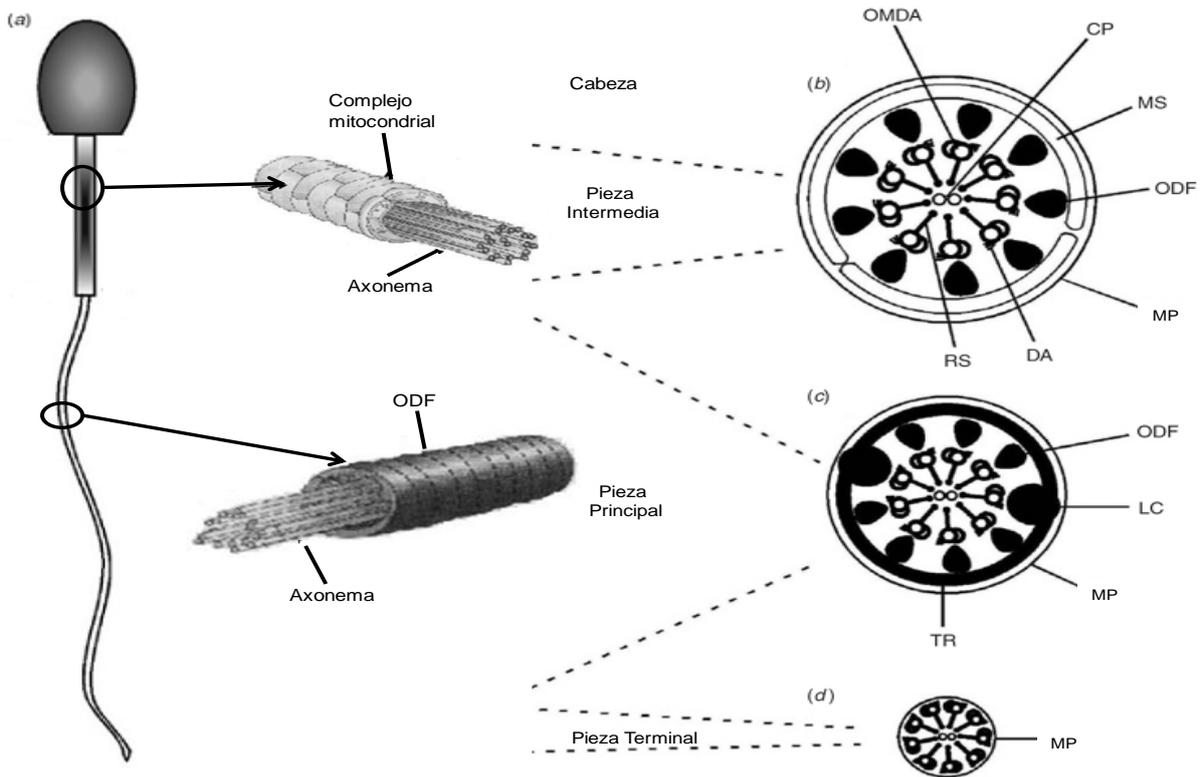


Figura 1. Representación esquemática de un espermatozoide de mamífero y la estructura del flagelo. a) Los espermatozoides de mamíferos se dividen estructuralmente en tres piezas: la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal. b) Esquema de la sección transversal a través de un segmento representativo de la pieza intermedia que muestra la membrana plasmática (MP) y la vaina mitocondrial (EM) que rodea las nueve fibras externas (ODFs). Dentro de la ODFs se encuentran los componentes del axonema; los nueve dobletes de microtúbulos externos del axonema (OMDA) asociados con los brazos de dineína (DA) y los radiales (RS) así como con el par central de dobletes de microtúbulos (CP). c) Esquema de la sección transversal de un segmento representativo de la pieza principal que muestra a la MP rodeando las siete ODFs. Las ODFs 3 y 8 se han sustituido por las dos columnas longitudinales de la vaina fibrosa (LC). Las dos columnas están conectadas por arcos transversales (TR). d) Esquema de sección transversal a través de un segmento representativo de la pieza final. La ODFs y la FS terminan en forma cónica al final de la pieza principal por lo que ya no están presentes en la pieza final, quedando sólo la PM para rodear el axonema (Modificado de, Eckert, 1990; De Jonge y Barratt, 2006; Turner, 2006).

En la cabeza de los espermatozoides de mamíferos existe una vesícula secretora llamada vesícula acrosómica. Esta vesícula contiene enzimas hidrolíticas que ayudan a atravesar la envoltura externa del ovocito. Cuando un espermatozoide entra en contacto con un ovocito, el contenido de la vesícula se libera por exocitosis, la denominada reacción acrosomal; en algunos espermatozoides esta reacción también deja al descubierto o libera proteínas que colaboran específicamente en la unión del espermatozoide con la cubierta de ovocito.

La cola del espermatozoide es un largo flagelo, cuyo axonema emerge de un corpúsculo móvil basal situado justo por debajo del núcleo. El axonema está formado por dos microtúbulos centrales rodeados por nueve dobletes de microtúbulos dispuestos

ordenadamente. El flagelo de mamífero se diferencia de otros flagelos en que el habitual patrón 9 + 2 del axonema está rodeado además por nueve fibras densas externas (Figura 1b-d). Se desconoce el papel que desempeñan estas fibras densas y no contráctiles en el movimiento del flagelo, que se produce por el deslizamiento entre los dobletes adyacentes de microtúbulos. El movimiento flagelar está impulsado por las dineínas, proteínas motoras de los microtúbulos, que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para el deslizamiento de los microtúbulos. El ATP proviene de dos fuentes: 1) de la fosforilación oxidativa, que se genera en las mitocondrias localizadas en la pieza intermedia del espermatozoide y 2) de la glucólisis, que se produce a lo largo de la longitud del flagelo del espermatozoide (Alberts *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2008).

1.2.- MADURACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

La maduración espermática se ha definido como el desarrollo de la capacidad de los espermatozoides para fertilizar al ovocito (Cooper, 2007). La maduración espermática inicia en el epidídimo y termina en el tracto genital femenino (Breitbart, 2002; Sullivan *et al.*, 2007).

1.2.1. MADURACIÓN EN EL EPIDÍDIMO

Los espermatozoides recién formados son incapaces de moverse, por lo que el epidídimo es el responsable del transporte de los espermatozoides, así como de su maduración, concentración y almacenamiento (Sullivan *et al.*, 2007).

El epidídimo es un tubo muy espiralizado (5-6 metros 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 su vez con la uretra, la cual desemboca en el exterior del cuerpo (Gartner y Hiatt, 2002).

Una de las funciones principales del epidídimo es la secreción de proteínas llamadas factores estabilizantes del acrosoma o factores descapacitantes (FD), cuya función es evitar que se dé la reacción acrosomal en el tracto reproductor masculino (TRM), fenómeno que el espermatozoide cumple al estar en contacto con la zona pelúcida del ovocito (Jones, 1998).

En el epidídimo se completan cambios morfológicos en los espermatozoides en su tamaño y su forma, así como en la estructura interna del acrosoma y la migración de la gota citoplasmática desde una posición proximal hasta una posición distal en la pieza intermedia, y su posterior desprendimiento. Esta migración es diferente entre las distintas especies de mamíferos (Álvarez, 2003).

Las modificaciones bioquímicas que se presentan durante el tránsito a través del epidídimo son resultado de ciertas sustancias secretadas por las células del epitelio epididimario (proteínas, ácido siálico, carnitina, iones inorgánicos, etc.); y se van a dar en todos los compartimentos celulares del espermatozoide: el acrosoma, el núcleo, el flagelo y la membrana plasmática. Esta última es la que experimenta más modificaciones, debido a la adición de proteínas, principalmente glicoproteínas (Jones, 1998). La composición lipídica de la membrana del espermatozoide varía durante éste tránsito: la cantidad de colesterol disminuye y aumenta la concentración de desmosterol y sulfato de colesterol, así como la composición de fosfolípidos y ácidos grasos (Álvarez, 2003).

El metabolismo de los espermatozoides también se ve modificado durante su trayecto por el epidídimo. Cambia su actividad glicolítica y sus niveles de AMPc al activarse una adenilato-ciclasa y disminuir la actividad de una fosfodiesterasa de AMPc (Hoskins y Vijayaraghavan, 1990).

El espermatozoide adquiere la capacidad de mover el flagelo durante este trayecto, sin embargo el movimiento empieza después de la eyaculación. Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la adquisición de la movilidad no se conocen bien, sin embargo se han reportado ciertos reguladores o mediadores de la activación del axonema; glicoproteínas epididimarias y albumina, AMPc, cambios en la composición fosfolipídica de la membrana (Hoskins y Vijayaraghavan, 1990).

La maduración de los espermatozoides ocurre principalmente en la cabeza y en el cuerpo del epidídimo para finalmente ser almacenados en la cola del mismo y a través de movimientos peristálticos y del plasma seminal pasan por la uretra; para ser liberados al tracto genital femenino durante la eyaculación y a través de movimientos peristálticos y arrastre del plasma seminal pasan por el tracto y el pene para ser liberados al exterior por la eyaculación (De Jonge y Barratt, 2006).

1.2.2. MADURACIÓN EN EL TRACTO GENITAL FEMENINO

Los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos son depositados en la vagina y de ahí son transportados a través del cérvix hasta un pequeño orificio en el oviducto (trompas de Falopio), es decir, hasta la unión útero-tubal mediante la movilidad activada así como por las contracciones musculares de la vagina, cérvix y útero. La unión útero-tubal funge como una barrera para los espermatozoides, ya que sólo logran pasar aquellos que presentan una movilidad activada. De los miles de espermatozoide depositados, sólo unos cuantos pasan esta barrera. El oviducto consta de dos regiones: el istmo y el ámpula. Cuando el espermatozoide activado logra pasar al oviducto, se encuentra primero con el istmo, el cual se conoce como el reservorio del oviducto, se encuentra primero con el istmo, ya que los espermatozoides se fijan fuertemente al epitelio oviductual, quedando atrapados y formando un reservorio. Es en este sitio donde los espermatozoides se almacenan y poco a poco se hipereactivan y capacitan asincrónicamente. Aquí se pierden los factores descapacitantes, con lo que disminuye la afinidad de los espermatozoides por el epitelio, permitiéndoles liberarse y migrar hacia la región del ámpula en donde se llevará a cabo el encuentro con un ovocito. Para este momento el espermatozoide debe ser capaz de reconocer la capa extracelular del ovocito, la ZP y unirse a ella (Eisenbach y Giojalas, 2006; Suarez y Pacey, 2006).

La capacitación y la hiperactivación permiten al espermatozoide unirse a la zona pelúcida del ovocito, específicamente a la glicoproteína ZP3, que además induce la RA, proceso que permite al espermatozoide penetrar las capas externas del ovocito y fusionarse con él (Darszon *et al.*, 2006; Suarez y Pacey, 2006; Turner, 2006). Estos tres procesos son esenciales para que el espermatozoide fecunde al ovocito y están mediados por los mecanismos de transporte de calcio.

1.2.2.1.- CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

La capacitación operacionalmente se define cómo la adquisición de la capacidad para fecundar al óvulo. La capacitación es un proceso lento, de unas 3-6 horas en el espermatozoide humano y es dependiente de Ca^{2+} . Consiste en una serie de modificaciones tanto bioquímicas como biofísicas en el espermatozoide que se dan a lo largo del tracto genital femenino (TGF), y particularmente en el istmo del TGF, necesarios para que ocurra la RA (Darszon *et al.*, 2006; Suarez y Pacey, 2006; Turner, 2006).

Las vías de señalización solo se han definido parcialmente. Este proceso incluye una reorganización de la membrana plasmática, fosforilación de proteínas por tirosin-cinasas, así como un incremento del pH_i y de la $[Ca^{2+}]_i$. Todos estos cambios preparan al espermatozoide para que pueda responder a la ZP y a la cobertura extracelular del ovocito y se desencadene la RA (Baldi *et al.*, 2000; Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006).

Durante la capacitación las proteínas y los lípidos de la membrana sufren cambios dramáticos y se reorganizan (Harrison y Gadella 2005). El contenido rico en albúmina y lipoproteínas de alta densidad (HDL) del fluido del oviducto promueve la remoción de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide (Figura 2). Se ha propuesto que la membrana plasmática del espermatozoide se hace más fluida y permeable, alterándose el transporte iónico e incrementándose la concentración de Ca^{2+} y de HCO_3^- en el citosol (Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006; Gadella *et al.*, 2008). Sin embargo, cómo se regula la liberación de colesterol del espermatozoide es aún poco claro.

Se cree que la entrada de HCO_3^- puede estar mediada por un cotransportador Na^+/HCO_3^- o por difusión como dióxido de carbono (Krapf *et al.*, 2010). Dos tipos de adenilato ciclasa (AC) se han descrito: 1) la adenilato ciclasa soluble (AC_S), dependiente de HCO_3^- y Ca^{2+} (Litvin *et al.*, 2003) y 2) la AC transmembranal (AC_{tm} , con nueve isoformas AC_{tm} 1-9) que se activan principalmente por receptores acoplados a proteínas G_{sa} , y se regulan de manera diferente por la $[Ca^{2+}]_i$, PKA y PKC (Luria *et al.*, 2002). La AC_S es esencial para la regulación de la movilidad y la fertilidad del espermatozoide (Hess *et al.*, 2005). Se pensaba que la AC_S sólo podía funcionar en las células germinales masculinas, pero también está presente en las células somáticas en distintos sitios (Zippin *et al.*, 2004). Por ejemplo, en las células de las vías respiratorias humanas, la AC_S se localiza en los cilios en donde regula la movilidad (Schmid *et al.*, 2007).

El ingreso de HCO_3^- y Ca^{2+} activa la ACs. Esta enzima por medio de ATP, produce AMPc, el que a su vez activa a la proteína cinasa A, dependiente de AMPc. Inicialmente se pensó que el AMPc en espermatozoides se producía sólo por ACs y que G_{sa} estaba ausente. Sin embargo, la evidencia sugiere que las AC_{tm} y varias G_{sa} pueden estar presentes en el erizo de mar y en los espermatozoides de mamíferos (Beltran *et al.*, 2007; Baxendale *et al.*, 2003). El AMPc es un segundo mensajero esencial en la fisiología espermática que induce, entre otros procesos, la activación tardía de una tirosina cinasa (PTK) que fosforila proteínas en tirosinas (Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006; Krapf *et al.*, 2010). Durante la

capacitación el pH_i se alcaliniza (de 6.7 a 6.85 en humano: Neri-Vidaurre *et al.*, 2006). La capacitación conduce también a cambios en los patrones de la movilidad (Baldi, *et al.*, 1991; Blackmore, 1993; Mendoza, y Tesarik, 1993; Darszon *et al.*, 2007).

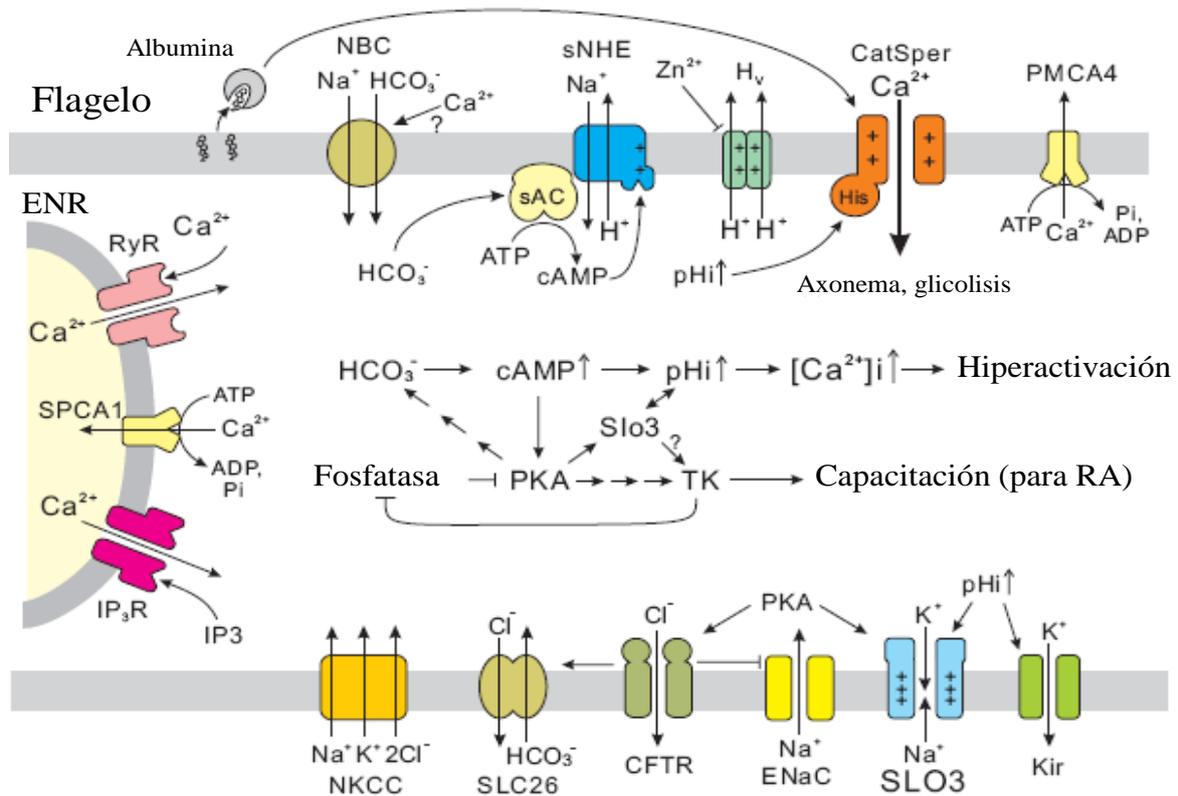


Figura 2. Flujo de iones durante la capacitación y la hiperactivación en espermatozoide de mamíferos. Ambos procesos ocurren en paralelo a lo largo del tracto genital femenino (TGF), pero solo algunas vías de señalización son compartidas. La albumina presente en el TGF remueve al colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide modificando algunas de sus propiedades y también activa directamente a los canales CatSper aumentando la $[Ca^{2+}]_i$. La activación del cotransportador Na^+/HCO_3^- , (posiblemente activado por Ca^{2+} externo, incrementa los niveles de HCO_3^- activando a las ACs y produciendo AMPc. El AMPc activa al intercambiador Na^+/H^+ (sNHE) y junto con la activación del canal protón (H_v) por la remoción de Zn^{2+} , aumenta el pH_i y otros parámetros celulares que activan a los canales CatSper y SLO3. El aumento de Ca^{2+} también influye en la glicolisis y en la actividad del axonema, favoreciendo la hiperactivación de la movilidad. Varias bombas (PMCA4, SPCA1) movilizan Ca^{2+} y canales (receptores al IP₃ (IP₃R) y receptores a rianodina (RyR)) participan durante la señalización de Ca^{2+} . Al incrementarse los niveles de AMPc se activa PKA, después se desconoce cómo se estimulan las vías de la tirosina cinasa para que ocurra la fosforilación asociada a la capacitación. Posibles conexiones en la señalización entre la capacitación y la hiperactivación se indican. En algunas especies la capacitación está acompañada por la hiperpolarización de la membrana, los canales y los transportadores involucrados en éste proceso se señalan (Darszon *et al.*, 2011)

1.2.2.2.- MOVILIDAD ESPERMÁTICA.

La movilidad espermática constituye uno de los parámetros fundamentales para valorar la calidad de una muestra seminal. Los espermatozoides requieren ser móviles progresivos para poder cumplir su principal objetivo, la fecundación. Hay dos tipos de movilidad: La activada y la hiperactivada (Darszon *et al.*, 2006; Suarez, 2008; De Blas *et al.*, 2009).

Activada. Esta movilidad se refiere a una amplitud baja del batido flagelar que presentan los espermatozoides recién eyaculados; la activación les permite llegar al itsmo, donde son capturados.

Hiperactivada. Un espermatozoide hiperactivado se caracteriza por presentar un aumento en la amplitud del batido flagelar, originándose trayectorias con un mayor desplazamiento lateral de la cabeza, lo que lleva al desarrollo de movimientos asimétricos, no progresivos y vigorosos, en medios de cultivo no viscosos, En cambio, en medios viscosos este movimiento es rectilíneo y vigoroso y le confiere al espermatozoide la capacidad de liberarse del epitelio oviductual del itsmo y seguir progresivamente a lo largo de este tejido; mejora las posibilidades del contacto con el ovocito y la penetración del *cumulus oophorus* en la zona penetración (Mortimer, 1997; Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006; Suarez y Pacey, 2006; Suarez, 2008).

La mayoría de los gametos masculinos, incluyendo algunas especies del reino vegetal, usan un flagelo para impulsarse y nadar (ver apartado 1.1). La maquinaria que mueve al flagelo y a los cilios es el axonema (De Jonge y Barratt, 2006; Lindemann *et al.*, 2010).

Se ha reportado que la movilidad espermática de los mamíferos se regula a través de dos rutas de señalización: la de AMPc/PKA y la de Ca^{2+} . El AMPc se incrementa por la activación de la ACs dependiente de HCO_3^- y por la inactivación de la fosfodiesterasa (PDE) (Turner, 2006). El incremento de AMPc activa la PKA con lo que se induce la fosforilación de serinas/treoninas que a la larga, inducirían fosforilación de tirosinas flagelares, probablemente a través de la activación de PTK dando como resultado la hiperactivación del espermatozoide (Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006; Turner, 2006).

1.2.2.2.1. 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: una subjetiva y la otra 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 según la Organización Mundial de la Salud: 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 CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) Estos adquieren imágenes sucesivas que proporcionan la posición puntual de los espermatozoides en distintos tiempos y la unión de estos puntos corresponde a las trayectorias rectilíneas que definen el tipo de desplazamiento espermático (Figura 3). Este tipo de valoración introduce precisión y datos cuantitativos sobre la cinética de los espermatozoides (Hernández-Rueda, 2008).

Los componentes comunes del CASA son: un microscopio, una video cámara, una tarjeta de captura de cuadros de video y una computadora; se usa un software 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 se envía a la cámara y se convierte en una imagen digital. La forma más fácil para que el sistema de imágenes detecte al espermatozoide es usando microscopía de campo oscuro. Con esta la cabeza del espermatozoide se ve blanca sobre el campo oscuro. El brillo de la imagen de la cabeza permanece constante aún cuando ésta rota. La imagen de cada cabeza se digitaliza y se determina el número de píxeles que abarca. Existe un rango en el número de píxeles 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).

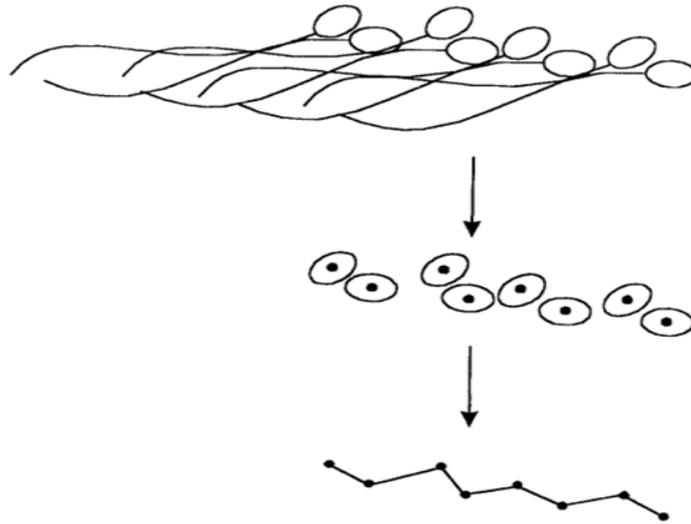


Figura 3. El sistema CASA. Se basa en la captura sucesiva de imágenes de espermatozoides en movimiento mediante la identificación de la cabeza en un campo obscuro proveniente de un microscopio de contraste de fases (Mortimer, 2000).

Existen diversos sistemas de análisis de imagen computarizados 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 cual no se tiene una estandarización de valores normales para todos los CASA.

Entre los diferentes CASA se encuentra el *Hamilton Thorne Motility Analyzer*, el cual se uso para obtener los resultados de movilidad 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 cinemáticos que se evalúan a partir de la trayectoria descrita por los espermatozoides, los cuales son mostrados en la tabla I (ver anexo).

1.3. Ca^{2+} Y CANALES DE Ca^{2+} EN EL ESPERMATOZOIDE

Debido a la participación del calcio en la movilidad espermática, a continuación daré una descripción general de algunos de los canales para este ión y sus características funcionales.

El Ca^{2+} es un regulador fundamental en la fisiología del espermatozoide (Baldi *et al.*, 2000; Carlson *et al.*, 2003). El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede ocurrir por la entrada de Ca^{2+} a la célula a través de la membrana plasmática o mediante su liberación de pozas internas. En espermatozoides de mamíferos se han reportado canales dependientes de voltaje, canales de Ca^{2+} activados por el vaciamiento de pozas internas, bombas de Ca^{2+} , canales de Ca^{2+} activados por nucleótidos cíclicos, canales de Ca^{2+} regulados por ligandos, intercambiadores

de Ca^{2+} y canales catiónicos específicos del espermatozoide (Darszon *et al.*, 2006; Turner, 2006; Lishko y Kirichok, 2010; Ren y Xia 2010). Los CatSper son los que al parecer juegan un papel central en el desarrollo de la hiperactivación. Su falta en ratones “knock out” produce machos estériles con espermatozoides incapaces de hiperactivarse, sin afectar la movilidad activada, capacitación o RA. Estos canales se encuentran en la pieza principal del flagelo. Sin embargo, el papel que tiene en la fisiología del espermatozoide aún no es claro totalmente (Lishko y Kirichok, 2010).

El Ca^{2+} se requiere para la movilidad espermática y proviene de calcio extracelular; el aporte de calcio de almacenes internos es poco claro. Tampoco se tiene completamente claro cómo afecta el incremento de este ion al flagelo. Los efectos que se han reportado tienen relación en el grado de asimetría flagelar característico de una movilidad hiperactivada, el Ca^{2+} actuaría directamente por medio de proteínas fijadoras en el brazo externo de la dineína, lo que induce el movimiento asimétrico; sin embargo, altas concentraciones de este ion inhiben la movilidad flagelar. Este Ca^{2+} puede provenir, además del medio extracelular, de varias fuentes intracelulares como: las reservas intracelulares de Ca^{2+} mediada por los receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), de la mitocondria o de la teca perinuclear (Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006).

1.3.1. CANALES DE CALCIO

Los canales iónicos son proteínas transmembranales formadas por glicoproteínas que contienen poros acuosos que cuando se abren permiten el paso selectivo de iones específicos a través de las membranas celulares. Estos canales actúan como compuertas que se cierran o se abren en función de los estímulos externos. Así, los canales iónicos controlan el paso de iones, y por tanto el gradiente electroquímico, a través de la membrana de toda célula viva. Los canales de calcio en el espermatozoide humano son esenciales para llevar a cabo procesos necesarios como la capacitación, la hiperactivación de la movilidad y la reacción acrosomal para fertilización (Darszon *et al.*, 2006b).

En las células en reposo, la concentración intracelular de Ca^{2+} es 20.000 veces menor que su concentración en el medio extracelular; por otro lado, el interior celular es electronegativo (-50 a -60 mV), es decir, que existe un gradiente electroquímico que favorece la entrada de iones Ca^{2+} en la célula. Sin embargo, en una célula en reposo, la membrana celular es muy poco permeable al Ca^{2+} , por lo que la entrada del mismo a favor de este

gradiente es mínima. Ahora bien, durante la activación celular, la concentración intracelular de Ca^{2+} aumenta como consecuencia de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de la membrana plasmática (Gilbert, 2006).

Existe la idea de que se presentan mecanismos de entrada pasiva de calcio, Por ejemplo, los canales dependientes del voltaje que en el reposo estarían inactivados o desactivados, dependiendo del potencial de membrana en el reposo de la célula, podrían presentar cierta apertura aun en estados predominantemente cerrados, permitiendo una entrada de calcio suficiente para llevar el calcio a sus valores de reposo. Con esta misma idea, los canales de calcio no dependientes de voltaje, como los modulados por nucleótidos cíclicos o los canales operados por pozas internas podrían en condiciones de reposo y con una muy baja probabilidad de apertura contribuir a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Asimismo, cabe la posibilidad de que los sistemas de salida de calcio, como las ATPasas o el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, o de recaptura al almacén interno, disminuyeran su actividad para que los niveles de calcio intracelular en el reposo aumenten (González-Martínez, 2003).

Recientemente se encontró un canal catiónico en espermatozoides de ratón, el CatSper. Los CatSper parecen formar un tetrámero (1-4) que es muy pH_i dependiente y moderadamente voltaje dependiente. En ausencia de calcio externo CatSper funciona como un canal de sodio independiente de voltaje. Se ha propuesto que un aumento en el calcio intraflagelar producido al activarse CatSper 1-4 por un aumento en el pH_i regula la intensidad del movimiento flagelar típico de la hiperactivación (Kirichok *et al.*, 2006).

1.3.1.1. CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v) son una familia de proteínas oligoméricas transmembranales que abren en respuesta a la despolarización permitiendo la entrada de iones Ca^{2+} a la célula (Catterall, 2000; Ertel *et al.*, 2000). Todos los Ca_v están constituidos por una subunidad principal, $\alpha 1$ (formación de poros), con un peso molecular de 190-250 kDa. Esta proteína contiene cuatro dominios homólogos (I-IV). Cada dominio se compone de seis hélices transmembranales (S1-S6). Entre cada segmento S5 y S6 hay una región no-helicoidal (P-“loop”) que forma parte del revestimiento del poro del canal determinando su conductancia y selectividad iónica. (Figura 4) (Catterall *et al.*, 2003). Estudios sugieren que la expresión de la subunidad $\alpha 1$ puede ser capaz de formar un canal funcional por sí misma, pero

usualmente se asocia con la subunidad β y la subunidad auxiliar $\alpha_2\text{-}\delta$. Diez genes α_1 son conocidos, ($\alpha_{1A/B/C/D/E/F/G/H/I/S}$). (Reuter 1967).

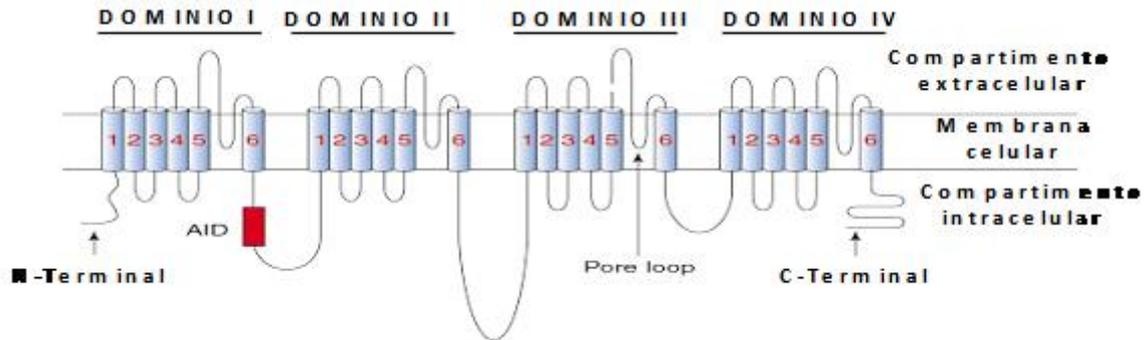


Figura 4. Estructura y características funcionales de los Ca_V . Estructura supuesta de una subunidad de $\text{Ca}_V \alpha_1$. Todo los Ca_V se componen de cuatro dominios (I–IV). Cada dominio se compone de seis hélices transmembranales (S1–S6). Entre cada segmento S5 y S6 hay una región no-helicoidal (P-“loop”) que forma parte del revestimiento del poro del canal determinando su conductancia y selectividad. Entre el dominio I–II (intracelular) se encuentran los sitios con los que la subunidad α_1 interactúa con la subunidad β (el dominio alfa interaccional (AID) mostrado como una caja roja). Los sitios en que los canales activados pueden ser regulados por fosforilación. En los canales activados a bajo voltaje no está presente la subunidad β (Modificado de Jagannathan *et al.*, 2002).

1.3.1.1.1. Clasificación

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se pueden clasificar basándose en sus características biofísicas y su sensibilidad a una serie de fármacos y toxinas en por lo menos seis tipos (T, L, N, P, Q, R) (Birnbaumer *et al.*, 1994).

Los canales activados por alto voltaje (HVA o Ca_V1 y 2) son llamados así debido a que se requieren grandes despolarizaciones para su activación; se abren a un voltaje ≥ 30 mV. Se han descrito cinco tipos funcionales de canales de Ca^{2+} (Randall, 1998), denominados L, N, P, Q y los tipos R. Los canales de tipo L muestran una sensibilidad particular a 1,4-dihidropiridinas (DHPs), mientras que los canales de tipo N son extraordinariamente sensibles al ω -conotoxina GVIA (del caracol de cono *Conus geographus* L). Los canales P, Q y R se pueden separar de acuerdo a su sensibilidad diferencial a ω -conotoxinas y ω -agatoxinas, de la araña embudo *Agelenopsis aptera*.

Los canales activados a voltajes bajos (LVA o Ca_V3) se describieron originalmente en neuronas sensoriales de vertebrados (Carbone y Aswandulla, 1989). Estos canales se han encontrado en una gran variedad de células excitables y no excitables (neuronas, músculo cardíaco, liso y esquelético, fibroblastos, osteoblastos, astrocitos, pituitaria, etc.) y se

encuentran ausentes en células cromafines y en neuronas simpáticas. Su función está relacionada principalmente con la actividad rítmica (marcapasos) y la entrada de Ca^{2+} a potenciales negativos. Estos canales inicialmente se llamaron “de tipo T”, ya que se abren de forma transitoria; se activan a potenciales de -70 mV y alcanzan su corriente máxima alrededor de -20 mV (Bossu *et al.*, 1985; Feduloava *et al.*, 1985; Carbone y Aswandulla, 1989).

Pérez-Reyes y colaboradores (2010) han descrito que los canales T tienen tres mecanismos diferentes referentes a la activación por proteínas G. La inhibición de los canales Cav3.2 ocurre por:: 1) una inhibición directa por subunidades $\text{G}\beta_2\gamma_2$, 2) una vía independiente de $\text{G}\beta_2\gamma_2$, pero con la participación del PLC (fosfolipasa C), DAG (diacilglicerol) y PKC y 3) un mecanismo que involucra a Gas que no activa a ninguna cinasa.

Los canales de tipo T son modulados por anandamida, por ácido araquidónico y grasas poliinsaturadas (rango mM) (Tang *et al.*, 1988), Por ejemplo, lipoaminoácidos como *N*-arachidonoyl glycine (NAGly), una molécula estrechamente relacionada con los endocannabinoides que no activan a los receptores de cannabinoides o a los canales TRPV1, se ha reportado que bloquea a los canales de Cav3.2 (Barbara *et al.*, 2009). La presencia Zn^{2+} , en concentraciones μM en el plasma seminal, inhibe preferentemente a Cav3.2 (IC_{50} 0.8 μM), mientras que Cav3.1 y 3.3 son de 100 a 200 veces menos sensibles en espermatozoides de erizo Darszon *et al.*, 2011). Las corrientes de los canales Cav3 son inhibidas por amilorida, pimozida, mibefradil, kurtoxin y a bajas concentraciones de Ni^{2+} (40 μM), sin afectar las corrientes de alto umbral (Arnoult *et al.*, 1998; Olamendi-Portugal *et al.*, 2002) (Tabla 1). Las drogas que normalmente se consideran como antagonistas de Cav1 y Cav2 como la nifedipina y afines a 1,4-dihidropiridinas (DHP), a menores concentraciones (μM) también pueden bloquear las corrientes en las células de espermatogénesis de tipo T (Cav3) (Arnoult *et al.*, 1998; Santi *et al.*, 1996). El perfil farmacológico de las corrientes en las células espermatogénicas (Darszon *et al.*, 2006b), así como los registros en células espermatogénicas de ratones nulos de Cav3.1 y 3.2 (Escoffier *et al.*, 2007) son consistentes con la propuesta de que Cav3.2 es la principal isoforma funcional en estas células. Además, los canales Cav3 parecen regularse en estas células por proteín-cinasas (Arnoult *et al.*, 1998), albúmina (Espinosa *et al.*, 2000) y CAM (Lopez-Gonzalez *et al.*, 2001). La familia de los Cav3.1 y 2 se ha inmunolocalizado en el espermatozoide de los mamíferos, en la región acrosómica. Sin embargo, los ratones knock-out para estos dos isoformas de Caves son fértiles (Chen *et al.*, 2003;

Stambouljian *et al.*, 2004). La participación de Cav3 en la RA en espermatozoides de humano es todavía menos clara.

Tabla 1. Clasificación de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje

Tipo de canal de Ca ²⁺	Nombre del canal	Tipo de corriente	Nombre de la subunidad $\alpha 1$	Bloqueador principal
HVA	Ca _v 1.1	L	$\alpha 1S$	DHPs
	Ca _v 1.2		$\alpha 1C$	DHPs
	Ca _v 1.3		$\alpha 1D$	DHPs
	Ca _v 1.4		$\alpha 1F$	DHPs
	Ca _v 2.1	P/Q	$\alpha 1A$	ω -AgaTx-IVA (P) ω -CTx-MVIIC (Q)
	Ca _v 2.2	N	$\alpha 1B$	ω -CTx-GVIA
	Ca _v 2.3	R	$\alpha 1E$	SNX-482
LVA	Ca _v 3.1	T	$\alpha 1G$	Ni ²⁺ , Mibefradil
	Ca _v 3.2		$\alpha 1H$	Ni ²⁺ , Mibefradil
	Ca _v 3.3		$\alpha 1I$	Ni ²⁺ , Mibefradil

(Adaptado de Catterall, 2003)

1.3.1.1.2. Localización

El estudio de la expresión de los Ca_v en espermatozoides humanos es limitado. Un grupo de investigadores (Hagiwara y Kawa, 1984; Arnoult *et al.*, 1996; Lievano *et al.*, 1996; Jagannathan *et al.*, 2002b) mostraron que en espermatozoides de mamífero se activan canales de calcio dependientes de voltaje de bajo umbral. En el espermatozoide de humano, usando northern blot se detectó la subunidad Ca_v3.1 en testículos y por RT-PCR en eyaculados espermáticos (Publicover y Barratt, 1999; Jagannathan *et al.*, 2002b). Experimentos de inmunolocalización detectaron a estos canales en la cabeza y en el flagelo (Jagannathan *et al.*, 2002b; Treviño *et al.*, 2004). Los Ca_v3.2 se localizan en la pieza principal del flagelo y en la cabeza, en cambio Ca_v3.3 está restringido en la pieza intermedia. Se detectaron los RNAm de la mayoría de los canales Ca_v: Ca_v1.2, Ca_v2.2, Ca_v2.3, Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3 excepto Ca_v1.3 y Ca_v2.1 (Jagannathan *et al.*, 2002b).

Para demostrar que los Ca_v se expresan en la cola de los espermatozoides y pueden participar en la regulación flagelar Treviño *et al.*, (2004) realizaron estudios de inmunolocalización mostrando que al menos dos canales (Ca_v 3.2 y Ca_v 3.3) se presentan en espermatozoides humanos.

1.3.1.2. Canales catiónicos del espermatozoide

Los CatSper, son canales catiónicos de la membrana plasmática específicos de los espermatozoides de mamíferos y algunas otras especies como el erizo de mar (Navarro *et al.*, 2008). Si se elimina cualquiera de las subunidades CatSper1, CatSper2, CatSper3 o de CatSper4, los ratones machos son infértiles. El CatSper están localizados en la pieza principal del flagelo y es un canal permeables a Ca^{2+} débilmente sensibles al voltaje, activado por pH_i elevado y fundamentalmente para la hiperactivación (Navarro *et al.*, 2008). El primer miembro de la familia, de CatSper, CatSper1, se detectó durante la búsqueda de la homología de la secuencia selectiva de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_{v1-3}) (Ren *et al.*, 2001). El gen CatSper1 del ratón se encuentra en el cromosoma 19 y consta de 12 exones, con una estructura de lectura abierta (ORF) que codifica una proteína de 686 aminoácidos. CatSper2 fue descubierto como una transcripción específica del espermatozoide utilizando una señal de captura de péptidos. El cromosoma dos de ratón contiene el gen CatSper2, que codifica una proteína de 588 aminoácidos de longitud (Quill *et al.*, 2001). CatSper2 tiene al menos 3 variantes de empalme, los dos últimos miembros de la familia. CatSper3, se encuentra en el cromosomas 13 del ratón, y codifica a 395 aminoácidos, mientras que CatSper4, se encuentra en el cromosoma 4 del ratón y codifica una proteína de 442 aminoácidos. CatSper3 y CatSper4 tienen varias variantes del potencial de empalme. Se han encontrado ortólogos de CatSper en todos los mamíferos examinados, en ascidia (*Ciona intestinalis*), erizos de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*). CatSpers no se ha identificado en el pescado (*Fugu rubripes* y *Danio rerio*), moscas (*Drosophila melanogaster*), gusanos (*Caenorhaditis elegans*), o plantas (*Arabidopsis thaliana*), (Navarro *et al.*, 2008).

Los polipéptidos funcionales del canal con la mayor similitud de CatSpers son canales de sodio dependientes del voltaje (Na_vBP) en bacterias y la familia Ca_v de los mamíferos. La topología prevista de los 4 miembros de la familia CatSper consta de un amino citoplasmático y un carboxilo-terminal acompañado de 6 segmentos transmembranales (S1-S6). Al igual que otros canales dependientes del voltaje, estos segmentos están organizados en 2 módulos funcionalmente distintos: el sensor de voltaje (S1-S4) y el dominio que forma el poro que es

S5-S6 (P-“loop”). Todos los Ca_v s conocido con 4 repeticiones de los dominios 6 segmentos transmembranales (derivados de la duplicación de genes de un solo gen). La selectividad a Ca^{2+} está probablemente definida por los aminoácidos cargados negativamente en la secuencia de consenso de los poros (figura 5) (Navarro *et al.*, 2008).

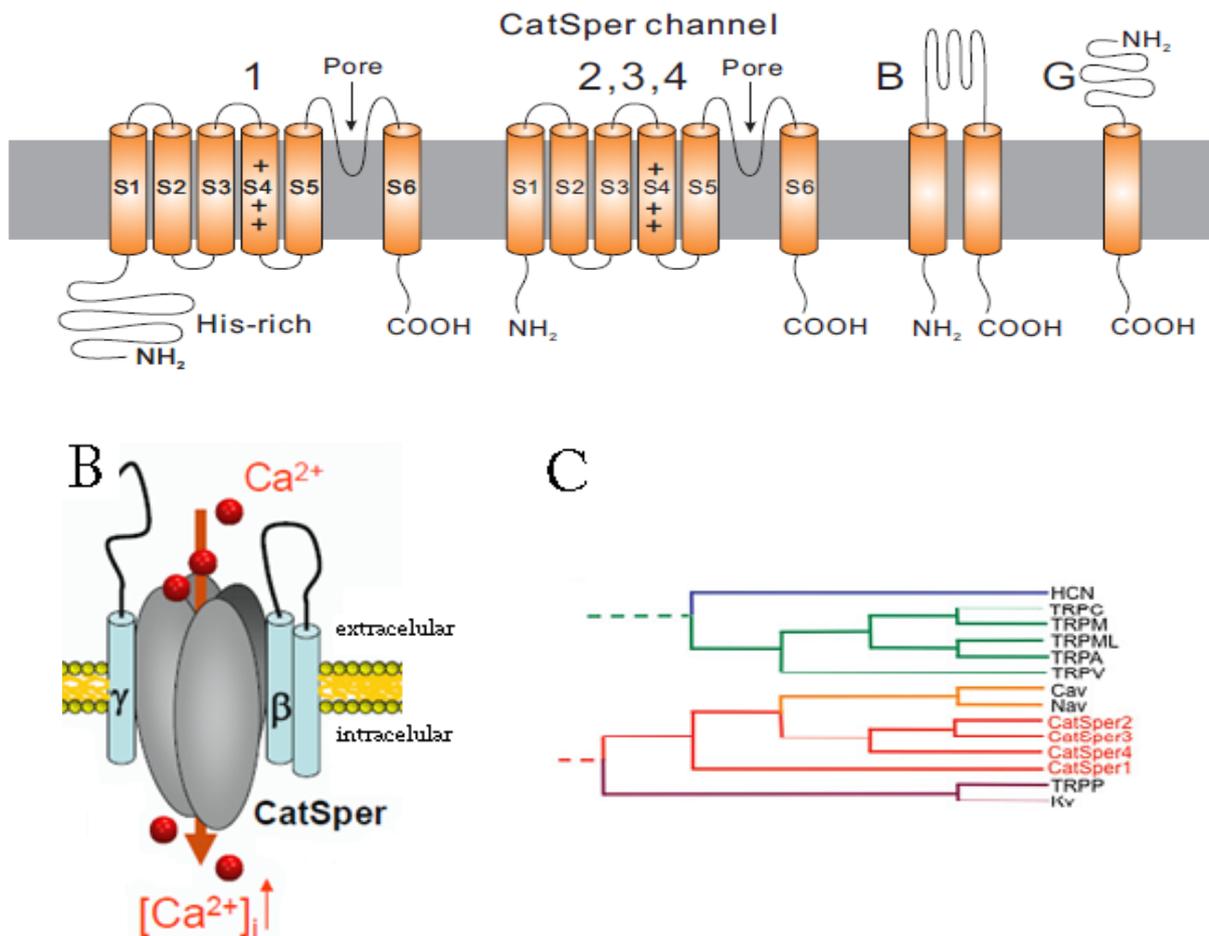


Figura 5. Predicción topológica secundaria de CatSper1-4 Humanos. CatSper1-4 tiene 6TM con un sensor de voltaje (S1-S4) y un poro (S5-S6) de dominio. B) sensor de voltaje. C) Árbol filogenético, anclado a NaChBac. (Tomado de Navarro *et al.*, 2008; Darszon *et al.*, 2011).

La posibilidad de hacer “whole cell patch-clamp” en espermatozoides, que da acceso a la totalidad de las corrientes del espermatozoide a través de la gota citoplasmática, permitió finalmente la caracterización de la corriente de CatSper ($I_{CatSper}$). La $I_{CatSper}$ es una corriente rectificante débil, sensible al pH, selectiva a Ca^{2+} y específicamente localizada en la pieza principal del espermatozoide (Kirichok, *et al.*, 2006).

La $I_{CatSper}$ es débilmente dependiente de voltaje. Las curvas de g-V de CatSper se desplazan significativamente hacia potenciales hiperpolarizados por pH_i alcalino, consistente con el

aumento de la corriente de CatSper después de condiciones capacitantes que alcalinizan en el medio intracelular (pH 6.8; rango de 7-8) (Kirichok *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2007). La I_{CatSper} de espermatozoides silvestres se elimina en aquellos ratones nulos para CatSper1-4 (Kirichok *et al.*, 2006; Jin, *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2007). En cambio en la corriente de CatSper no se altera en ratones nulos para el intercambiador Na^+/H^+ cuando se controla el pH_i (Qi *et al.*, 2007).

1.3.1.2.1. Relación CatSper- Movilidad

La movilidad hiperactivada es esencial para la penetración a través de la zona pelúcida del ovocito, que requiere la elevación de Ca^{2+} en el flagelo del espermatozoide (Lindemann y Goltz, 1988). Curiosamente, espermatozoides mutantes para CatSper muestran una disminución gradual de la movilidad (Jin *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2007) y más bajos niveles de ATP en comparación con espermatozoides silvestres (Xia *et al.*, 2007), lo que sugiere que el influjo de Ca^{2+} a través de los canales de CatSper puede regular otras vías de señalización, tales como glicolisis dependiente de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa-S (GAPDS).

La I_{CatSper} es responsable del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la capacitación que permite la movilidad hiperactivada. Los ratones nulos para CatSper1-4 son estériles y no desarrollan la movilidad hiperactivada. El influjo de Ca^{2+} a través de los canales CatSper incrementa el batido flagelar.

1.3.2. ESPERMATOZOIDEOS INCUBADOS EN MEDIO SIN Ca^{2+}

El Ca^{2+} es un importante mensajero intracelular comúnmente 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, en el que el Ca^{2+} participa en la regulación de sus funciones más importantes como la movilidad, la capacitación, la RA y la fecundación.

El espermatozoide de ratón, en medio libre de Ca^{2+} , tiene una sustancial permeabilidad a Na^+ y su potencial de membrana es dependiente de la $[\text{Na}^+]_e$ y no del K^+ extracelular como sucede en medio con Ca^{2+} . La re-adición de Ca^{2+} induce una hiperpolarización transitoria dependiente de la ATPasa Na^+/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 nuestro laboratorio muestran el efecto del EGTA (ácido etilén glicol tetraacético), un agente quelante de Ca^{2+} , sobre el potencial de membrana y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, medidos simultáneamente en el espermatozoide humano. La adición de EGTA en medio con Ca^{2+} causa una disminución en

la $[Ca^{2+}]_i$, 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 ~ -50 mV a ~ 0 mV. Al restaurar el Ca^{2+} se produce un rápido incremento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$ que después decrece a valores basales. Simultáneamente, se produce una hiperpolarización de ~ -70 mV. Así, en experimentos donde se incrementó la $[Ca^{2+}]_i$ con progesterona y después se remueve el Ca^{2+} con EGTA, se observa una despolarización sostenida causada por la disminución sostenida en la $[Ca^{2+}]_i$, la cual es reversible al restaurar el Ca^{2+} . Esto indica que la disminución en la $[Ca^{2+}]_i$, 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 la remoción de Ca^{2+} de sitios de unión externos (González-Martínez, 2003).

Además del Ca^{2+} , existen otros iones como el Na^+ , K^+ , Cl^- , juegan un papel importante en la fisiología del espermatozoide. 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 funciones.

Por ejemplo las células utilizan el gradiente de sodio, generado por la actividad de la bomba ATPasa Na^+/K^+ , para transportar otros iones y moléculas. En las células excitables, el potencial de acción se dispara por una corriente de Na^+ activada por el voltaje. El influjo de Na^+ a través de canales para este catión, dependientes de voltaje (Na_v) produce despolarización durante la fase inicial del potencial de acción de células excitables. El gradiente de Na^+ 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 Na^+ (Catterall *et al.*, 2003).

Registros de canales de Na^+ reportan que un canal de Na^+ sensible a amilorida está involucrado y 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^+ (ENaCs) que se encuentran presentes en el espermatozoide (Hernández-González, *et al.*, 2007).

Se ha investigado el papel funcional de los 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 fue que la veratridina induce un incremento en la

movilidad progresiva que no fue acompañado por cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. Se ha sugerido que la movilidad espermática de alguna manera depende de Na^+ (Pinto *et al.*, 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 *et al.*, 2007). También se ha postulado que el intercambiador Na^+/H^+ interviene en la regulación del pH_i en el espermatozoide de mamífero (Ren y Xia, 2010).

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. (Sánchez *et al.*, 2006).

II. JUSTIFICACIÓN

En cualquier célula la regulación del calcio intracelular es fundamental en la viabilidad celular y consecuentemente en el mantenimiento de sus funciones. A este respecto cabe resaltar que durante la capacitación se presenta un aumento en los niveles de calcio intracelular en el reposo, que sería relevante para la capacitación. Por estos motivos consideramos que es importante el estudio de los canal de Ca^{2+} que podrían estar participando en la regulación de los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Con base en lo anterior se propuso 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+} sobre la movilidad en los espermatozoides humanos. Estos experimentos contribuyen a entender mejor la regulación fisiológica de la movilidad espermática.

III. HIPÓTESIS

El CatSper participa en la regulación del $[Ca^{2+}]_i$. En medio con cero calcio, CatSper permite la entrada de sodio que produce una despolarización y un aumento significativo en la $[Na^+]_i$. Los niveles altos de sodio estimulan la actividad de la ATPase Na^+/K^+ , y como consecuencia disminuiría la movilidad espermática, por una disminución en el contenido de ATP. En cambio, cuando el calcio se restaura, el canal se bloquea y el potencial de membrana llega a potenciales por debajo del reposo, debido a la operación electrogénica de la bomba Na^+/K^+ .

Farmacológicamente el mibefradil bloquea CatSper, tanto en ausencia como en presencia de calcio externo.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del aumento de sodio intracelular inducido por la eliminación de calcio sobre la movilidad del espermatozoide humano. Adicionalmente, explorar si el CatSper participa en este fenómeno y en la regulación del $[Ca^{2+}]_i$.

Objetivos específicos.

- Determinar la entrada de calcio en bajo calcio externo
- Caracterizar los cambios de sodio intracelular inducidos por la remoción de calcio extracelular.
- Determinar la participación de los Ca_v en la entrada de Ca^{2+}
- Evaluar el efecto de mibefradil sobre el potencial de membrana y la entrada de Ca^{2+}
- Determinar el efecto del pH_i sobre la concentración de sodio y el potencial de membrana
- Cuantificar el efecto de la disminución de Ca^{2+} extracelular sobre la movilidad espermática
- Cuantificar el efecto de la disminución de Ca^{2+} extracelular sobre la movilidad espermática y los mecanismos de transporte iónico simultáneamente.
- Cuantificar el contenido de AMPc y ATP

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES Y MEDIOS

El yoduro de diisopropiltiodiocarbocianina (diSC_3 (5)), fura 2-AM, SBFI-AM y BCECF se obtuvieron de Molecular Probes. Los otros reactivos se obtuvieron de Sigma o Merck. El amortiguador con Hepes para espermatozoides humanos (H-HSM) se preparó con la siguiente composición (en mM): NaCl, 117.5; KCl, 8.6; CaCl_2 , 2.5; NaH_2PO_4 , 0.3; MgCl_2 , 0.49; Piruvato de sodio, 0.3; lactato de sodio, 19; glucosa, 2; HEPES-N bis, 25; pH 7.6 (Suárez, *et al.*, 1986). En algunos experimentos el NaCl, 117.5 mM se sustituyó por cloruro de colina 117.5 mM (bajo en sodio, Na-HHSM); este medio todavía contenía ~ 32 mM de Na^+ . Para los estudios de movilidad, los espermatozoides se suspendieron en HHSM complementado con BSA, 3 mg/ml y bicarbonato sódico 25 mM (capHHSM); este medio también se modificó sustituyendo el NaCl por cloruro de colina (bajo en sodio-capHHSM).

5.2. PURIFICACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS.

El semen humano se obtuvo de un grupo de 12 donantes sanos de entre 20–28 años con tres días de abstinencia sexual. Los donantes participaron en este estudio después de la lectura y firma de una carta de consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los espermatozoides se separaron del plasma seminal por centrifugación en un gradiente discontinuo de percoll isotónico 75/50% (ambos gradientes amortiguados a pH 7.4 con hepes 10 mM y NaCl 150 mM) 20 min a 300 g en tubos cónicos de 15 ml de acuerdo con Linares-Hernández *et al.*, (1988).

5.3. CARGA CON FURA-2, AM PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO

Los espermatozoides purificados ($0.6\text{--}1.5 \times 10^8$ células) se cargaron con 2 μM del derivado acetoximetil éster de Fura-2, (Fura-2 AM) por 40 minutos a 37 °C. Este derivado es permeable a las células y en este tiempo de incubación se incorpora al citoplasma, ahí las esterasas separan al acetoximetilo, haciendo al colorante sensible al calcio. Una vez pasado el tiempo, se lavaron las células por centrifugación 5 min a 300 g con 5 ml de medio H-HSM. Los espermatozoides se subdividieron e incubaron en 5 ml de medio H-HSM a 37°C por 10 min para la medición de calcio intracelular y el potencial de membrana.

5.4. MEDICIONES SIMULTÁNEAS DE LA $[Ca^{2+}]_i$ Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA.

La $[Ca^{2+}]_i$ y el potencial de membrana se midieron simultáneamente con los colorantes fluorescentes Fura-2, AM y diSC₃ (5), respectivamente, utilizando un fluorómetro PTI (Tecnología de Fotón Internacional). Los espermatozoides cargados con Fura-2, (1×10^7 espermatozoides) se centrifugaron a $300 \times g$ por 3 min. La pastilla (100 μ l) se añadió inmediatamente a la celda que contenía 2.5 ml de H-HSM (u otro) + 0.5 μ M de diSC₃ (5), previamente calentada a 37 °C y bajo agitación magnética constante. El fluorómetro tiene dos fotomultiplicadores colocados a 90° con respecto a la fuente de la lámpara de Xenón (Figura 6). Un fotomultiplicador detecta la señal de Fura-2, con un filtro de 488 nm (Andover), excitando a 340/380 con el monocromador de excitación del sistema PTI. El otro fotomultiplicador detecta la fluorescencia del diSC₃ (5) a 670 nm, excitado a 600 nm con una lámpara de helio colocada adelante de la fuente de xenón. Tanto las longitudes de onda de excitación como emisión para diSC₃ (5) se lograron con filtros ópticos de interferencia (Andover). Los datos se adquirieron y digitalizaron a 0.83 Hz con la interfase PTI.

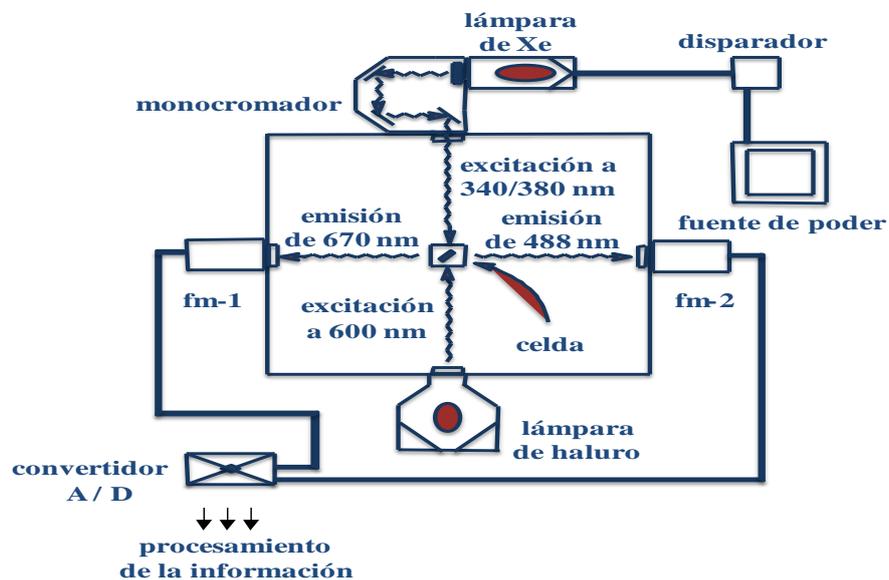


Figura 6. Representación esquemática del sistema óptico para las mediciones simultáneas de calcio intracelular y potencial de membrana. Se ilustra la posición del monocromador con respecto a la celda y a la fuente de xenón. La lámpara adicional se encuentra en la ventana de excitación del monocromador y en ángulo recto a los filtros de emisión. El sistema de agitación se adaptó en la parte inferior de la celda, la cual cuenta con un termoequilizador incluido en el equipo (Espectrofluórometro PTI).

5.4.1. CALIBRACIÓN DE LA $[Ca^{2+}]_i$.

Los registros de Ca^{2+} se calibraron con la ecuación descrita por Grynkiewicz y colaboradores, (1985) (Figura 7):

$$[Ca^{2+}]_i = \beta Kd [(r-r_{min})/(r_{max}-r)]$$

Se utilizó una $Kd = 260$ nM como se describe en (González-Martínez, 2003).

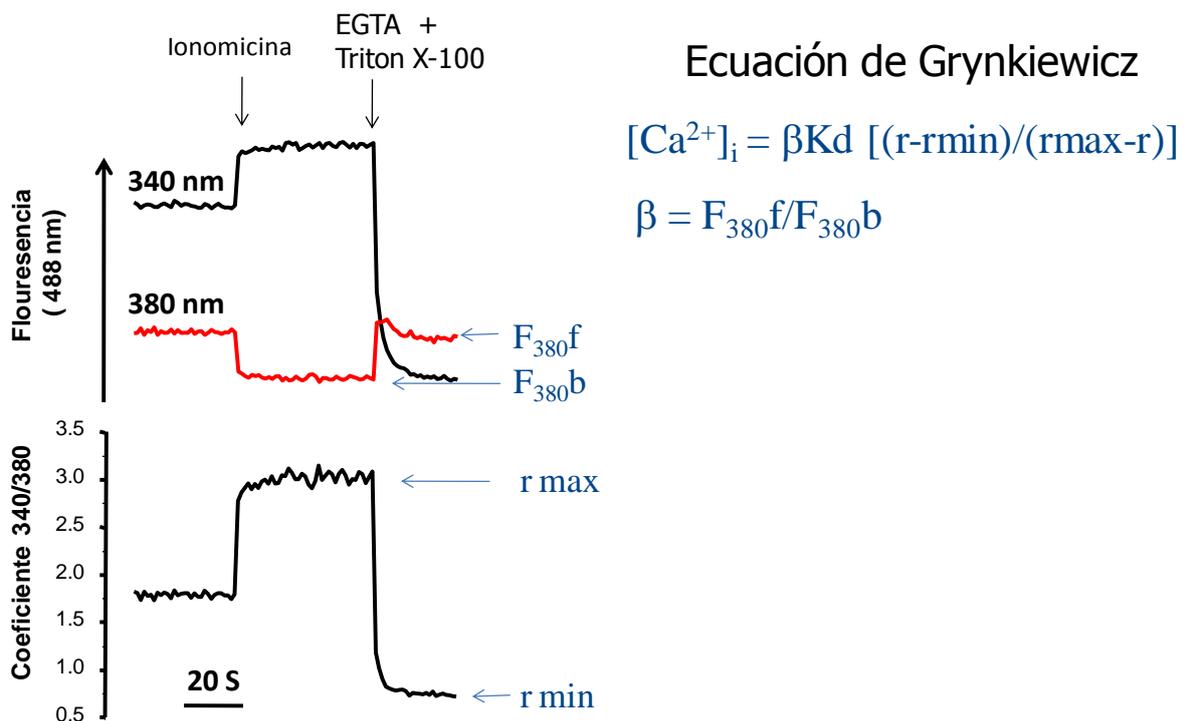


Figura 7. Calibración de la señal de calcio. Después de terminar cada uno de los experimentos se calibró como muestra la figura.

5.4.2. CALIBRACION DEL POTENCIAL DE MEMBRANA.

La fluorescencia se calibró con la suspensión de espermatozoides cargados con Fura-2 como previamente se reportó (Linares-Hernández *et al.*, 1988), con algunas modificaciones. Al final de cada trazo se añadió $1.5 \mu M$ de valinomicina, un ionóforo muy selectivo a potasio (Figura 8), que se agregó para fijar el potencial de membrana al potencial de equilibrio de potasio (E_k), calculado con la ecuación de Nernst ($E_k = -61.54 \text{ mV} \log [K]_{in}/[K]_{ext}$). Teniendo en cuenta que la concentración del potasio intracelular ($[K]_i$) en el espermatozoide humano es de 120 mM (Linares-Hernández *et al.*, 1988). A una temperatura $37^\circ C$, la E_k para las poblaciones de

espermatozoides humanos en H-HSM (K_{ext} 8.6 mM) es de -71 Mv (González-Martínez, 2003). Un minuto después de la valinomicina se despolarizó con adiciones consecutivas de 15, 15, y 30 mM KCl con 30 s entre cada una, a valores de -43 -30 y -15 mV, respectivamente. Esta despolarización simultáneamente aumentó la fluorescencia de diSC₃(5). Hay una relación lineal entre la fracción del cambio de la fluorescencia del diSC₃(5) ($F = (F - F_0) / F_0$, donde F_0 es el valor de la fluorescencia obtenido sobre la adición de valinomicina y F es el valor verdadero de la fluorescencia) y el potencial de membrana (Waggoner, 1979) (0.018- 0.025 de cambio fraccionario de fluorescencia por mV). Tomando los parámetros de la calibración en cuenta, los valores verdaderos de la fluorescencia se transformaron en los valores de potencial de membrana según la Ecuación:

$$V_m = (F - F_0) / m - b / m$$

Donde m y b son los parámetros de la curva lineal de la calibración, es decir la pendiente y el valor del eje Y (el cambio fraccionario de la fluorescencia) en 0 mV, respectivamente. Estos parámetros se obtuvieron de los datos de la calibración utilizando el software Origen versión 6.0. Se hizo una curva de calibración para cada uno de los trazos utilizando los pasos de la calibración descrita arriba; la relación lineal se mantiene hasta $+5$ mV. El potencial mitocondrial no contribuye a la señal del diSC₃(5) en el espermatozoide de humano ya que en la mayoría de las incubaciones con CCCP ($0.4 \mu\text{M}$) y cianuro ($1 \mu\text{M}$) no afectaron la fluorescencia (Guzmán-Grenfell *et al.*, 2000). Lo anterior es consecuente con un papel secundario de este organelo en la movilidad del espermatozoide humano (Makler *et al.*, 1992; Hong *et al.*, 1998). Así, las medidas simultáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y potencial de membrana se realizaron en ausencia de inhibidores mitocondriales o desacopladores.

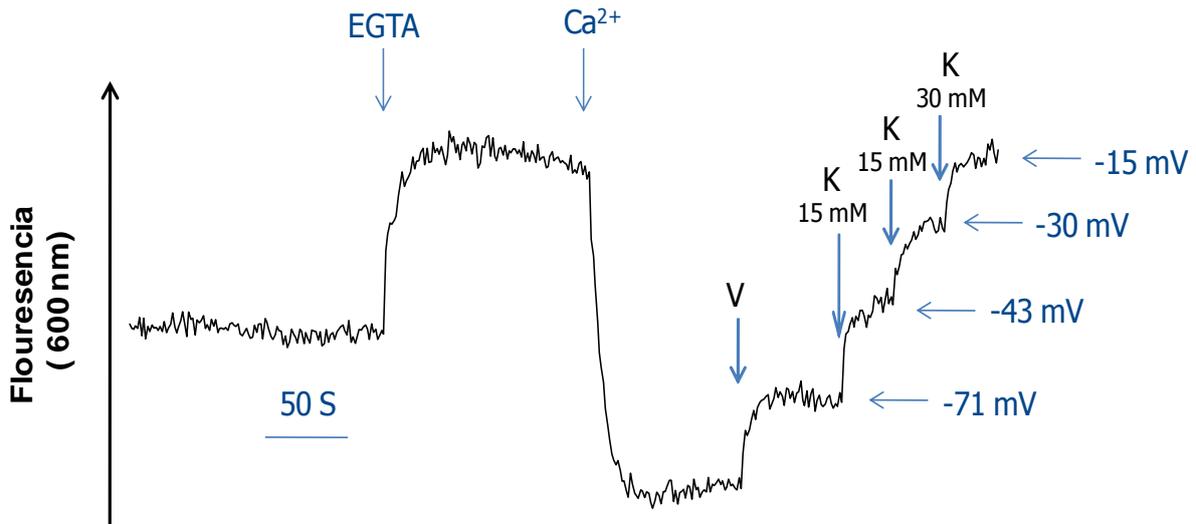


Figura 8. Calibración del potencial de membrana. Al final de cada trazo se añadió 1.5 μM de valinomicina, que se agregó para fijar el potencial de membrana al potencial de equilibrio de potasio (E_k). Teniendo en cuenta que la concentración del potasio intracelular ($[K]_i$) en el espermatozoide humano es de 120 mM a una temperatura 37 °C, la E_k para las poblaciones de espermatozoides humanos en H-HSM (K_{ext} 8.6 mM) es de -71 mV. Un min después de la valinomicina se despolarizó con adiciones consecutivas de 15, 15, y 30 mM KCl con 30 s entre cada una, a valores de -43 -30 y -15 mV, respectivamente.

5.5. CARGADO DEL DETECTOR DE SODIO SBFI-AM.

Los espermatozoides purificados ($0.6\text{--}1.5 \times 10^8$ células) se cargaron con 20 μM del derivado acetoximetil éster de SBFI (SBFI AM) por 90 min a 37 °C en presencia de ácido plurónico (0.06 %) un detergente. El principio de cargado es el mismo que el del Fura 2-AM. La unión al sodio cambia las propiedades espectroscópicas del SBFI de manera que la fluorescencia detectada a 500 nm aumenta cuando se excita a 340 nm y disminuye cuando se excita a 380 nm (Figura 9). La relación de estas fluorescencias se utilizó para la calibración de la señal (Torres-Flores *et al.*, 2008).

5.5.1. CALIBRACIÓN DE LA $[Na^+]_i$.

Los registros de Na^+ se calibraron con la ecuación descrita por Grynkiewicz y colaboradores, (1985):

$$[Na^+]_i = \beta K_d (r - r_{min}) / (r_{max} - r)$$

Se utilizó una $K_d = 9.45 \pm 0.70$ mM como se describe en (Torres-Flores *et al.*, 2008)

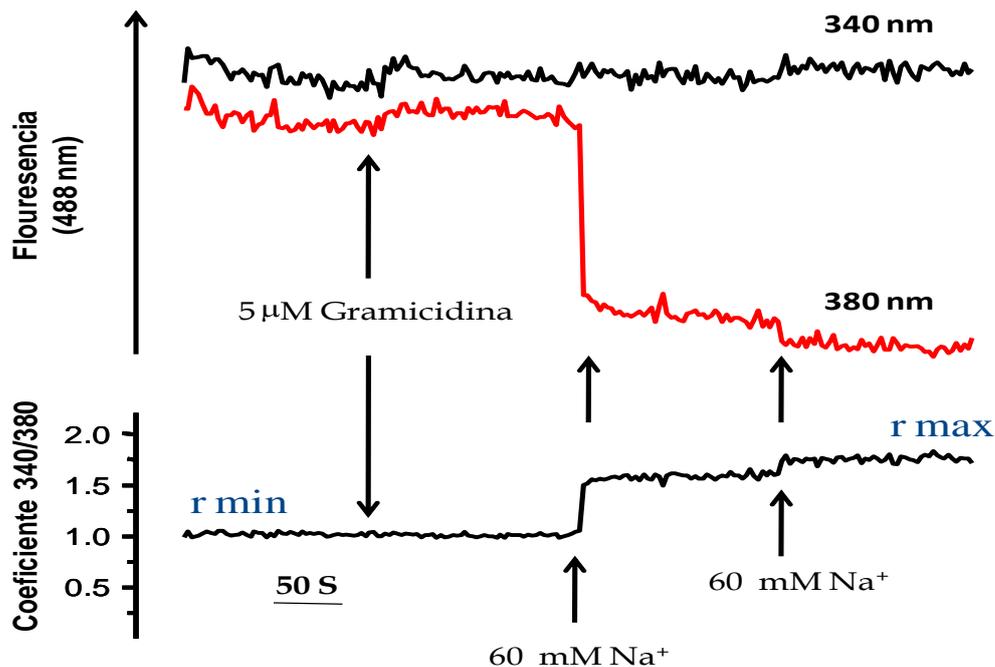


Figura 9. Calibración de la señal de sodio. Después de terminar cada uno de los experimentos se calibra como se indica. Se incuban los espermatozoides en medio sin sodio por 20 min En el registro después de 60 segundo se agrega gramicidina (5 μM) posteriormente a los 120 segundo se agrega NaCl 60 mM y a los 180 segundos 60 mM NaCl, se sustituye los valores en la ecuación de Grynkiewicz, para obtener la $[Na^+]_i$.

5.6. CARGA CON BCECF-AM PARA LA DETERMINACIÓN DE pH_i

Las células se cargaron con la sonda fluorescente BCECF-AM (1 μM por 30 min) tal y como se describe en el procedimiento para la detección de Ca^{2+} . Las células cargadas se centrifugaron y añadieron a la celda de fluorescencia. La fluorescencia se detectó a 550 nm, excitando alternadamente a 500 nm y a 440 nm (longitudes de onda insensibles al pH).

Para calibrar la señal, se permeabilizaron las células con 0.1 % Tritón X-10. Esta permeabilización aumentó el valor de R (fluorescencia a 550 nm y su excitación a 500 nm dividida entre 440 nm: 500/440) a un valor correspondiente al pH del medio HSM-H, esto es pH 7.6 (Figura 10a y 10b).

Posteriormente se acidificó a tres valores diferentes mediante adiciones de HCl (10 μL) al 0.3% (Figuras 10a y 10b) y se compararon los valores de R con los pH medidos con un electrodo normal de pH en cada administración (Figura 10c), consistentemente los valores de R en función del pH muestran una curva sigmoide. Los datos obtenidos se analizaron con el software del PTI para convertir los valores de R a valores de pH_i (Figura 10d).

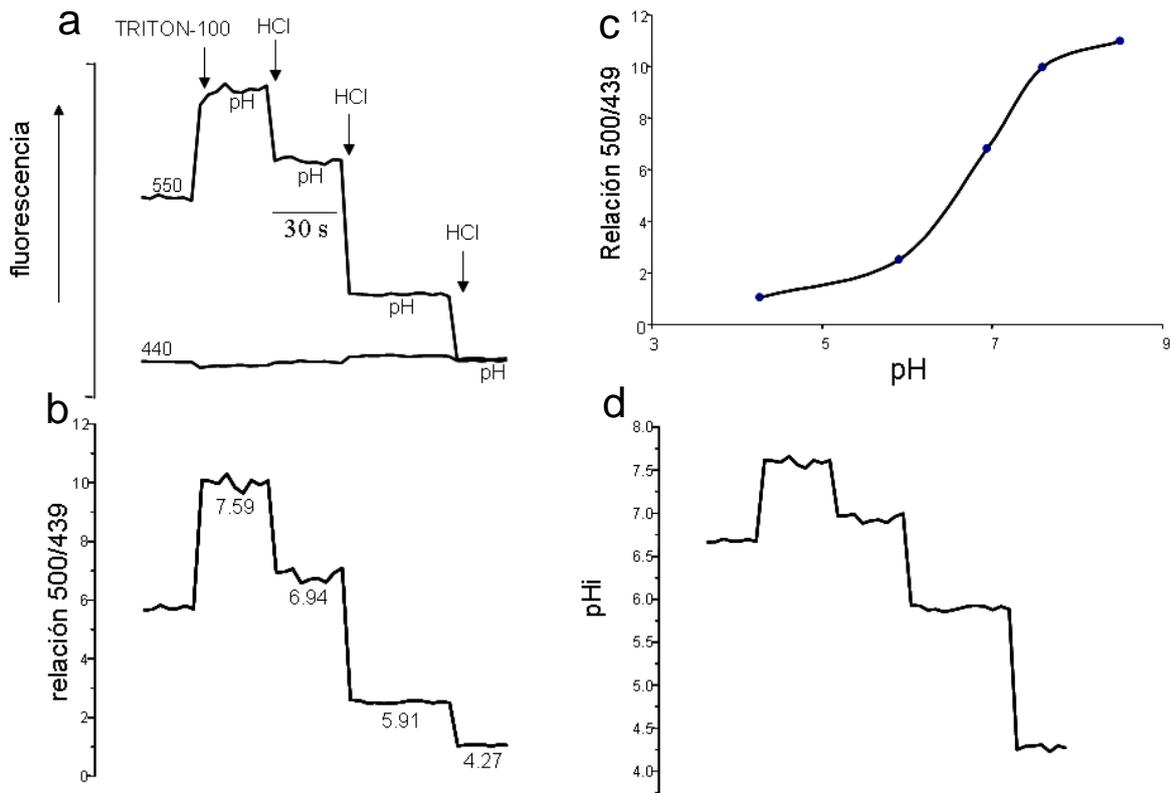


Figura 10. Calibración de la señal de pH_i . **a-b.** Se permeabilizaron las células con 0.1 % Tritón X-10. Esta permeabilización aumentó el valor de R (fluorescencia a 550 nm y su excitación a 500 nm dividida entre 440 nm: 500/440) a un valor correspondiente al pH del medio HSM-H, esto es pH 7.6, posteriormente se acidificó a tres valores diferentes mediante adiciones de HCl (10 μ L) al 0.3%. **c.** Se compararon los valores de R con los pH medidos con un electrodo normal de pH en cada administración, consistentemente los valores de R en función del pH muestran una curva sigmoide. **d.** Los datos obtenidos se analizaron con el software del PTI para convertir los valores de R a valores de pH_i .

5.7. ENSAYOS DE MOVILIDAD.

La movilidad espermática se evaluó en un sistema de análisis automatizado de movilidad espermática (CASA) de la marca Hamilton-Thorn (Figura 11). La movilidad de los espermatozoides se determinó en función del tiempo, después de pasarlos por el gradiente de percoll. Los espermatozoides se resuspendieron en medio capH-HSM (complementado con 25 mM de bicarbonato y 3 mg/ml de BSA) para evitar la adherencia de los espermatozoides a la cámara para el CASA (MicroCell) y preservar su movilidad. Se evaluaron 20 campos que fueron adquiridos a 60 Hz en campo oscuro, capturados con un objetivo 20 X a 37 °C. De cada tratamiento se cuantificaron entre 2000-3000 espermatozoides. En otros casos donde los espermatozoides se cargaron con Fura 2-AM y diSC3 (5) o SBF1-AM se midió la fluorescencia y la movilidad.

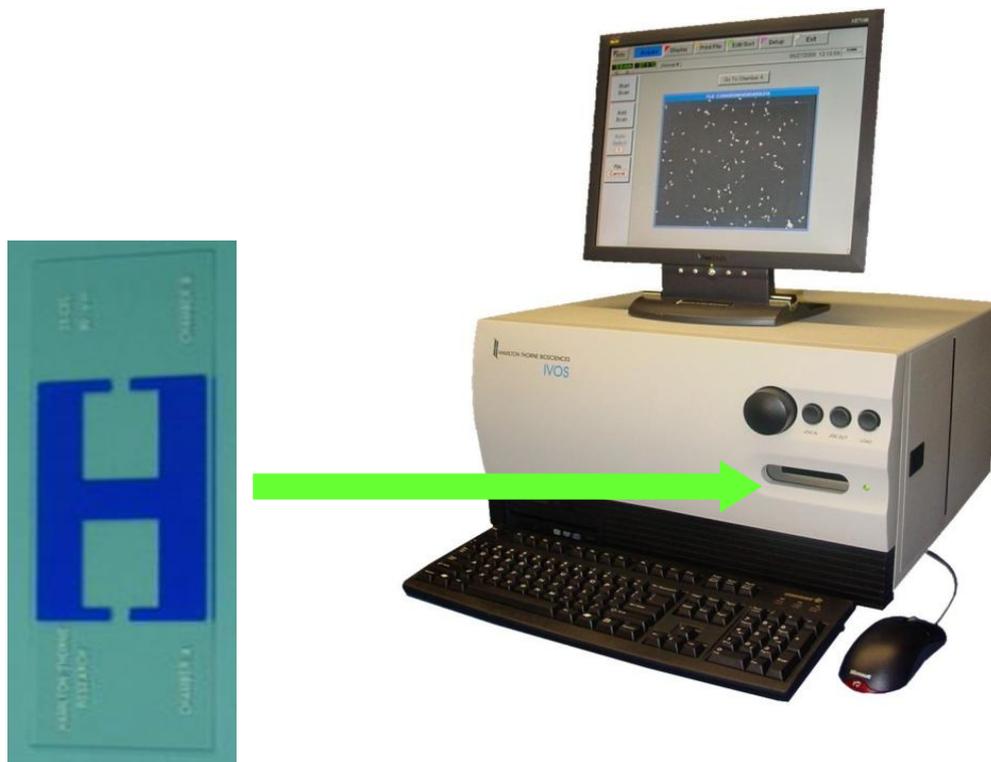


Figura 11. Sistema de análisis automatizado de movilidad espermática (CASA), de la marca Hamilton-Thorn

5.8. CUANTIFICACIÓN DE AMPc

La cuantificación de AMPc se hizo por duplicado. Cada muestra se centrifugó 5 min a 300 g, se retiró el sobrenadante y el botón celular se mezcló con 1 ml de 0.05 M de HCl, después se hirvió 3 min, se enfrió en hielo y se centrifugó nuevamente. Se obtuvo el sobrenadante y la determinación se llevó a cabo, según el protocolo establecido por el Kit de inmunoensayo enzimático competitivo para la detección de AMPc, Zimed Laboratorios Inc. (Torres-Flores *et al.*, 2008b).

5.9. MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE ATP.

El contenido de ATP se midió en los extractos de los espermatozoides después de la reacción luciferina-luciferasa con el kit para la determinación de ATP (Sigma). Los espermatozoides ($\sim 1 \times 10^7$ por ensayo) en las diferentes condiciones experimentales se resuspendieron en 0.25 ml de HCl 0.05 M e hirvieron durante tres min y luego se enfrió en hielo, se centrifugó por 10 min a 300 g y el sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de ATP. Del mismo

modo se trataron los estándares de ATP. Las muestras y los estándares se alcalinizaron a pH 7.8 con la adición apropiada de base de Trizma. Se llevó a cabo la reacción luciferina-luciferasa de acuerdo con el fabricante. La emisión de luz se detectó con un fotomultiplicador (PTI modelo 814).

5.10. ENSAYOS EXPERIMENTALES.

El efecto de eliminar calcio del medio con EGTA, un quelante de calcio, sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y el potencial de membrana en los espermatozoides humanos se investigó. Para realizar esta prueba, se añadió 3.5 mM de EGTA al medio para disminuir el calcio presente de 2.5 mM en el H-HSM a 68 nM. Ya que la remoción de calcio con EGTA libera protones al medio de H-HSM, la solución concentrada de EGTA (500 mM) se prepara en ~2.2 M de NaOH. En esta condición la adición de 3.5 mM EGTA al H-HSM no cambia el pH. La concentración de calcio en mezclas de EGTA- Ca^{2+} en H-HSM y en H-HSM suplementados con magnesio, se calculó con el programa Maxchelator (V.2.1) escrito por Chris Patton de la Estación de Marina de Hopkins (Universidad de Stanford).

5.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos se expresaron como medias \pm error estándar. Los resultados se analizaron con una prueba T de Student de dos colas. Los valores <0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

VI. RESULTADOS

6.1. DETERMINACIÓN CINÉTICA DEL INFLUJO DE CALCIO.

En la figura 12A se muestran las mediciones simultáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ y potencial de membrana. Cuando se disminuyó el calcio externo libre de 2.5 mM a 68 nM con la adición de 3.5 mM de EGTA (ver ensayos experimentales), se observó una disminución en la $[Ca^{2+}]_i$ de ~200 nM a valores por debajo de 80 nM y una despolarización de ~ -45 mV a valores > 0 mV. Una vez que el potencial de membrana alcanzó un valor constante (2 min después de la adición del EGTA), se restituyó el calcio a diferentes concentraciones. El influjo de calcio ocurrió a partir de 1 μ M externo, alcanzando valores de saturación cuando la concentración llegó a 100 μ M. A concentraciones > 1 mM y hasta 10 mM, el pico de calcio presentó un incremento adicional. Se presenta una hiperpolarización después de agregar una concentración de calcio extracelular ≥ 1 μ M. La figura 12B muestra el delta de calcio (calcio al pico menos calcio en el reposo) en función del calcio extracelular agregado.

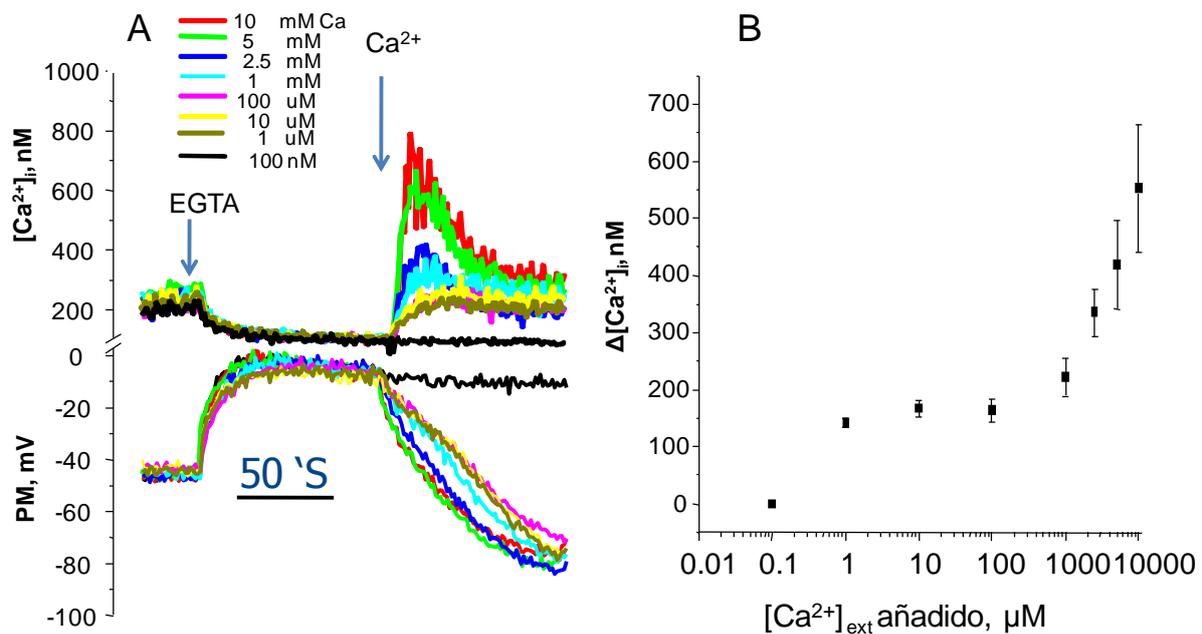


Figura 12. Efecto de la disminución de calcio del medio extracelular y su subsiguiente readición. **A.** Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ (panel de arriba) y PM (panel de abajo) detectados simultáneamente con un fluorómetro PTI. Los espermatozoides cargados con Fura-2 AM (1×10^7 células) se añadieron a la celda que contenía 2.5 ml de H-HSM + 0.5 μ M de diSC₃(5) a 37 °C bajo agitación magnética. Tres min después de depositar los espermatozoides en la celda de fluorescencia se añadió 3.5 mM de EGTA para disminuir el calcio externo de 2.5 mM a 68 nM; dos min más tarde, se añadieron diferentes concentraciones de CaCl₂: 10 mM (trazo rojo), 5 mM (trazo verde), 2.5 mM (trazo azul), 1 mM (trazo verde claro), 100 μ M (trazo amarillo), 10 μ M (trazo rosa), 1 μ M (trazo verde soldado) y 100 nM (trazo negro). **B.** Influxo de calcio en función de la concentración de Ca²⁺ externo ($n = 5$, media \pm error estándar).

Es ensayo siguientes la readición de calcio será de 2.5 mM, misma que restituye su concentración externa.

6.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SODIO EXTERNO.

En trabajos previos en espermatozoide de ratón, en medio libre de Ca^{2+} , se observó una sustancial permeabilidad a Na^+ y que 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 ATPasa Na^+/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).

Posteriormente el Dr. González-Martínez (2003) mostró en espermatozoides humanos que la eliminación de calcio externo con EGTA produce una despolarización sodio dependiente que está acompañada de la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Investigamos si la despolarización sodio dependiente refleja cambios en la $[\text{Na}^+]_i$. La despolarización dependiente de sodio y la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por remoción de calcio extracelular se asoció con el aumento en la concentración de sodio intracelular (Torres-Flores *et al.*, 2008).

La Figura 13 muestra que la despolarización inducida por la remoción de calcio con 3.5 mM de EGTA, resulta en un lento pero constante aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ que depende del contenido de sodio externo. En medio de HHSM (contenido normal de sodio), la $[\text{Na}^+]_i$ aumentó de 2.9 ± 0.3 mM a 28.3 ± 2.3 mM en 3 min (media \pm error estándar, $n = 7$). El aumento de la $[\text{Na}^+]_i$ casi constante alcanzado valores cercanos a 45 mM en 4 min (no se muestra). La restauración de calcio, produce un pico transitorio de calcio y una hiperpolarización dependiente de la ATPasa Na^+/K^+ (González-Martínez, 2003), bloqueando la entrada de sodio y luego produciendo una lenta y pequeña reducción en la $[\text{Na}^+]_i$ (Figura 13A). El efecto del sodio externo en la $[\text{Na}^+]_i$ no alcanzó saturación en el rango de sodio externo estudiado (Figura 13B). Tanto la despolarización dependiente de Na^+ (González-Martínez, 2003) y el aumento de la $[\text{Na}^+]_i$ inducido por la eliminación de calcio dependen de la concentración de sodio externo, lo que indica que ambos fenómenos están relacionados (Figura 13C). Interesantemente, el aumento de sodio fue inhibido en 70 mM de sodio externo (Figura 13A), una concentración que favorece la entrada de sodio, inducido por gramicidina en esta condición (trazo no mostrado).

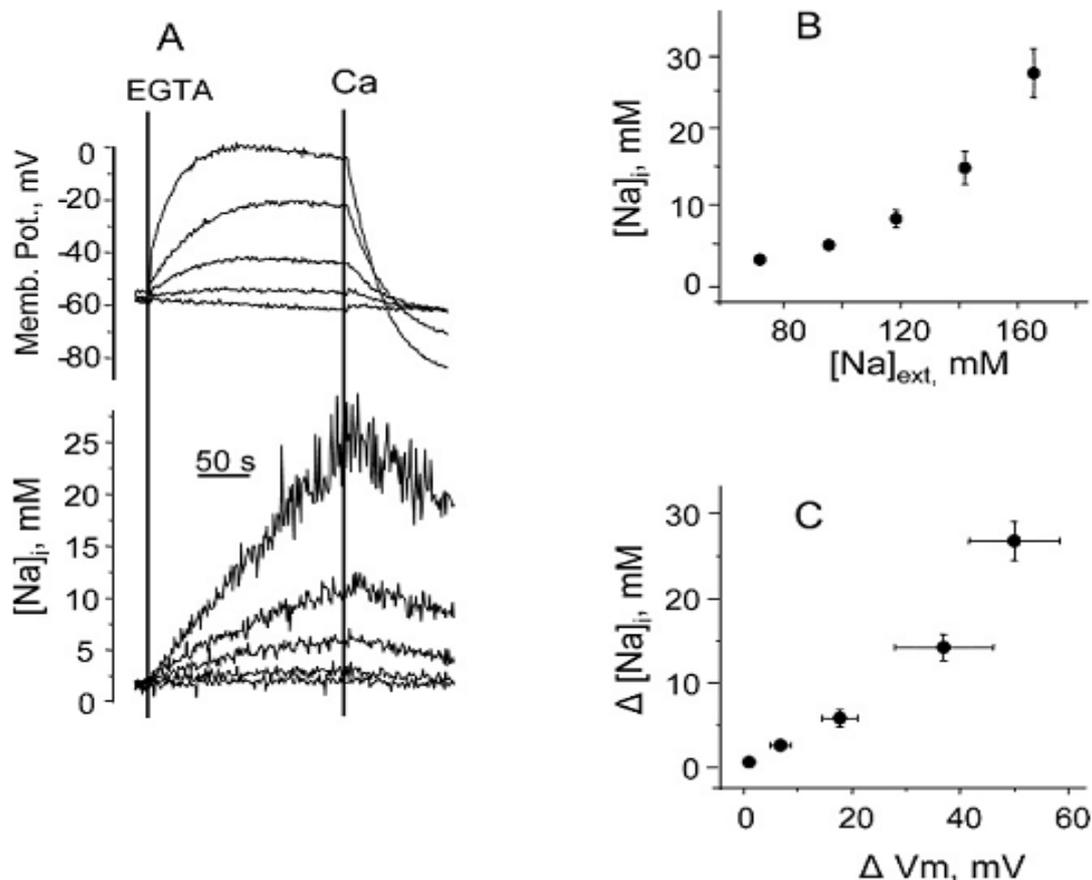


Figura 13. Aumento de sodio intracelular inducido por la eliminación de calcio en función del sodio externo. Los espermatozoides (15×10^6 células) cargados con SBFI se deposita en la celda de fluorescencia que contiene diferentes cantidades de sodio. Los valores totales de sodio externo fueron los siguientes (en mM); 168.5; 145.0; 121.5; 98.0 y 74.5. La concentración final de sodio externo, el cual incluye la cantidad de ácido etilenglicol tetraacetico (EGTA)-NaOH añadido, se indica en el eje de las abscisas de la curva (panel inferior). (A) Los trazos representativos del PM y de la $[Na^+]_i$ los cambios inducidos por 3.5 mM de EGTA y posteriormente la adiciones de 3.5 mM de $CaCl_2$ (Ca^{2+}). (B) $[Na^+]_i$, obtenida después de tres min de la adición del EGTA, en función de la concentración de sodio externo ($[Na^+]_{ext}$) (C) Aumento de la $[Na^+]_i$ obtenida después de tres min de la adición de EGTA menos la $[Na^+]_i$ del reposo) en función de la medida de la despolarización del potencial de membrana (V_m obtenidos después de tres min de la adición del EGTA, menos el V_m del reposo; $n = 7$, medias \pm error estándar).

Debido a que la hiperpolarización inducida por la restauración de calcio o de magnesio es sensible a la ouabaína (González-Martínez, 2003), se estudió el efecto de este inhibidor sobre los cambios en la $[Na^+]_i$. En medio HHSM que contenía 168.5 mM de sodio (incluyendo EGTA-NaOH), la eliminación de calcio aumenta la $[Na^+]_i$ notablemente más en presencia de ouabaína, como se esperaba, al estar inhibida la ATPasa Na^+/K^+ , la restauración de calcio no revirtió la dirección del flujo de sodio (Figura 14A). Asimismo, el magnesio indujo una disminución de la $[Na^+]_i$ en la despolarización inducida por la eliminación de calcio en espermatozoides tratados con ouabaína (Figura 14B).

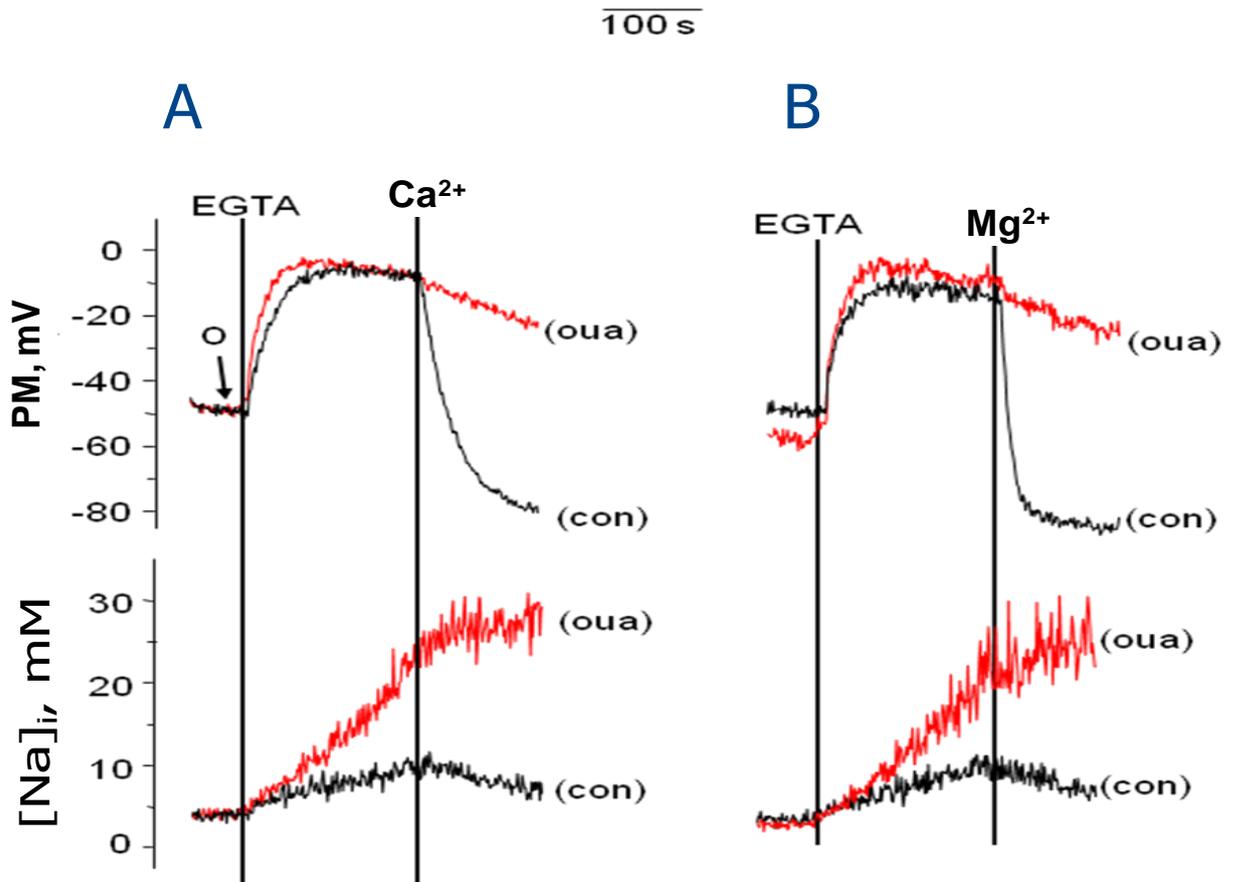


Figura 14. Efecto de la inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ sobre el influjo de sodio inducido por la remoción de calcio en espermatozoides humanos. Los espermatozoides se cargaron con SBFI-AM. El medio HHSM contenía 168.5 mM de sodio (incluido el EGTA-NaOH) y el influjo de sodio se inició removiendo el calcio con 3.5 mM de EGTA. El PM se registró en los espermatozoides obtenidos de la misma muestra en condiciones idénticas. A. Dos min después del EGTA se adicionó 3.5 mM CaCl_2 (Ca^{2+}) (2.5 mM final). B. Se adicionó 3 mM de MgCl_2 (Mg^{2+}), como se indica; (negros) trazos control, (rojos) se añadió ouabaína (O) 15 s antes de EGTA, en ambos casos. Los Trazos son representativos de muestras de semen obtenidas de 5 individuos.

6.3. VARIACIONES EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA

Se ha reportado la presencia de Ca_v de bajo umbral (tipo T) en algunas especies de espermatozoides de mamífero (González-Martínez, 2003; Darszon *et al.*, 2006). Estos canales empiezan a activarse a ~ -60 mV, llegando a su máxima activación a ~ -30 mV. Se realizó un ensayo fijando el potencial de membrana a diferentes voltajes (Figura 15A), a ~ -71 mV con valinomicina (ionóforo de potasio), ~ -50 mV sin valinomicina, control, ~ -43 mV con valinomicina $\sim +15$ mM de KCl, ~ -15 mV con valinomicina + 60 mM de KCl. La figura 15B muestra los $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenidos después de la readición de calcio en función del potencial de membrana. A los diferentes potenciales de membrana que se probaron no hubo diferencia estadística.

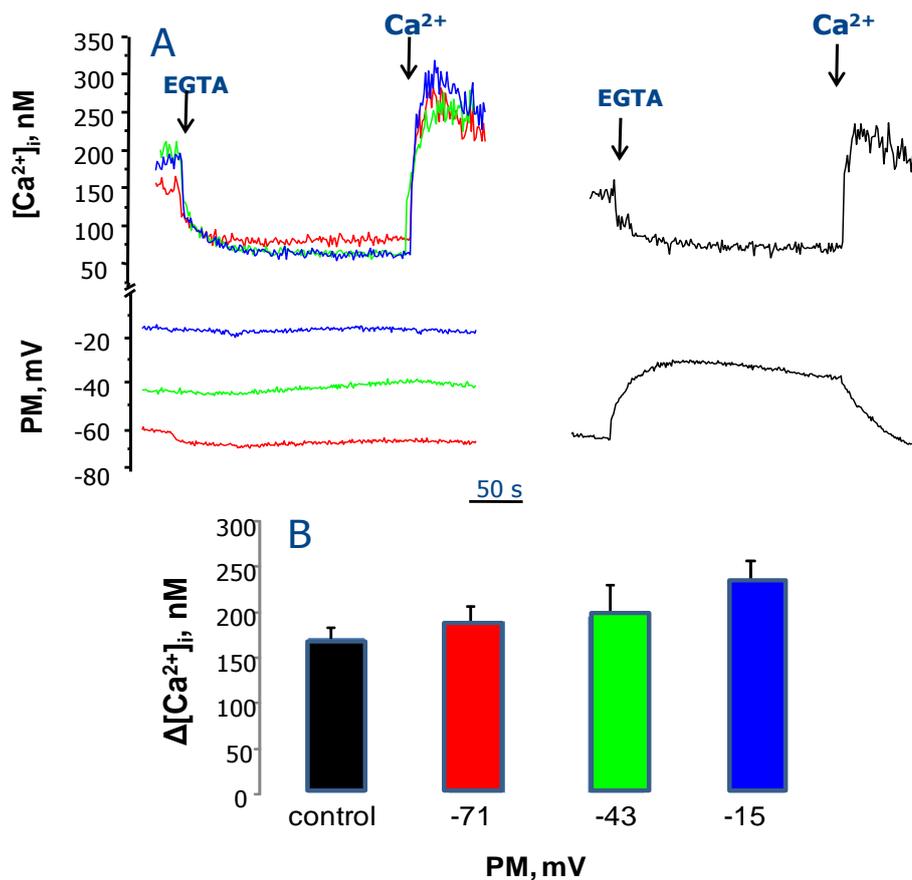


Figura 15. Efecto de la disminución de la concentración de calcio y la readición subsiguiente a diferentes voltajes. **A.** Influjos de Ca^{2+} (panel de arriba) y PM (panel de abajo) detectados simultáneamente con un fluorómetro PTI. A los espermatozoides (1×10^7 células) se les fijó el PM con valinomicina y diferentes concentraciones de K^+ . Se agregaron 3.5 mM de EGTA y después de dos min se añadieron 2.5 mM de $CaCl_2$ (Ca^{2+}): sin valinomicina control (trazo negro), a -71 mV fijado con valinomicina (trazo rojo), a -43 mV (trazo verde), a -15 mV (trazo negro). **B.** $\Delta[Ca^{2+}]_i$ obtenidos después de la readición de calcio en función del PM ($n = 4$, media \pm error estándar).

6.4. EL MIBEFRADIL HIPERPOLARIZA E INHIBE PARTE DE LA ENTRADA DE Ca^{2+} .

El mibefradil, un bloqueador de los canales de calcio tipo T y L, induce una hiperpolarización dependiente de la dosis cuando se agrega después de remover el calcio externo. Además, bloquea parcialmente el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la restauración de calcio (Figura 16A). De manera similar a la restauración de calcio, el Mg^{2+} , o el mibefradil, detienen la entrada de sodio y disminuyen la $[Na^+]_i$ provocada por la eliminación de calcio externo (Figura 16B).

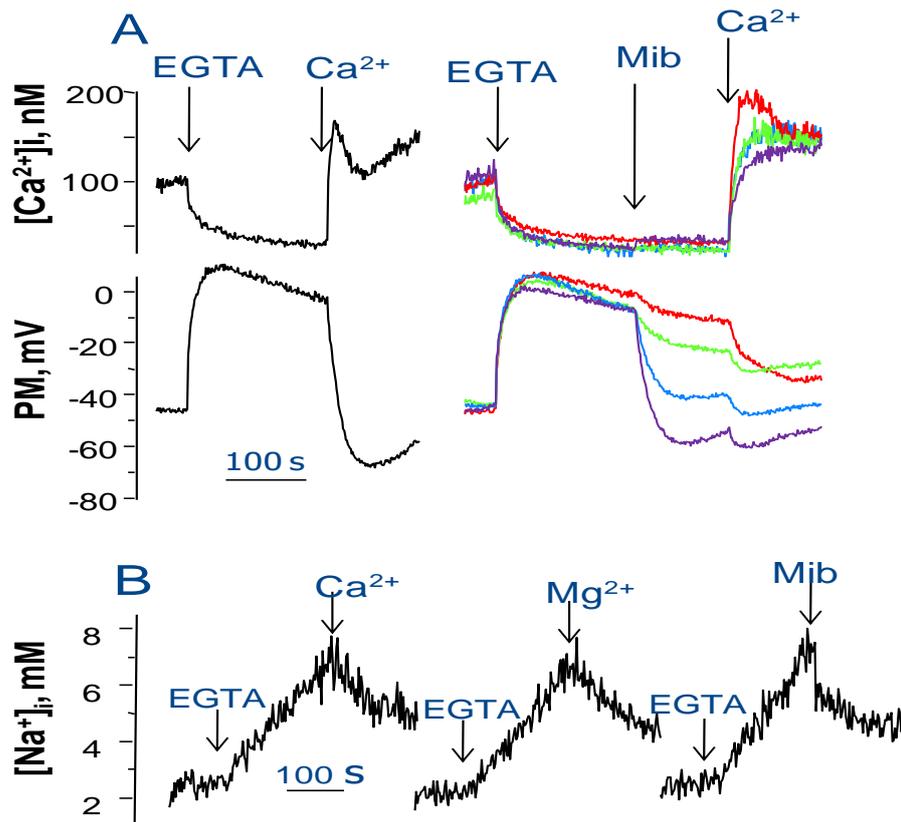


Figura 16. El mibefradil hiperpolariza e inhibe parte de la entrada de Ca^{2+} e induce la disminución de la $[Na^+]_i$ en espermatozoides despolarizados al eliminar el calcio externo. A. Efecto de diferentes cantidades de mibefradil en la $[Ca^{2+}]_i$ y el PM, detectados de forma simultánea, en espermatozoides donde el potencial de membrana esta despolarizado por eliminando el calcio externo con 3.5 mM EGTA. Tres minutos más tarde se agregaron las siguientes cantidades de mibefradil (Mib): 2.5 μ M (trazo rojo), 5 μ M (trazo verde), 10 μ M (trazo azul) y 20 μ M (trazo morado), posteriormente, el calcio (Ca^{2+}) fue restituido a 2.5 mM, como se indica. Los trazos de la izquierda son los controles sin mibefradil. B. Efecto de la mibefradil sobre la $[Na^+]_i$ en espermatozoides cargados con SBF1-AM. Mibefradil (Mib) (20 μ M) adicionado 90 s después de 3.5 mM EGTA. Como comparación, se adiciono 2.5 mM de calcio (Ca^{2+}) o 3 mM de $MgCl_2$ (Mg^{2+}).

En los espermatozoides sometidos a la eliminación de calcio externo, el mibefradil inhibe la despolarización dependiente de Na^+ ($IC_{50} = 7.1 \pm 0.6 \mu$ M) y el aumento en la $[Na^+]_i$ ($IC_{50} = 5.7 \pm 0.8 \mu$ M). Además, inhibe una fracción del pico de calcio inducidas por la restauración de calcio ($IC_{50} = 5.6 \pm 1.2 \mu$ M) (Figura 17). Adicionalmente, mibefradil a concentraciones mayores a 10 μ M, indujo a una hiperpolarización lenta y pequeña sobre el potencial de reposo de la membrana, una ligera disminución en la $[Ca^{2+}]_i$ en el reposo y una reducción de la disminución de calcio inducidas por la eliminación de calcio.

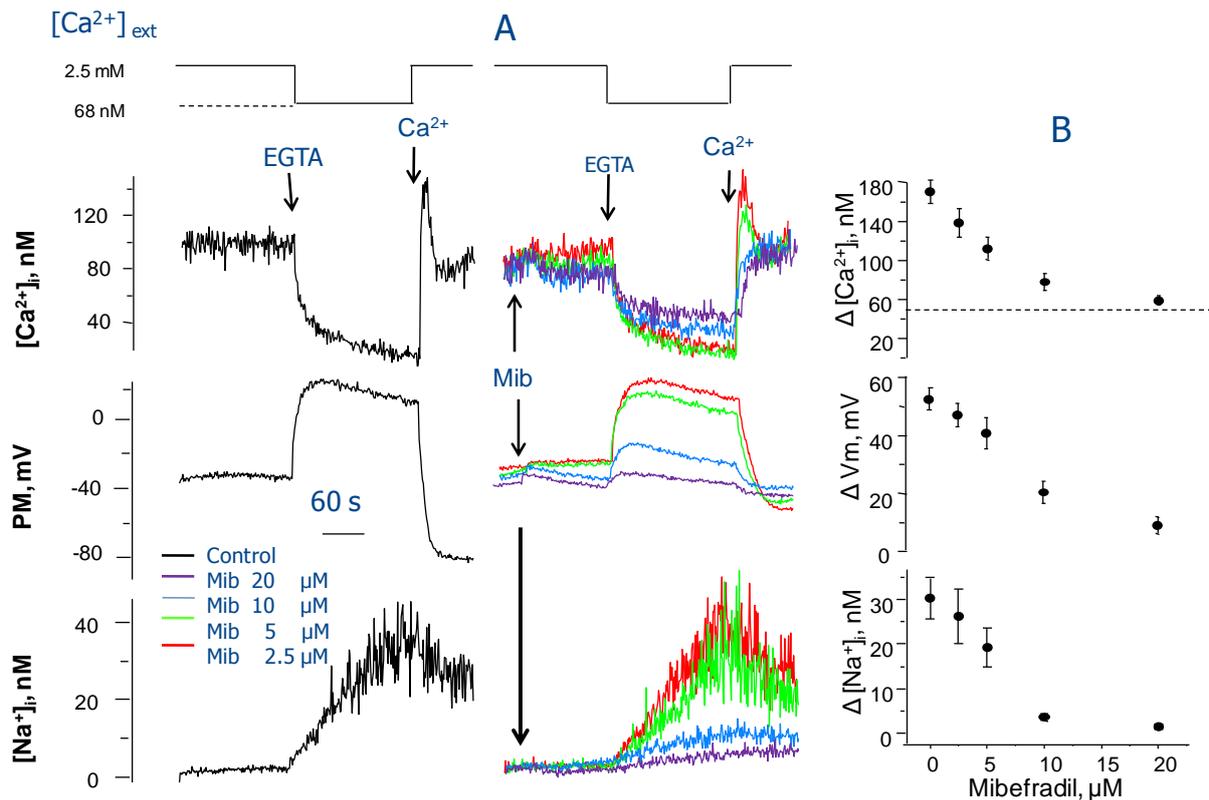


Figura 17. Efecto de mibefradil sobre la $[Ca^{2+}]_i$, PM y $[Na^+]_i$, en espermatozoides donde se disminuyó el calcio externo. La $[Ca^{2+}]_i$ y el PM se detectaron simultáneamente en espermatozoides cargados con Fura 2-AM y diSC₃(5). Las muestras del mismo donante se cargaron con SBFI-AM para detectar la $[Na^+]_i$. Mibefradil 2.5 μ M (trazo rojo), 5.0 μ M (trazo de verde), 10 μ M (trazo azul) y 20 μ M (trazo negro) se añadió 2 min antes del EGTA. Los trazos de la izquierda muestran los controles sin mibefradil (experimento representativo de una n = 7). B. Curvas dosis respuesta del efecto del mibefradil. La entrada de calcio inducida por la restauración de calcio (la línea punteada indica el límite de una fracción sensibles a mibefradil), (panel de arriba) El grado de despolarización, medido como la despolarización máxima inducida con EGTA, menos el potencial de reposo de la membrana (panel de en medio) El efecto del mibefradil sobre el influjo de sodio, medido como la $[Na^+]_i$ después de tres min de agregar EGTA menos la $[Na^+]_i$ en reposo, se muestra en el panel de abajo (n = 7, medias \pm error estándar).

Como se esperaba, la hiperpolarización inducida por mibefradil se inhibe por ouabaína (Figura 18C) y por la incubación de los espermatozoides en un medio sin potasio externo, una condición que impide la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ (Figura 18D). La hiperpolarización ocurre tras la adición de 1 mM de KCl al activarse la ATPasa Na^+/K^+ .

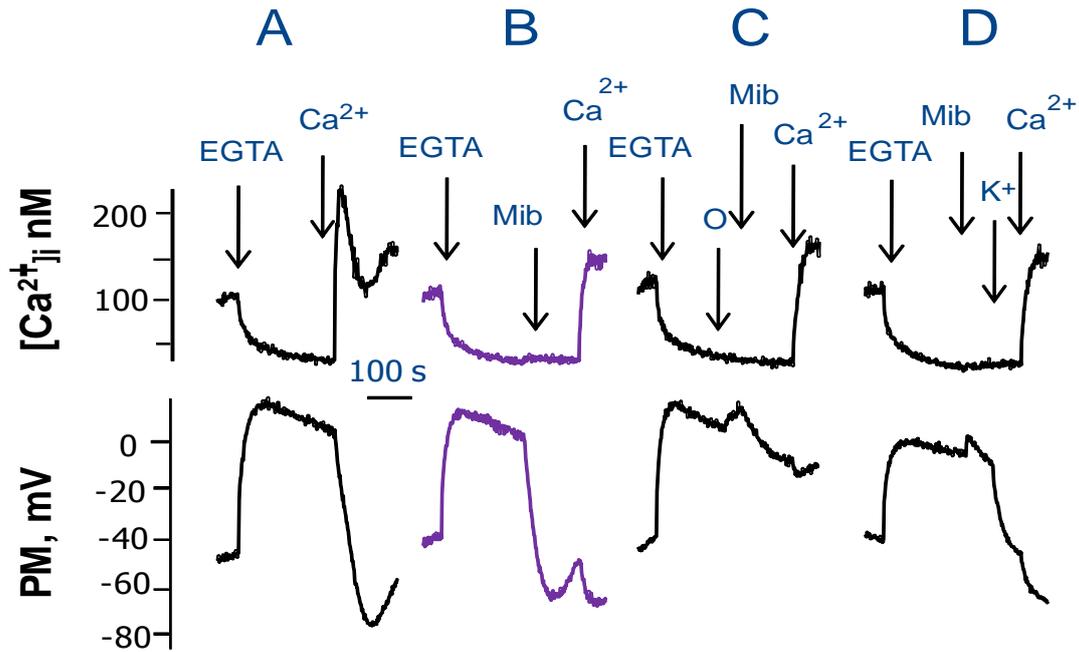


Figura 18. Inducción de la hiperpolarización dependiente de la ATPasa Na^+/K^+ con mibefradil en espermatozoides donde el PM está despolarizado a causa de la eliminación de calcio. **A.** Control, efecto de EGTA y la posterior restitución de calcio. **B.** Efecto de EGTA y posterior adición de 20 μM de mibefradil (Mib), un min después se restituyó el calcio (Ca^{2+}) externo. **C.** Se añadió ouabaína (50 μM) 15 s antes de mibefradil y el calcio se restituyó como se indica. **D.** Efecto del EGTA y posterior adición de mibefradil (20 μM) en un medio HSM sin potasio. Para asegurar que los espermatozoide estuvieran en cero potasio se lavaron previamente en HSM sin potasio y se añadieron a la celda de fluorescencia que contenía 2.5 ml de este medio. Un min después de la adición de mibefradil, se adicionó 1 mM de KCl y un min más tarde se restituyó el calcio. Los registros son representativos de 5 experimentos.

6.5. EFECTO DEL pH_i SOBRE EL SODIO Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA

Los cambios de pH_i son muy importantes en la fisiología de todas las células ya que modulan múltiples enzimas y canales iónicos. Se realizaron pruebas adicionales en medio libre de Ca^{2+} a diferentes concentraciones de sodio (sustituyendo el NaCl por cloruro de colina). El incremento del pH_i promueve la entrada de Na^+ (Figura 19). El tratamiento con 10 mM NH_4Cl incrementó en promedio el pH_i de ~ 6.8 a ~ 7.2 en los espermatozoides. En la Figura 19B (panel superior) se muestra el PM a diferentes $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ más 10 mM NH_4Cl . Se puede observar que cuando los espermatozoides que se alcalinizan es mayor la despolarización de la membrana. En la Figura 19B (panel inferior) se muestra el influjo de calcio a diferentes $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ más 10 mM NH_4Cl . Así, el aumento de la $[\text{Na}^+]_i$ de espermatozoides humanos mostró las propiedades características de las corrientes CatSper en patch-clamp de espermatozoides ante la alcalinización (Lishko y Kirichok, 2010).

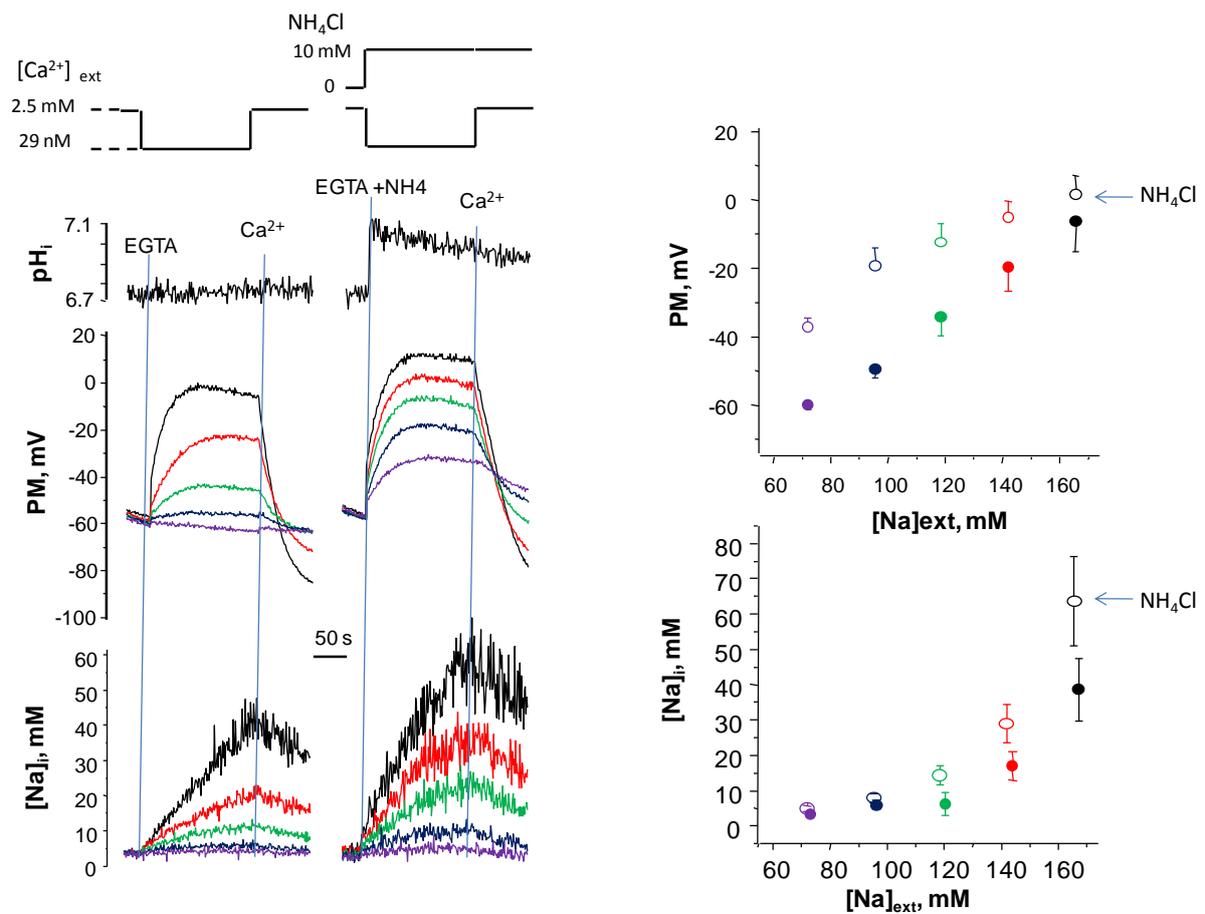


Figura 19. Efecto del pH_i sobre el sodio y el potencial de membrana. Los espermatozoides (1×10^7 células) cargados con BCECF, diSC₃ (5) y SBFI, para la medición de pH_i, PM y la [Na⁺]_i, respectivamente se agregan en la celda de fluorescencia que contiene diferentes cantidades en sodio. Los valores totales de sodio externo fueron los siguientes (en mM); 168.5; 145.0; 121.5; 98.0 y 74.5. La concentración final de sodio externo incluye la cantidad de ácido etilenglicol tetraacético (EGTA)-NaOH añadido. **A.** Los trazos representativos del pH_i (panel superior), PM (panel medio) y [Na⁺]_i (panel inferior) reflejan los cambios inducidos por 3,5 mM de EGTA y EGTA + NH₄ posteriormente la adiciones de 3,5 mM de CaCl₂ (Ca²⁺). **B.** Aumento del PM (PM obtenido después de dos min de la adición de EGTA menos el PM en reposo) en función de la concentración de sodio externo ([Na⁺]_{ext} con o sin NH₄ (panel superior). [Na⁺]_i, obtenida después de tres min de la adición del EGTA, en función de la [Na⁺]_{ext} (panel superior). $n = 7$, medias \pm error estándar).

Bajo la hipótesis de que se podría tratar de un canal CatSper, los siguientes experimentos se enfocaron a estudiar la movilidad espermática, bajo el modelo experimental trabajado hasta el momento. Considerando lo anterior, se utilizó al mibefradil como un posible inhibidor de los canales CatSper.

6.6. EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE Ca^{2+} EXTRACELULAR SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA.

La figura 20A muestra el efecto de la remoción de calcio del medio sobre la movilidad de los espermatozoides. El calcio externo se redujo de 2.5 mM a 68 nM con la adición de 3.5 mM de EGTA. Este procedimiento resulta en una reducción lenta del porcentaje de espermatozoides móviles que llega casi a cero pero que es reversible. El tiempo de exposición necesario para reducir al 50% la población móvil en la cámara ($t_{1/2}$) fue de $t_{1/2} = 6.8 \pm 1.8$ min ($n = 6$, \pm error estándar). El valor de $t_{1/2}$ es muy variable, va desde 2.4 hasta 14 min. En medio que contiene calcio la movilidad del espermatozoide se mantuvo alta, casi sin cambios durante el mismo período de tiempo dentro de la cámara. Al tiempo $t_{1/2}$, la movilidad de los espermatozoides control disminuyó en promedio sólo el $2.5 \pm 1.8\%$ (8% de disminución máxima y 3 % de aumento máximo).

Ya que la falta de calcio externo es la causa de la despolarización dependiente de Na^+ y de la carga de sodio, que se pueden prevenir con magnesio en concentraciones milimolares o por la reducción de sodio externo, era conveniente analizar si la disminución de la movilidad de los espermatozoides está relacionada con este fenómeno. Dada la variabilidad del efecto de remover el calcio con EGTA en la disminución de la movilidad de los espermatozoides, esperamos el tiempo necesario para reducir su movilidad a valores cercanos al 25% y en este período de tiempo, se probó el efecto en presencia de 3 mM de MgCl_2 . Este catión divalente se añade al medio normal de capHHSM antes de agregar el EGTA. El mismo protocolo se usó al reducir el sodio externo, mediante la sustitución de NaCl del HHSM por cloruro de colina. Estas dos condiciones inhiben tanto la despolarización dependiente de Na^+ como la carga de Na^+ (González-Martínez, 2003; Torres-Flores *et al.*, 2008). Como se muestra en la figura 21C, cuando los espermatozoides se incubaron en medio bajo en Na^+ no se afectó su movilidad y bajo esta condición la eliminación de calcio apenas disminuyó la movilidad. Asimismo, la presencia de 3 mM de MgCl_2 en capHHSM no afectó la movilidad espermática y también evitó el efecto inhibitorio de la eliminación de calcio sobre la movilidad del espermatozoide observada en medio control. En la Figura 20B observamos: la restauración del calcio, la adición de 3 mM de MgCl_2 o la sustitución de NaCl por cloruro de colina (la muestra se centrifuga y se resuspende en medio bajo en Na^+). Estos procedimientos restauran la movilidad de los espermatozoides tratados previamente con EGTA. El tiempo necesario para recuperar el 50% de movilidad de los espermatozoides ($t_{1/2_{\text{rec}}}$) fue de 4.4 ± 0.8 ,

3.9 ± 0.3 y 3.1 ± 0.3 min (n = 7 ± error estándar), respectivamente. La presencia de 20 µM de mibefradil produjo una pequeña disminución en el porcentaje de movilidad espermática y protege la reducción de su movilidad al eliminar calcio con EGTA (Figura 20D). Sin embargo, a diferencia de Mg²⁺ y el calcio, el mibefradil no fue capaz revertir la movilidad de los espermatozoides después de la eliminación de calcio (no mostrado).

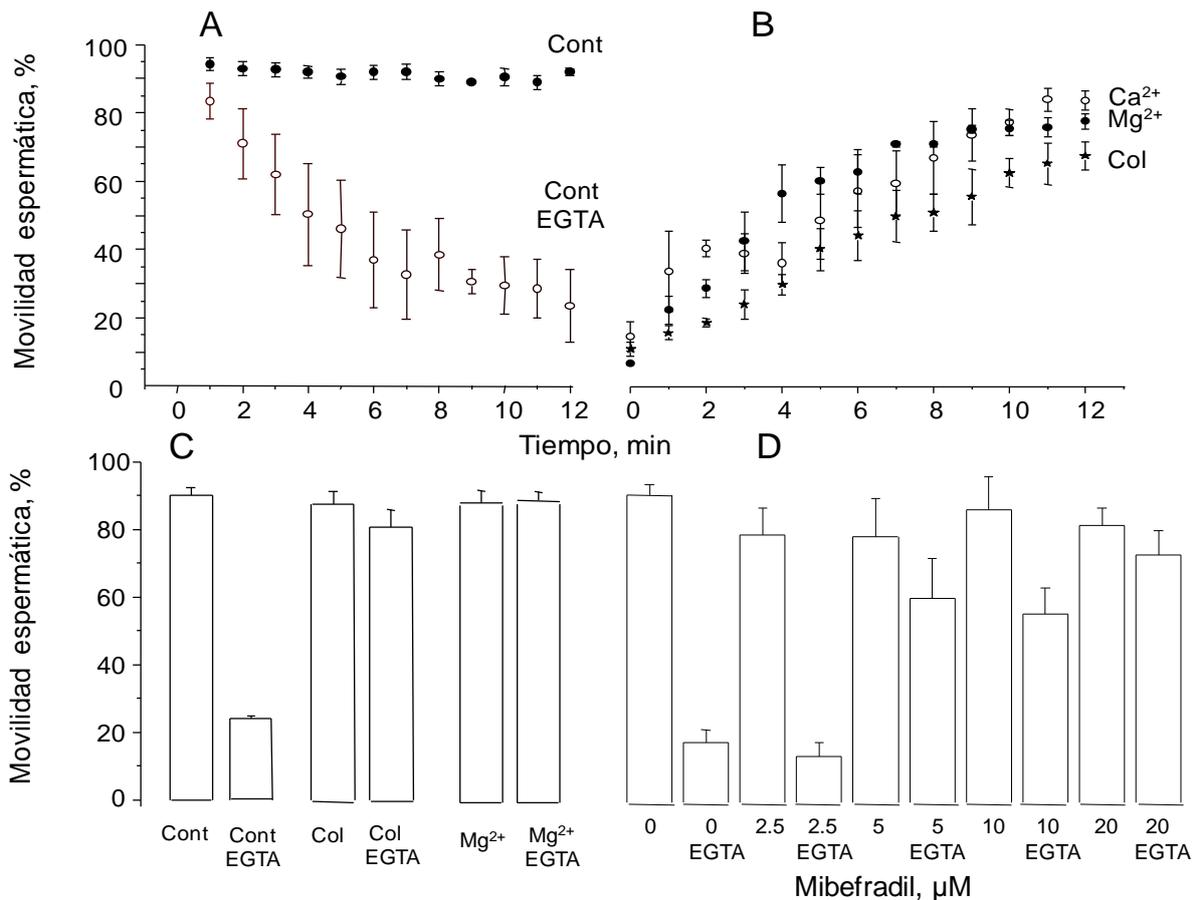


Figura 20. Efecto de la eliminación de calcio sobre la movilidad espermática. **A.** Los espermatozoides aislados por gradientes de Percoll se lavaron e incubaron en capHHSM (10×10^6 células/ml). El calcio extracelular se redujo de 2.5 mM a 65 nM mediante la adición de 3.5 mM de EGTA y los espermatozoides inmediatamente se depositaron sobre una placa MicroCell a 37 °C. Los parámetros de movilidad se registraron cada min hasta que la movilidad disminuyó por debajo del 10 % (círculos vacíos). Los círculos llenos muestran el porcentaje de movilidad de los espermatozoides incubados en la placa sin EGTA durante el mismo período. **B.** Recuperación del deterioro de la movilidad espermática inducido por la eliminación de calcio al restaurar el Ca²⁺ a 2.5 mM (círculos abiertos), agregando MgCl₂ 3 mM (círculos cerrados) o en capHHSM bajo en Na⁺ (estrellas). La movilidad se registró cada min hasta que se recuperó a niveles cercanos al control. **C.** Efecto de incubar los espermatozoide en medio capHSM bajo en Na⁺ y añadiendo 3 mM de MgCl₂ al capHHSM con o sin 3.5 mM de EGTA, en la movilidad de los espermatozoides (n = 9 diferentes individuos, media ± error estándar). **D.** Efecto de mibefradil (2.5 -20 µM) sobre la movilidad espermática. Para cada serie de experimentos se determinó primero el tiempo necesario para el EGTA disminuyera la movilidad espermática al 25 % (n = 3 diferentes individuos, media ± error estándar), *p <0.05 entre el control y los tratamientos.

6.7. MOVILIDAD ESPERMÁTICA Y MECANISMOS DE TRASPORTE IÓNICO.

Para relacionar mejor las mediciones de la movilidad con los mecanismos de transporte iónico provocados por la eliminación de calcio, la movilidad se determinó en alícuotas de los espermatozoides a los que se les determinó la $[Ca^{2+}]_i$ y el PM en registros simultáneos, además de los registro de la $[Na^+]_i$. Los espermatozoides humanos se incubaron en medio de HHSM y al adicionar EGTA se induce una despolarización dependiente de Na^+ , por la disminución del calcio intracelular y el aumento de sodio intracelular, como se informó anteriormente (González-Martínez, 2003; Torres-Flores *et al.*, 2008). Como se anticipaba, después de 4 min el porcentaje de espermatozoides móviles cayó de 95 a 45% (Figura 20A). La movilidad se recuperó al 90% al restituir el calcio. Los espermatozoides cargados con SBFI revelaron que la movilidad se recupera al restituir el calcio a pesar de que la $[Na^+]_i$ se mantiene elevada (Figura 21A, trazo inferior). En los espermatozoides incubados en medio de colina o en medio de HHSM que contiene 3 mM de $MgCl_2$, la adición de EGTA disminuyó la $[Ca^{2+}]_i$, pero no indujo cambios en el sodio intracelular y potencial de membrana como ya se observó (González-Martínez, 2003; Torres-Flores *et al.*, 2008), y las características de la movilidad se preservaron (Figura 21C). Como se mostró anteriormente (González-Martínez, 2003), el Mg^{2+} indujo una hiperpolarización dependiente de ouabaina en espermatozoides tratados con EGTA, deteniendo el influjo de sodio y el aumento de la $[Na^+]_i$, sin afectar los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$. En estas condiciones la inhibición de la movilidad de los espermatozoides inducida por la eliminación de calcio se revierte, incluso en presencia de niveles altos de la $[Na^+]_i$, como ocurre al restituir el calcio. En conjunto, estos resultados sugieren que la disminución de la movilidad de los espermatozoides no depende de la $[Ca^{2+}]_i$, sino de la despolarización dependiente de Na^+ , ó al aumento en la $[Na^+]_i$ ó a la suma de ambas.

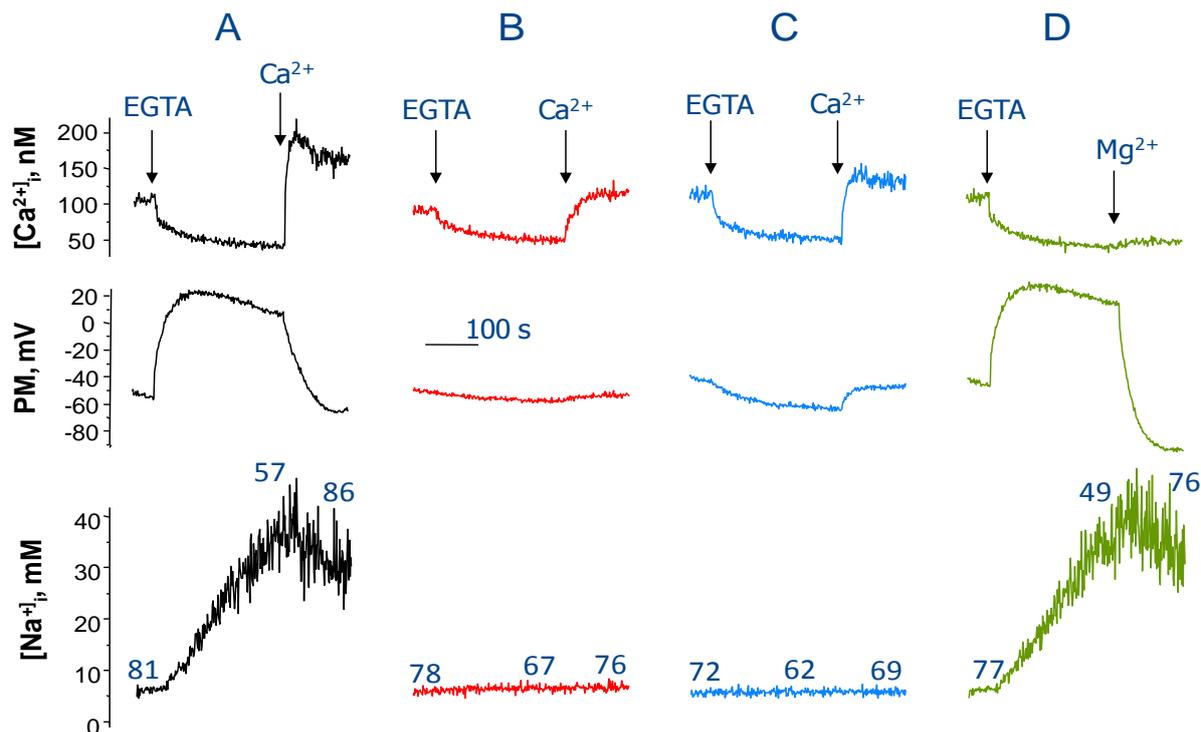


Figura 21. Efecto de la remoción de calcio y posterior restitución de calcio, sobre la movilidad de espermatozoides utilizados en el registro simultáneo de PM y de la $[Ca^{2+}]_i$, o durante la determinación de la $[Na^+]_i$. Los espermatozoides cargados con las sondas fluorescentes ($\sim 15 \times 10^6$ células) se agregaron a la celda de fluorescencia que contenía 2.5 ml de los siguientes medios, complementados con $0.5 \mu M$ diSC3 (5) para el caso de la medición de PM y de la $[Ca^{2+}]_i$: **A.** HHSM, **B.** HHSM bajo en sodio, **C.** HHSM + 3.0 mM de $MgCl_2$ y **D.** HHSM; en este experimento se añadió 3 mM de $MgCl_2$ después del EGTA en lugar de calcio. Se tomaron alícuotas de $10 \mu L$ en tres momentos diferentes durante los registros: antes de la adición EGTA, antes de la restitución ya sea de calcio o de magnesio, y tres min después de la restitución, ya sea de calcio o de magnesio. Los patrones de movilidad de los espermatozoides usando un equipo de CASA a $37^\circ C$. Los porcentajes de motilidad de los espermatozoides son los números que se indican en los registros.

Para discernir entre los efectos de la despolarización dependiente de Na^+ , y la carga de sodio sobre la movilidad espermática, que causa la disminución de la $[Ca^{2+}]_{ext}$, se fijó el potencial de membrana con valinomicina. La figura 22A muestra el efecto de la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ con EGTA (control). Al fijar el potencia de membrana con valinomicina se impidió la despolarización inducida por la disminución del calcio externo (figura 22B). La disminución del calcio externo y el aumento de la $[Na^+]_i$ en presencia de valinomicina produjo una marcada disminución de la movilidad espermática (Figura 22 C).

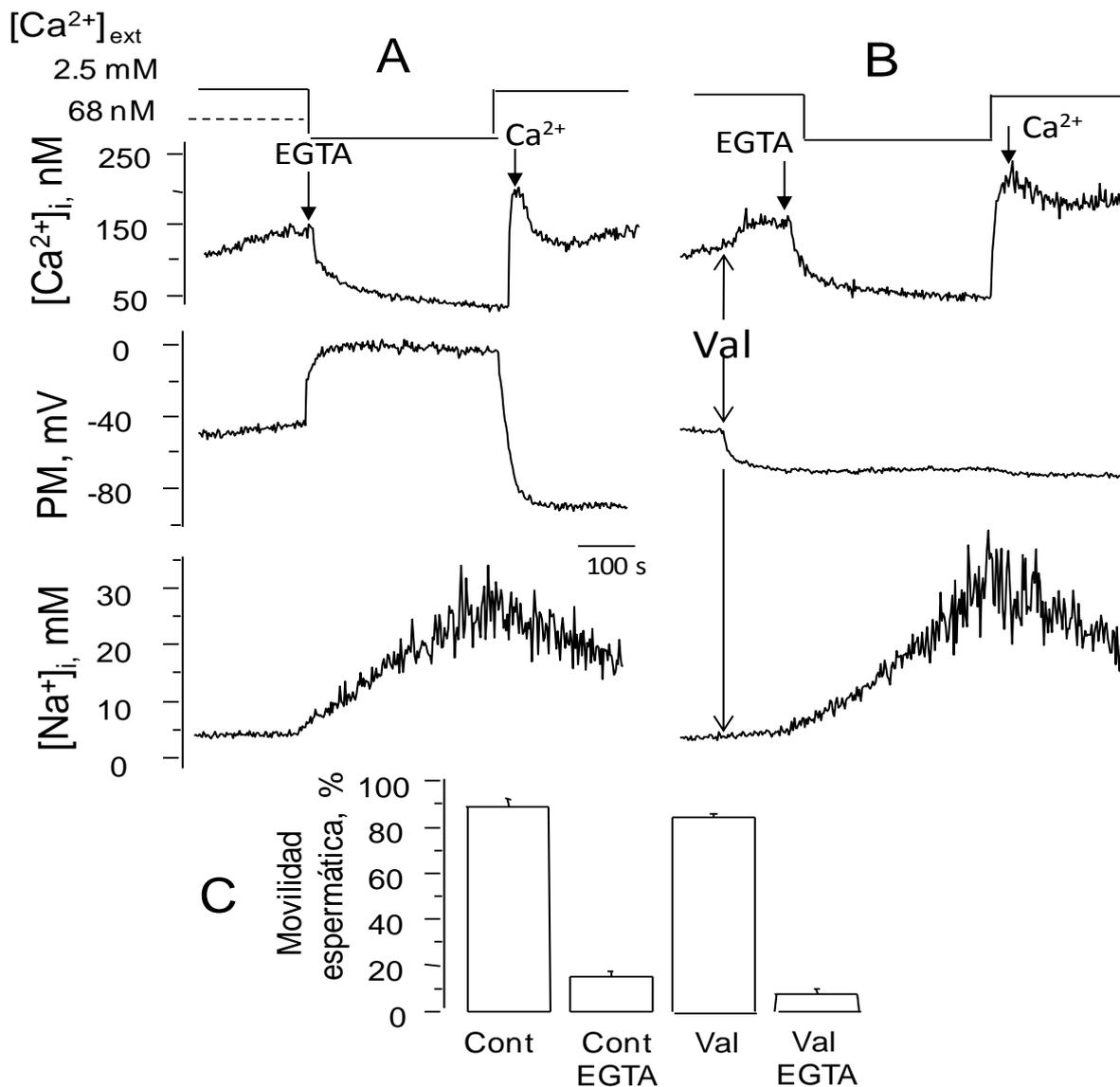


Figura 22. Efecto de fijar el potencial de membrana sobre la $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ y la movilidad espermática de los espermatozoides de humano. A. Registros control sin valinomicina. B. Efecto de valinomicina sobre el PM, la $[Ca^{2+}]_i$ y la $[Na^+]_i$ de espermatozoides de humano expuestos a la eliminación de calcio con 3.5 mM EGTA y a la restitución de calcio posteriormente. C. La remoción del calcio extracelular inhibe la movilidad de los espermatozoides en ausencia o presencia de valinomicina. La movilidad se determinó en todas las muestras en el momento en que disminuyó al 15% en los espermatozoides incubados en HHSM + 3.5 mM EGTA; n = 6 personas \pm error estándar.

La movilidad del espermatozoide depende de la fuerza impulsora proporcionada por la dineína, una enzima 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. Los espermatozoides se están dejando de mover y nuestra hipótesis es que está disminuyendo el contenido de ATP.

6.8. CONTENIDO DE AMPc Y ATP

A partir de ATP se produce AMPc y el incremento de este activa a la PKA con lo que se induce la fosforilación de serinas/treoninas que induce la fosforilación de tirosinas flagelares, probablemente a través de la activación de PTK, resultando en la hiperactivación del espermatozoide (Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006; Turner, 2006). Por lo que se midieron estos parámetros en los espermatozoides sometidos a la eliminación de calcio y cuando la movilidad espermática se reducía a <10%. En la figura 23A, se muestra la disminución del contenido de AMPc en todas las condiciones en donde los espermatozoides se sometieron a EGTA. La figura 23B muestra que en estas condiciones, la eliminación de calcio induce una disminución del contenido de ATP de ~ 40% en espermatozoides incubados en medio que contiene sodio. Este fenómeno se inhibe ya sea por 3 mM de Mg²⁺, en espermatozoides suspendidos en medio de colina y en parte por mibefradil.

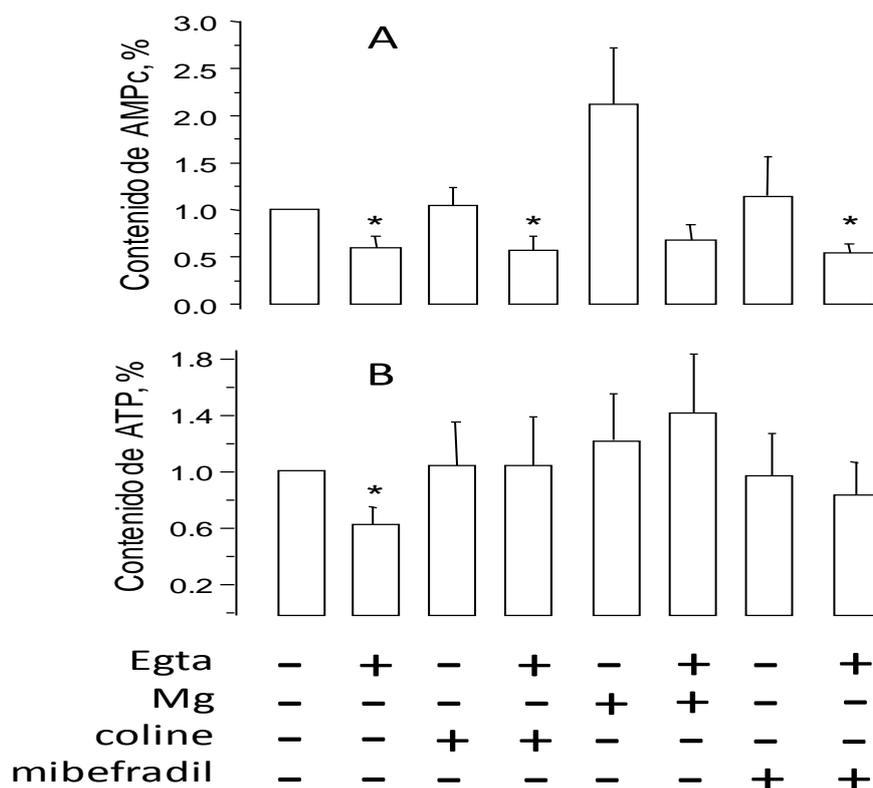


Figura 23. Efecto de la eliminación de calcio externo en espermatozoides humanos sobre el contenido de AMPc y ATP. Los espermatozoides se incuban, ya sea en capHHSM, bajoNa-capHHSM, capHHSM con 3 mM de MgCl₂, o capHHSM complementado con 20 μM de mibefradil. El calcio externo fue eliminado del medio mediante la adición de 3.5 mM EGTA y las muestras fueron incubadas el tiempo necesario para detener la movilidad espermática tratados con EGTA. En condiciones normales los espermatozoides en medio capHHSM presentaban valores <10 % (6 %, en este momento los espermatozoides tratado con EGTA incubadas en capHSM, con 3 mM de MgCl₂ fue del 92 %). En este momento, los extractos de espermatozoides se tomaron para la determinación de AMPc o para la determinación de ATP. **A.** AMPc, expresado como una fracción de control. El contenido de AMPc fue $0,98 \pm 0,43$ pmol / 10^7 células, n = 5 ± error estándar. **B.** ATP, expresado como una fracción de control. El contenido de ATP fue 292 ± 60 pmol ATP / 10^7 células, n = 7 ± error estándar. *p < 0.05.

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo mostramos que la despolarización dependiente de sodio inducida por la eliminación de calcio aumenta la $[Na^+]_i$. Esta hipótesis se basa en el hecho de que el aumento en la $[Na^+]_i$ se detiene por la restitución de calcio o por la adición de magnesio en concentraciones de micromolar y milimolar respectivamente, que son las condiciones que bloquean también la despolarización dependiente de sodio y causan un hiperpolarización dependiente de la ATPasa Na^+/K^+ (González-Martínez, 2003). Además, el efecto de la ouabaina, inhibidor de la ATPase Na^+/K^+ , en el aumento de la $[Na^+]_i$ inducido por la eliminación de calcio y su efecto de bloquear la disminución de la $[Na^+]_i$ producido por la restauración de calcio o de magnesio, indica que la bomba se activa rápidamente como resultado del aumento de la $[Na^+]_i$.

La entrada de Na^+ inducida al eliminarse el calcio externo no ocurre en medio HHSM que contiene 70 mM de NaCl (Figura 13). Este efecto es consistente con la desaparición de la despolarización dependiente de sodio inducida en las mismas condiciones (González-Martínez, 2003). En esta condición la fuerza electroquímica del Na^+ es cercana a cero, tomando en cuenta el potencial eléctrico de la célula.

Los resultados presentados aquí sostienen la hipótesis de que en condiciones de reposo hay al menos un canal de calcio que contribuye al calcio intracelular en reposo (González-Martínez, 2003). La selectividad al calcio de este canal refleja un sitio de acceso externo con una K_d en el rango de ~100 nanomolar, con el que puede interaccionar el magnesio con una K_d en el rango milimolar. Por lo tanto, cuándo el calcio se extrae de este sitio, la selectividad cambiaría dejando pasar eficientemente sodio a través del canal. Esto tiene como resultado una despolarización de ~ -45 mV a valores cercanos a 0 mV, y el aumento observado de la $[Na^+]_i$ de 3 mM a valores cercanos a 35 mM. En esta condición, la ATPase Na^+/K^+ se activa rápidamente por el aumento en la $[Na^+]_i$, para oponerse a la entrada masiva de sodio. Cuándo el calcio externo se restaura, el canal deja de pasar Na^+ y el calcio se transporta con baja conductividad, produciendo un pico de calcio. En esta situación el potencial de membrana depende principalmente de la gran actividad electrogénica de ATPasa Na^+/K^+ que hiperpolariza a la célula. En consecuencia, la $[Na^+]_i$ tiende a disminuir a valores del reposo, aunque a un ritmo mucho más lento que la hiperpolarización. Este hallazgo sugiere que la hiperpolarización sostenida, que alcanza valores más negativos que el reposo y con

frecuencia, incluso más negativos que el potencial de Nernst para la distribución de potasio (E_k), se debe a la gran cantidad en la $[Na^+]_i$ (González-Martínez, 2003).

En este trabajo se presentan evidencias que indican que la disminución progresiva de la movilidad espermática inducida por la extracción de calcio del medio, observada en espermatozoide de mamíferos (Feng *et al.*, 1988; Aaberg *et al.*, 1989; Jin *et al.*, 2007) puede estar relacionada con la entrada de sodio a través de un canal de calcio que ocurre al eliminar este catión del medio externo. Los datos adicionales presentados aquí indican que este canal se bloquea por mibefradil. De hecho, la eliminación de calcio no induce la disminución de la movilidad en un medio de bajo contenido de sodio, en medio normal complementado con 3 mM de $MgCl_2$, o en la presencia de mibefradil. Se acaban de publicar resultados que muestran que el mibefradil bloquea al CatSper (Strunker *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2011).

La carga de sodio intracelular, no la despolarización en sí, está relacionada con la disminución de la movilidad. Lo anterior se demuestra en los experimentos en los que la valinomicina, que fija el potencial de membrana sin afectar la entrada de sodio, no afectó a la disminución de la movilidad inducidos por la eliminación de calcio. Vale la pena destacar que los estudios de transporte iónico en el espermatozoides humano presentados aquí señalan que la inhibición de la movilidad inducida por la eliminación de calcio externo no está relacionado con la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$, pero sí con la carga de Na^+ o a una consecuencia indirecta de ella. Estos hallazgos son consistentes con evidencias obtenidas en células desmembranadas (Feng *et al.*, 1988), que muestran que la movilidad inicial no requieren de calcio y que la detención posterior en la movilidad del espermatozoide se debe a un proceso membranal diferente.

Interesantemente, el mibefradil, un bloqueador de canales de calcio tipo T y L, también puede inhibir canales de sodio (McNulty y Hanck, 2004) y de potasio (Gomora *et al.*, 1999). La eliminación de calcio induce la despolarización dependiente de sodio, el influjo de sodio y una hiperpolarización dependiente de potasio externo sensible a ouabaína. Estos efectos son también inhibidos por μM de calcio o mM de magnesio y por lo tanto son compatibles con la interpretación que el mibefradil bloquea al supuesto canal que, en ausencia de calcio externo permite la entrada de sodio resultando en una sobrecarga de sodio intracelular. Así, el bloqueo de este canal detendría la entrada de sodio y el potencial de membrana dependería principalmente de la $ATPase Na^+/K^+$, activada por el aumento de la $[Na^+]_i$, hiperpolarizando las células. Nuestros resultados también demuestran que mibefradil

bloquea al mismo canal en presencia de calcio externo, es decir, en su modo de presunto canal de conductancia de calcio, ya que bloquea ~ 70% del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la adición de calcio en espermatozoides tratados con EGTA, con un valor de IC_{50} similares a los obtenidos para el flujo de Na^+ y el bloqueo de la despolarización dependiente de Na^+ . Asimismo, el mibefradil indujo una reducción lenta en la $[Ca^{2+}]_i$ en reposo, lo que sugiere que este canal contribuye a regular los niveles de calcio intracelular, permitiendo la entrada de este catión.

En este sentido, es interesante observar que la disminución de calcio inducida por la eliminación del calcio externo se fue reduciendo progresivamente con el aumento de la concentración mibefradil, indicando que en condiciones adecuadas el calcio puede salir de la célula a través de este mismo canal conductor de Na^+ . El efecto protector de mibefradil sobre la inhibición de la movilidad inducida por la eliminación de calcio externa también es compatible con la protección causada por el calcio, el magnesio y medio bajo en sodio. Sin embargo, a diferencia de estas condiciones, la protección de mibefradil fue parcial y no invirtió la inmovilidad de los espermatozoides causada por la eliminación de calcio externo con EGTA. Posiblemente este bloqueador tiene otros efectos que se traducen en una disminución de la movilidad de los espermatozoides, como lo sugiere el hecho de que disminuye la movilidad de los espermatozoides en un 10% en medio que contiene calcio, un fenómeno observado previamente (Treviño *et al.*, 2004). En este sentido, se muestra que mibefradil bloquea los canales T en las células espermátogénicas (Arnoult, *et al.*, 1998), un influjo de calcio inducido por el potasio externo (Blackmore y Eisoldt, 1999) y un canal de potasio se encuentra en el flagelo de los espermatozoides (Navarro *et al.*, 2007).

A pesar de que la inmovilidad espermática inducida por la eliminación de calcio externo se relaciona con la carga de sodio intracelular, la relación es compleja. De hecho, la $[Na^+]_i$ alcanza valores de hasta 30-40 mM en cuatro minutos, una condición que disminuye la movilidad en menos del 50% de la población de espermatozoides, en la mayoría de las muestras. Los espermatozoide incubados por más tiempo estabilizan la $[Na^+]_i$ en valores cercanos a 40 mM pero la movilidad se ve más afectada. Es evidente que cuando los espermatozoides se incuban en ausencia de calcio externo, la entrada de sodio produce un gasto energético alto necesario para elevar la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ y mantener el $[Na^+]_i$ baja. Por lo tanto, es probable que el ATP se utilice para este propósito, lo que limita su disponibilidad para mantener la actividad de las dineínas, las ATPasa necesarias para la

movilidad espermática. De acuerdo con esta propuesta, la remoción de calcio externo conlleva a una disminución en el contenido de la ATP, medido en el momento en que la movilidad del espermatozoide está por debajo del 10%. Esta disminución del ATP no se observa cuando el medio contiene magnesio, mibefradil o el contenido de sodio es bajo; las condiciones que preservan la movilidad espermática. Sin embargo, es interesante observar que la recuperación de la movilidad, ya sea inducida por el calcio o el magnesio se produce cuando la $[Na^+]_i$ es todavía alto. Cabe señalar que la hiperpolarización causada por estos dos cationes bivalentes podía disminuir la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ , aumentar la disponibilidad de ATP requerido por las dineínas (ATPasa). Otro proceso que posiblemente este implica es la glucólisis que puede contribuir a explicar por qué se produce esta protección (Guzmán-Grenfell *et al.*, 2000), mientras que la $[Na^+]_i$ es elevada. En este sentido, la isoforma alfa 4 de la Na^+/K^+ ATPasa, encontrada predominantemente en la pieza media del flagelo del espermatozoide, desempeña un papel importante en la movilidad (Schuh *et al.*, 2004). Por otra parte, los ratones machos knockout para SACY son estériles y produce espermatozoides inmóviles (Márquez y Suárez, 2008). A pesar de ello, la inhibición de la movilidad del espermatozoide observada aquí no está relacionada con el AMPc ya que la eliminación de calcio externo induce una reducción equivalente de AMPc en todas las condiciones, incluso en las que la movilidad espermática esta conservada (medio de colina y la presencia de magnesio o mibefradil). Así, aun cuando disminuye el AMPc en ausencia de calcio externo, la cantidad restante fue suficiente para mantener la movilidad espermática. Nuestros resultados también apoyan la idea de que los niveles de AMPc dependen de la $[Ca^{2+}]_i$ posiblemente debido a una dependencia de calcio para SACY (Carlson *et al.*, 2007) y, dado que 3 mM de $MgCl_2$ estimuló la producción de AMPc en presencia de calcio externo, también sugieren un papel de la $[Mg^{2+}]_i$.

Experimentos realizados en espermatozoides de ratón haciendo patch clamp en la gota citoplasmica mostraron que el flagelo de los espermatozoides contiene un canal selectivo a calcio, pobremente dependiente al voltaje y activado por alcalinización llamado CatSper (Lishko y Kirichok 2010). Los espermatozoides que carecen de este canal son incapaces de hiperactivar su movilidad y como resultado, los machos son infértiles (Carlson *et al.*, 2009; Ren y Xia 2010). En ausencia de calcio externo, estos canales conducen sodio (Kirichok *et al.*, 2006). Es importante notar que en espermatozoide nulos para CatSper incubados en un medio ausente de calcio, mantienen su movilidad inicial, mientras que los espermatozoides tipo salvaje se inmovilizan (Jin *et al.*, 2007).

El CatSper podría ser el transportador responsable de la despolarización y al aumento en la $[Na^+]_i$ dependiente de sodio. Este nuevo canal de calcio presente en el flagelo de espermatozoides de ratón y de humano, es necesario para la movilidad hiperactivada (Ren, *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2007; Carlson *et al.*, 2009; Lishko *et al.*, 2010; Ren y Xia 2010), y su ausencia conlleva a la infertilidad. En particular, espermatozoides machos nulos a CatSper conservar su movilidad inicial en la ausencia de calcio externos, a diferencia de los ratones silvestres (Ren y Xia 2010).

Según los resultados presentados aquí, la eliminación de calcio externo no podría despolarizar, ni aumentan la $[Na^+]_i$ en espermatozoides de ratones a CatSper nulos, como ocurre en los espermatozoides humanos incubados con mibefradil, o en medios que contengan magnesio o bajo sodio. Estos resultados indican que farmacológicamente el mibefradil podría bloquear CatSper.

Recientemente se acaba de demostrar que el CatSper es el canal que activa la progesterona y la prostaglandina, directa o indirectamente, en el espermatozoide de humano. Al parecer, el CatSper de ratón no es sensible a la progesterona (Strunker *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2011).

VIII. CONCLUSIONES

- ✓ Existen dos sistemas que intervienen en la entrada de calcio:
 - uno de alta afinidad, con una K_d aparente $<$ de $1 \mu\text{M}$
 - uno con una K_d aparente $>$ a 1 mM .

- ✓ El incremento de sodio inducido por la eliminación de calcio resulta de un equilibrio entre el influjo de sodio a través del canal de Ca^{2+} (que en esta condición permea eficientemente sodio) y la disminución en la $[\text{Na}^+]_i$ catalizada por la ATPasa Na^+/K^+ .

- ✓ No se activan los canales de calcio tipo T

- ✓ El mibefradil, inhibe notablemente la despolarización dependiente de Na^+ y la carga de sodio, así mismo se conserva la movilidad espermática. Este bloqueador induce una hiperpolarización sensible a ouabaína.

- ✓ Farmacológicamente el mibefradil bloquea al canal, posiblemente el CatSper, tanto en ausencia como en presencia de calcio externo.

- ✓ El incremento del pH_i promueve la entrada de Na^+ y la despolarización de la membrana.

- ✓ La disminución progresiva de la movilidad espermática inducida por la entrada de sodio a través de un canal de calcio estimulada al eliminar el calcio externo, se debe significativamente a la activación pronunciada de la ATPasa Na^+/K^+ que resulta en una disminución del contenido de ATP.

- ✓ El CatSper es el transportador responsable de la despolarización dependiente de sodio.

IX. PERSPECTIVAS

- Evaluar si el KBR, un inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ afecta al CatSper.
- Estudiar el efecto de la despolarización dependiente de sodio inducida por remoción de calcio externo y el influjo de calcio en espermatozoides capacitados.

X. BIBLIOGRAFIA

- Aaberg AR, Sauer MV, Sikka S, Rajfer J. (1989). Effects of extracellular ionized calcium, diltiazem and cAMP on motility of human spermatozoa. *J Urol.* 141:1221-4.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2004) *Biología molecular de la célula*. Editorial Omega. Barcelona. Pag. 1146-1150.
- Álvarez, LC. (2003). Análisis Integrado de Morfología y movilidad espermática humana con el uso de Sperm Class Analyzer. Departamento de Biología Funcional y Antropología Física. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. 170 pp.
- Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. (1996). Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci.* 93:13004–13009.
- Arnoult C, Villaz M, Florman H.M. (1998). Pharmacological Properties of the T-Type Ca^{2+} Current of Mouse Spermatogenic Cells. *Mol Pharmacol.* 53:1104-1111.
- Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa, *J Androl* 12:323-330.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. (2000). Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity y acrosome reaction. *Front. In Biosc* 5:110-123.
- Barbara G, Alloui A, Nargeot J, Lory P, Eschalier A, Bourinet E, and Chemin J. (2009). T-type calcium channel inhibition underlies the analgesic effects of the endogenous lipoamino acids. *J Neurosci* 29: 13106-13114.
- Baxendale RW, and Fraser LR. (2003). Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 66: 181-189.
- Beltran C, Vacquier VD, Moy G, Chen Y, Buck J, Levin LR, and Darszon A. (2007). Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 1128-1135.
- Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T., Tsien RW. (1994). The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 13:505-6.
- Blackmore, PF. (1993) Thapsigargin elevates and potentiates the ability of progesterone to increase intracellular free calcium in human sperm: possible role of perinuclear calcium. *Cell Calcium.* 14:53-60.
- Blackmore PF, Eisoldt S. (1999). The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-Type Calcium Channels in Human Spermatozoa. *Molecular Human Reproduction.* 5: 498-506.

- Bleil JD, Wassarman PM. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol.* 95:317-24.
- Bossu JL; Feltz A, Thomann J.M. (1985). Depolarization elicits two distinct calcium currents in vertebrate sensory neurones. *Pflügers Arch.* 403:360-368.
- Breitbart H. (2002). Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *J Reprod Immunol.* 53:151-9.
- Brewis IA, Morton IE, Mohammad SN, Browes CE, Moore HD. (2000). Measurement of intracellular calcium concentration and plasma membrane potential in human spermatozoa using flow cytometry. *J Androl.* 21:238-49.
- Carnone, E., Aswandulla, D. (1989). Neuronal calcium channels: Kinetics, Blockade and modulation. *Prog. Biophys. Melee. Biol.* 54: 31-58.
- Carlson E, Westenbroek E, Quill T, Dejian R, Clapham E, Hille B, Garbers L y Babcock F. (2003). CatSper1 required for evoked Ca^{2+} entry y control of flagellar function in sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 14864-14868.
- Carlson AE, Hille B, Babcock DF. (2007). External Ca^{2+} acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol* 312:183–192.
- Carlson AE, Burnett LA, del Camino D, Quill TA, Hille B, Chong JA, Moran MM, Babcock DF. (2009). Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. *PLoS One.* 4:e6844.
- Catterall WA. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.*16:521-55.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. (2003). International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol.* 55:575-578.
- Cooper, T.G. (2007). Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J. Androl.* 9:533–539.
- Costello S, Michelangeli F, Nash K, Lefievre L, Morris J, Machado-Oliveira G, Barratt C, Kirkman-Brown J, Publicover S. (2009). Ca^{2+} -stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction.* 138:425-37.
- Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA, and Campbell KP. (2003). Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca^{2+} channels. *Science* 302: 1416-1418.
- Darszon A, Nishigaki T, Word C, Treviño CL, Felix R, and Beltran C. (2005). Calcium channels and Ca fluctuation in sperm physiology. *International Review of Cytology.* 243:70-172.

- 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. *Reproduc. Review.* 131:977-988.
- Darszon A, López-Martínez P, Acevedo JJ, Hernández-Cruz A, Treviño CL. (2006b). T-type Ca^{2+} channels in sperm function. *Cell Calcium.* 40:241-52.
- Darszon A, Treviño CL, Wood C, Galindo B, Rodríguez-Miranda E, Acevedo JJ, Hernandez-González EO, Beltrán C, Martínez-López P, Nishigaki T. (2007). Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl.*;65:229-44.
- Darszon A, Guerrero A, Galindo BE, Nishigaki T, Wood CD. (2008). Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *Int J Dev Biol.*52:595-606.
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Trevino CL. (2011). Calcium channels in the development, maturation and function of spermatozoa. *Physiol Rev.*
- De Blas GA, Darszon A, Ocampo A, Y, Serrano C J, Castellano LE, Hernández-González E O, Chirinos M, Larrea F, Beltrán. C, Treviño CL. (2009). TRPM8, a Versatile Channel in Human Sperm. *Plos One* 4:1-10.
- De Jonge C, Barratt CL. (2006). Gamete donation: a question of anonymity. *Fertil Steril.* 85:500-1.
- Eckert R. (1990). Fisiología Animal. Mecanismos y adaptaciones. Interamericana McGraw-Hill. 3^a ed. Pp.: 368-386.
- Eisenbach M. y Giojalas L.C. (2006). Sperm guidance in mammals: an unpaved road to the egg. *Nature.* Pp: 276-285.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 25:533-5.
- Escoffier J, Boisseau S, Serres C, Chen CC, Kim D, Stamboulian S, Shin HS, Campbell KP, De Waard M, and Arnoult C. (2007). Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of $\text{Ca}(\text{V})3.1$ and $\text{Ca}(\text{V})3.2$ channels in sperm cells: an evaluation from $\text{Ca}(\text{V})3.1$ and $\text{Ca}(\text{V})3.2$ deficient mice. *J Cell Physiol* 212: 753-763.
- Espinosa F, Darszon A. (1995). Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca^{2+} . *FEBS Lett.* 372:119-125.
- Espinosa F, Lopez-Gonzalez I, Munoz-Garay C, Felix R, De la Vega-Beltran JL, Kopf GS, Visconti PE, and Darszon A. (2000). Dual regulation of the T-type $\text{Ca}(2+)$ current by serum albumin and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells. *FEBS Lett* 475: 251-256.
- Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS. (1985). Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* 350:431-446.

- Feng B, Bhattacharya A, Yanagimachi R. (1988). Ca^{2+} is essential for the motility of plasma membrane-intact, but not of demembrated, hamster spermatozoa. *Andrologia*. 20:155-162.
- Foresta C, Rossato M, Di Virgilio F. (1993). Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. *Biochem J*. Aug 15:279-83.
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. (2008). Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol*. 52:473-80.
- Gartner PL y Hiatt LJ. (2002). Texto Atlas de Histología. McGraw-Hill. 2ª ed. Pp.: 463-483.
- Gilbert FS. (2006). Biología del desarrollo. Médica panamericana. 7ª ed. Cap7; 198-201. Cap.19; 671-673.
- Gomora JC, Enyeart JA, Enyeart JJ. (1999). Mibefradil potently blocks ATP-activated K^+ channels in adrenal cells. *Mol Pharmacol*. 56:1192-119.
- González-Martínez MT, Bonilla-Hernández MA, Guzman-Grenfell AM. (2002). Stimulation of voltage-dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm. *Archives in Biochemistry and Biophysics*. 408:205-210.
- González-Martínez MT. (2003). Induction of a sodium-dependent depolarization by external calcium removal in human sperm. *J Biol Chem* 278:36304-36310.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tiesen Y. (1985). A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem*. 260:3440-3450.
- Guzmán-Grenfell AM, Bonilla-Hernández MA, González-Martínez MT. (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.
- Hagiwara S, Kawa K. (1984). Calcium and potassium currents in spermatogenic cells dissociated from rat seminiferous tubules. *J Physiol*. 356:135-49.
- Hernández-González E, Treviño C, Castellano L, De la Vega-Beltrán J, Ocampo A, Wertheimer E, Visconti P, Darszon A. (2007). Involvement of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Mouse Sperm Capacitation. *the journal of biological chemistry*. 282:24397-24406.
- 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, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Harrison RA, y Gadella BM. (2005). Bicarbonate induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63: 342-51.

- Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, and Moss SB. (2005). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental cell* 9: 249-259.
- Ho HC, Suarez SS. (2001). An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca⁽²⁺⁾ store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol Reprod.* 65:1606-15.
- Hong CY, Chiang BN, Wei YH. (1983). Mitochondrial respiration inhibitors and human sperm motility: implication in the development of spermicides. *Br J Clin Pharmacol.* 16:487-90.
- Hoskins DD, 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 pres. 53-62.
- Jagannathan S, Publicover SJ, Barratt CL. (2002). Voltage-operated calcium channels in male germ cells. *Reproduction.* 123:203-15.
- Jagannathan S, Punt EL, Gu Y, Arnoult C, Sakkas D, Barratt CL, Publicover SJ. (2002b). 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.
- Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, Yan W. (2007). CatSper3 and CatSper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility. *Biol Reprod.* 77: 37–44.
- Jones R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fert Suppl.* 53:73-84.
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature.* 439:737-40.
- Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV, Sanjay A, Pilder SH, Salicioni AM, Visconti PE.(2010). Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem.* 285:7977-85.
- Luria A, Rubinstein S, Lax Y, and Breitbart H. (2002). Extracellular adenosine triphosphate stimulates acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa via P2 purinoceptor. *Biol Reprod* 66: 429- 437.
- Liévano A, Santi CM, Serrano CJ, Treviño CL, Bellvé AR, Hernández-Cruz A, Darszon A. (1996). T-type Ca²⁺ channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.* 388:150-4.
- Linares-Hernández L, Guzman-Grenfell AM, Hicks-Gómez JJ, González-Martínez MT. (1988). Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim Biophys Acta* 1372:1-12.
- Lindemann CB, Goltz JS. (1988). Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in triton X-100--extracted rat sperm. *Cell Motil Cytoskeleton.* 10:420-31.

- Lindemann CB, and Lesich KA. (2010). Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J. Cell Sci* 123: 519-528.
- Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. (2010). Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*. 140:327-37.
- Lishko PV, Kirichok Y. (2010). The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol*. 588:4667-72.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature- Lett*. 471. 387-91.
- Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, and Levin LR. (2003). Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem* 278: 15922-15926.
- Lopez-Gonzalez I, De La Vega-Beltran JL, Santi CM, Florman HM, Felix R, and Darszon A. (2001). Calmodulin antagonists inhibit T-type Ca(2+) currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction. *Dev Biol* 236: 210-219.
- Luria A, Rubinstein S, Lax Y, and Breitbart H. (2002). Extracellular adenosine triphosphate stimulates acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa via P2 purinoceptor. *Biol Reprod* 66: 429-437.
- Makler A, Makler-Shiran E, Stoller J, Lissak A, Abramovici H, Blumenfeld Z. (1992). Use of a sealed mini-chamber to investigate human sperm motility in real time under aerobic and anaerobic conditions. *Arch Androl*. 29:255-61.
- Marquez B, Suarez SS. (2004). Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biol Reprod*. 70:1626-33.
- Marquez B, Suarez SS. (2008). Soluble adenylyl cyclase is required for activation of sperm but does not have a direct effect on hyperactivation. *Reprod Fertil Dev*. 20:247-52.
- McNulty, MM., Hanck, DA. (2004). State-dependent mibefradil block of Na⁺ channels. *State. Mol Pharmacol*. 66:1652-1661.
- Mendoza C, Tesarik J. (1993). A plasma-membrane progesterone receptor in human sperm is switched on by increasing intracellular free calcium. *FEBS Lett*. 330:57-60.
- Mortimer ST. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*. 3:403-439.
- Mortimer ST. (2000). CASA--practical aspects. *J Androl*. 21:515-24.
- Nascimento JM, Shi LZ, Tam J, Chandsawangbhuwana C, Durrant B, Botvinick EL, Berns MW. (2008). Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. *J. Cell Physiol*. 217:745-51.

- Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE. (2007). KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci*. 104:7688-7692.
- Navarro B, Kirichok Y, Chung j, Clapham D. (2008). Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* 52:607-613.
- Neri-Vidaurre P, Torres-Flores V, Gonzalez-Martinez MT. (2006). A remarkable increase in the pH_i sensitivity of voltage-dependent calcium channels occurs in human sperm incubated in capacitating conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 343:105-9.
- Olamendi-Portugal T, Garcia BI, Lopez-Gonzalez I, Van Der Walt J, Dyason K, Ulens C, Tytgat J, Felix R, Darszon A, and Possani LD. (2002). Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 562-568.
- OMS. (2001). Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Edit. Médica Panamericana. 4^{ta} ed. España. 152 pp.
- Perez-Reyes E. (2010). G protein-mediated inhibition of Cav3.2 T-type channels revisited. *Mol Pharmacol* 77: 136-138.
- Pinto FM, Ravina CG, Fernández-Sánchez M, Gallardo-Castro M, Cejudo-Román A, Candenás L. (2009). Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channels in human sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 71:1-9.
- Publicover SJ, Barratt CL. (1999). Voltage-operated Ca²⁺ channels and the acrosome reaction: which channels are present and what do they do?. *Hum Reprod.* 14:873-9.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA y Clapham DE. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *PNAS.* 104:1219-1223.
- Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL. (2001). A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:12527-31.
- Randall AD. (1998). The molecular basis of voltage-gated Ca²⁺ channel diversity: is it time for T? *J Membr Biol.* 161:207-13.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 413:603-9.
- Ren D, Xia J. (2010). Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda).* 25:165-75.
- Reuter H. (1967). The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol.* 192:479-92.
- Sanchez G, Nguyen AN, Timmerberg B, Tash JS, Blanco G. (2006). The Na,K-ATPase α 4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. *Molecular Human Reproduction.* 12:565-576.

- Schmid A, Sutto Z, Nlend MC, Horvath G, Schmid N, Buck J, Levin LR, Conner GE, regien N, and Salathe M. (2007). Soluble adenylyl cyclase is localized to cilia and contributes to ciliary beat frequency regulation via production of cAMP. *J Gen Physiol* 130: 99-109.
- Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, Armesilla AL, Emerson M, Oceandy D, Knobloch KP, Neyses L. (2004). Plasma membrane Ca^{2+} ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem.* 279:28220-6.
- Santi CM, Darszon A, and Hernandez-Cruz A. (1996). A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am J Physiol* 271:C1583-1593.
- Suarez SS, Wolf DP, Meizel S. (1986) Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res.* 14, 107–121.
- Suarez SS, Pacey AA. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update.* 12:23-37.
- Suarez SS. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update.* 14: 647–657.
- Sullivan R, Frenette G, Girouard J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J andrology.* 9:483-491.
- Stamboulian S, Kim D, Shin HS, Ronjat M, de Waard M (2004). Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3.1 (alpha1G) calcium channel: CaV3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. *J Cell Physiol.* 200: 116–24
- Strunker T, Goodwin N, Breker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R and Kaupp. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature-Lett.* 471:382-6.
- Tang L, Obhrai MS, Macken A, Samra J. (1988). Seasonal distribution in conceptions by artificial insemination *BMJ.* 297:1611.
- Torres-Flores VM, García-Sánchez NL, González-Martínez MT. (2008) Intracellular sodium increase induced by external calcium removal in human sperm. *J of Androl.* 29:63-9.
- Torres-Flores V, Hernández-Rueda Y, Neri-Vidaurre, P, Jiménez-Trejo, F, Calderón-Salinas V, Molina-Guarneros J, González-Martínez MT. (2008b) Activation of Protein Kinase A stimulates the progesterone-induced calcium influx in human sperm exposed to the phosphodiesterase inhibitor papaverine. *J of Androl.* 29:549-57.
- 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.

- Turner RM. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*. 18:25-38.
- Waggoner AS. (1979). Dye indicators of membrane potential. *Annu Rev Biophys Bioeng*. 8:47-68.
- Wang D, Hu J, Bobulescu IA, Quill TA, McLeroy P, Moe OW, Garbers DL. (2007). A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *PNAS*. 104:9325–9330.
- WHO. (2010). 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.
- Xia J, Reigada D, Mitchell CH, Ren D. (2007). CATSPER Channel-Mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to head propagation. *Biology of Reproduction*. 77:551-559.
- Yanagimachi R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 2:371-2.
- Zeng Y, Clark EN, Florman HM. (1995). Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol*. 171:554-63.
- Zippin JH, Farrell J, Huron D, Kamenetsky M, Hess KC, Fischman DA, Levin LR, and Buck J. (2004). Bicarbonate-responsive "soluble" adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain. *J Cell Biol* 164: 527-534.

XI. ANEXOS

En el análisis de movimiento referido a la cabeza espermática los principales valores cinemáticos que se evalúan a partir de la trayectoria descrita por los espermatozoides se muestran en la siguiente tabla:

Parámetro	Unidad	Definición
Velocidad curvilínea (VCL)	μm/seg	Distancia que la cabeza del espermatozoide recorre en el periodo de la observación.
Velocidad Rectilínea (VSL)	μm/seg	Distancia en línea recta entre el primer y el último punto de la trayectoria.
Velocidad de la Trayectoria media (VAP)	μm/seg	Distancia que el espermatozoide ha viajado en la dirección del movimiento medio en el periodo de la observación.
Linealidad (LIN)	%	Indica la rectitud de la trayectoria curvilínea. $(VSL/VCL)*100\%$
Rectitud (STR)	%	Indica la rectitud de la trayectoria media. $(VSL / VAP)*100\%$
Amplitud de la dislocación lateral de la cabeza (ALH)	μm	Anchura del movimiento lateral de la cabeza del espermatozoide (Se calcula como la anchura total de la trayectoria principal).
Frecuencia del aleteo flagelar (BCF)	Hz	Indica el número de veces que la velocidad curvilínea cruza la trayectoria media

Anexo I. Principales valores cinemáticos aportados por el Sistema CASA para describir la trayectoria de un espermatozoide (Mortimer, 2000).

En el manual de laboratorio para el examen de semen humano y la interacción entre semen y moco cervical de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2001), se establecen los procedimientos y parámetros considerados como estándares en la evaluación del semen humano, los cuales podemos observar en la tabla II 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

Anexo II.- Parámetros establecidos por la OMS para la evaluación del semen humano (WHO, 2010)

Intracellular Sodium Increase Induced by External Calcium Removal in Human Sperm

VÍCTOR TORRES-FLORES, NORMA L. GARCÍA-SÁNCHEZ, AND MARCO T. GONZÁLEZ-MARTÍNEZ

From the Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F., México.

ABSTRACT: In human sperm, removal of external calcium produces a fast Na⁺-dependent depolarization that is presumably due to sodium permeation through calcium channels. Calcium restoration produces a ouabain-sensitive hyperpolarization that brings the membrane potential to values frequently more negative than resting. In this work, we show evidence indicating that external calcium removal induces an increase in the intracellular sodium ([Na⁺]_i) and that this phenomenon is related to the Na⁺-dependent depolarization. Calcium restoration blocked the [Na⁺]_i increase and then produced a slow decrease that was inhibited by ouabain. The [Na⁺]_i increase was inhibited by nanomolar–micromolar calcium or by

millimolar magnesium, which has been previously shown to inhibit the Na⁺-dependent depolarization. This evidence supports the hypothesis that, in zero-calcium medium, a calcium channel that would contribute to resting intracellular calcium levels allows sodium permeation, producing depolarization and a significant [Na⁺]_i increase. Sodium loading would stimulate the Na⁺,K⁺-ATPase, the activity of which contributes to the sperm hyperpolarization observed upon calcium restoration.

Key words: Membrane potential, intracellular calcium, SBFI, dISC₃(5).

J Androl 2008;29:63–69

In mammals, a successful fertilization requires that sperm accomplish specialized functions that involve intracellular calcium ([Ca²⁺]_i) changes. Indeed, processes such as the hyperactivation of motility, the so-called “capacitation” and the acrosome reaction (AR), require concerted changes in ion permeability leading to intracellular calcium increases (Darszon et al, 2005). In mouse sperm, it has been postulated that the AR induced by ZP3 involves the sequential activation of T-type voltage-dependent calcium channels (VDCCs) and store-operated calcium channels (Darszon et al, 2005). Likewise, a peculiar form of VDCC present in the sperm flagella, catsper, is required for the hyperactivation of motility (Ren et al, 2001; Carlson et al, 2003; Kirichok et al, 2006). Hence, it is evident that the molecular basis underlying sperm function requires a full comprehension of the ion transport system that sets and regulates [Ca²⁺]_i.

In mouse (Espinosa and Darszon, 1995) and human (Foresta et al, 1993; Guzmán-Grenfell et al, 2000) sperm, the studied species, calcium removal from the medium

depolarizes sperm. In human sperm, the depolarization is large, approximately 50 mV, and Na⁺ dependent; it is related to calcium removal at nanomolar–micromolar levels in the external medium, and it is always accompanied by a decrease in [Ca²⁺]_i. Despite the clear positive relationship between [Ca²⁺]_i decrease and Na⁺-dependent depolarization, evidence is strong that depolarization is not controlled by [Ca²⁺]_i; instead, calcium removal from a putative external site triggers it. Calcium restoration produces a rapid [Ca²⁺]_i transient increase that peaks above resting and then decreases to basal values (González-Martínez, 2003). Concomitantly, Na⁺-dependent depolarization is detained and hyperpolarization occurs, inhibited by ouabain or by the absence of potassium in the medium, suggesting that this hyperpolarization is produced by stimulated Na⁺,K⁺-ATPase activity (González-Martínez, 2003). This later effect of calcium occurs at the nanomolar–micromolar range and can be induced by magnesium in the millimolar range. Altogether, this evidence suggests that a putative calcium channel, which would contribute to resting [Ca²⁺]_i, would be able to conduct sodium in the absence of calcium in human sperm. A corollary of this hypothesis is that Na⁺-dependent depolarization would increase [Na⁺]_i so that, when calcium is restored and the depolarization stopped, the prevailing conductance would be set by Na⁺,K⁺-ATPase, the activity of which would be stimulated by the increased content of [Na⁺]_i, causing hyperpolarization.

In this context, we studied whether Na⁺-dependent depolarization affected [Na⁺]_i with the use of the sodium

Supported by the grants IN213105 (PAPIIT-DGAPA/UNAM, Mexico) and 49517 (CONACYT, Mexico).

Correspondence to: Marco T. González-Martínez, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, Apartado Postal 70-297 México, D.F., México (e-mail: tulio@servidor.unam.mx).

Received for publication May 22, 2007; accepted for publication July 30, 2007.

DOI: 10.2164/jandrol.107.003368

fluorescence probe SBFI. We provide evidence that approximately 50 mV Na⁺-dependent depolarization induced by external calcium removal produces a slow increase in [Na⁺]_i content and that this increase could support a high Na,K⁺-ATPase activity that hyperpolarizes the plasma membrane upon calcium restoration.

Methods

Materials and Media

The reagents used for media composition and Fura 2-AM were from Sigma Chemical Co (St Louis, Mo). SBFI-AM and diSC₃(5) were from Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, Calif). HEPES-buffered human sperm medium (HHSM) contained (mM, Suarez et al, 1986): 117.5 NaCl, 8.6 KCl, 2.5 CaCl₂, 0.49 MgCl₂, 0.3 NaH₂PO₄, 19 Na-lactate, 0.25 Na-pyruvate, 2.0 glucose, and 25 HEPES, adjusted to pH 7.6 with NaOH. The sodium content of this medium was modified, replacing NaCl by the same amount of cholineCl. The intracellular medium (ic-HHSM) in which SBFI calibrations were performed contained (mM) 120 KCl, 0.49 MgCl₂, 0.3 NaH₂PO₄, 0.2 Na-pyruvate, 25 HEPES, 2 glucose, and different amounts of NaCl (0.5–100.5). The ionic force was maintained with cholineCl so that [NaCl] + [cholineCl] was 100.5 mM. The pH was brought to 6.7 with TRIZMA base. Medium zero-Na ic-HHSM was prepared without NaH₂PO₄ and Na-pyruvate.

Sperm Isolation and Dye Loading

Human semen was obtained from a panel of eight 19–33-year-old healthy donors. For intracellular sodium recordings, we selected semen samples that yielded 1–2 × 10⁸ purified sperm. Sperm cells were isolated by percoll gradients as described (Suarez et al, 1986). The pellet was washed and resuspended in 1 mL HHSM containing 25 μM SBFI-AM (Molecular Probes) + 0.6% pluronic acid (Molecular Probes) and incubated for 90 min at 36°C, according to (Patrat et al 2000). In other experiments, sperm was loaded with 2 μM fura 2-AM (Sigma) as described in (González-Martínez, 2003). Once washed by centrifugation in the appropriate medium, the cells were used immediately for fluorescence recordings.

Detection and Calibration of Intracellular Sodium

Intracellular sodium was detected in SBFI-loaded sperm populations in a PTI spectrofluorometer (Photon Technology International, Birmingham, NJ). SBFI-loaded sperm (20–30 × 10⁶ cells) were added to 2.5 mL of the appropriate medium kept at 36°C and under constant magnetic stirring. The sample was

alternately excited at 340/380, and the fluorescence was detected with a visible long-wave pass filter of more than 495 nm (Andover Corp, Salem, NH) to optimize the signal to noise ratio. The 340/380 ratios were acquired and digitized at 0.83 Hz. A calibration curve was performed in ic-HHSM with different amounts of sodium (0.5–100.5 mM) and choline. Gramicidin was used to collapse the cationic gradients so that [Na⁺]_i nearly equaled external sodium. Hence, an approximately linear calibration curve in the range of 0–25 mM was achieved by comparing the ratios with the corresponding sodium concentrations. At [Na] > 50 mM, the ratios tended to saturate (Figure 1A). In this respect, the calibration data fitted the Hanes equation (Figure 1B), a linearized form of the Grynkiewicz equation (Diarra et al, 2001),

$$\frac{[\text{Na}^+]}{(R - R_{\min})} = \frac{\beta \text{Kd}}{(R_{\max} - R_{\min})} + \frac{[\text{Na}^+]}{(R_{\max} - R_{\min})} \quad (1)$$

where R is the fluorescence ratio excited at 340 and 380 nm (340/380), R_{\min} is the R value experimentally determined in zero-sodium ic-HHSM (1.03 ± 0.002 , $n = 4$, SE), R_{\max} is the R value found at saturating sodium obtained from the slope of the curve ($1/(R_{\max} - R_{\min})$), and β is the fluorescence ratio excited at 380 nm, both in the absence and in the presence of saturating sodium ($\beta = 1.6 \pm 0.02$, $n = 4$, SE). The slope and intercept ($\beta \text{Kd}/(R_{\max} - R_{\min})$) of the curve were 1.43 ± 0.12 and 21.07 ± 0.88 ($n = 4$, SE), respectively. Given these values, the apparent dissociation constant of intracellular SBFI for intracellular sodium (Kd) in human sperm was 9.45 ± 0.70 mM ($n = 4$, SE), a value lower than that obtained in hippocampal neurons (15.7 mM) by Diarra et al (2001). Kd, R_{\max} , R_{\min} , and β were used to calibrate the R values in the Grynkiewicz equation (Diarra et al, 2001).

Detection and Calibration of [Ca²⁺]_i and Membrane Potential

The [Ca²⁺]_i and membrane potential were detected and calibrated in sperm populations, in some cases simultaneously, with fura 2 (excitation [exc] 340/380, emission [em] 488) and with diSC₃(5) (exc 600, em 670) as described in González-Martínez, 2003.

Procedure to Remove Calcium From the Medium

Calcium was removed from the medium by the calcium chelator ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), as described in (González-Martínez, 2003). A stock solution containing 500 mM EGTA in 2 N NaOH was used. In this condition, calcium chelation with 3.5 mM EGTA did not modify the pH of the medium. The calcium

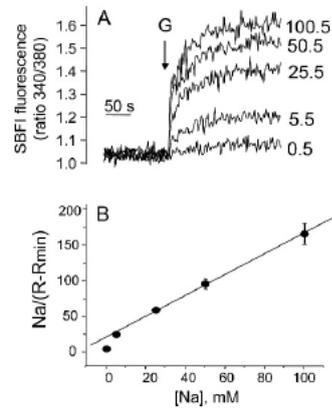


Figure 1. Detection and calibration of intracellular sodium ($[Na^+]_i$) in SBF-loaded human sperm. A pellet with approximately 2×10^7 SBF-loaded sperm was added to the fluorescence cell containing 2.5 mL of intracellular HEPES-buffered human sperm medium (ic-HHSM) + different amounts of NaCl and cholineCl. The cell was kept at 36°C and under constant magnetic stirring. (A) Effect of gramicidin (1 μ M) on the time course of 340/380 ratio fluorescence detected at more than 490 nm. The external sodium concentration (mM) is indicated at the right of the traces. (B) Hanes plot ($[Na^+]_i/(R - R_{min})$) vs $[Na^+]_o$. The R values at each $[Na^+]_o$ (in the presence of gramicidin) were obtained from the traces. The continuous line corresponds to the equation $[Na^+]_i/(R - 1.03) = 20.5 \text{ mM} + 1.42[Na^+]_o$. The constants were used to calculate K_d by the Hanes equation (Equation 1), as described in Methods. ($n = 4$ individuals, $\bar{x} \pm SE$).

concentration calculator program MaxChelator (V2.1), written by Chris Patton from Stanford University (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) was used to estimate the calcium and magnesium concentrations in HHSM medium containing EGTA.

Results

We have previously shown that external calcium removal with EGTA produces depolarization that depends on the external sodium content. We investigated whether the Na^+ -dependent depolarization reflected changes in $[Na^+]_i$. Figure 2 shows that the depolarization induced by external calcium removal with 3.5 mM EGTA, from 2.5 mM to 70 nM, was accompanied by a slow but consistently large increase in $[Na^+]_i$ that depended on the external sodium content. In HHSM medium (normal sodium content), the $[Na^+]_i$ content increased from resting 2.9 ± 0.3 mM to 28.3 ± 2.3 mM in 3 minutes (media \pm SE, $n = 7$). The $[Na^+]_i$ increase reached nearly steady values close to 45 mM in about 4 more minutes (not shown). Calcium restoration, which produces a transient peak of calcium and a Na^+, K^+ -ATPase-dependent hyperpolarization (González-Martí-

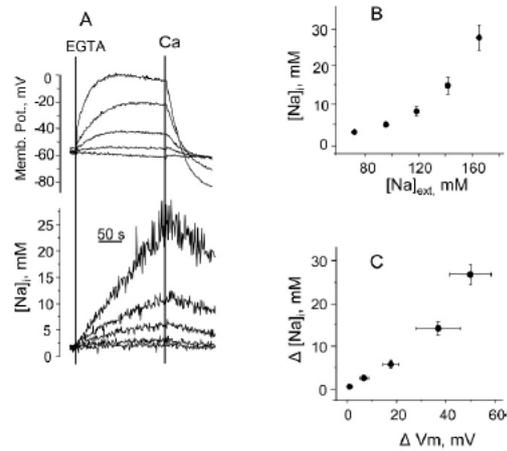


Figure 2. Intracellular sodium increase induced by calcium removal as a function of external sodium. SBF-loaded sperm were poured into the fluorescence cells containing different sodium content. The final external sodium concentration, which includes the amount added during ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)-NaOH addition, is indicated in the abscissa of the curve (lower panel). (A) Representative traces of membrane potential (V_m) and intracellular sodium ($[Na^+]_i$) changes induced by 3.5 mM EGTA and subsequently by 3.5 mM $CaCl_2$ (Ca) additions. (B) $[Na^+]_i$ obtained 3 minutes after EGTA addition, as a function of external sodium ($[Na^+]_{ext}$). (C) $[Na^+]_i$ increase ($[Na^+]_i$ obtained 3 minutes after EGTA addition minus resting $[Na^+]_i$) as a function of the extent of membrane potential depolarization (V_m obtained 3 minutes after EGTA addition minus resting V_m ; $n = 5$ individuals, $\bar{x} \pm SE$).

nez, 2003), blocked the sodium influx and then produced a slow and small decrease in $[Na^+]_i$ (Figure 2A). The effect of external sodium on $[Na^+]_i$ did not reach saturation at the range of external sodium studied (Figure 2B). Both the extent of the Na^+ -dependent depolarization (González-Martínez, 2003) and the $[Na^+]_i$ increase induced by calcium removal similarly depended on the external sodium concentration, indicating that both phenomena were related (Figure 2C). Interestingly, the sodium increase was inhibited at 70 mM external sodium (Figure 2A), a concentration that still favors sodium entry, as supported by the gramicidin-induced sodium influx in this condition (trace not shown).

In previous work, we showed that in calcium removal-induced depolarized sperm, calcium restoration or magnesium addition produce a Na^+, K^+ -ATPase-dependent hyperpolarization (González-Martínez, 2003). As shown in Figure 3 (left panel, traces b and c), the $[Na^+]_i$ increase induced by calcium removal was blocked and then tended to reverse with the addition of calcium at concentrations $\geq 1 \mu$ M (1 μ M and 2.5 mM). These amounts of calcium also produced calcium influx and

hyperpolarization (Figure 3, left panel). As for magnesium, the addition of 1.5 and 2.5 mM MgCl_2 , which increases the external $[\text{Mg}^{2+}]$ to 1.99 and 2.99 mM, respectively (because HHSM contains 0.49 mM MgCl_2), blocked the sodium influx and subsequently produced a slight decrease in $[\text{Na}^+]_i$ (Figure 3, right panel, traces f and g). The effect of magnesium was not related to calcium release from EGTA because, according to the Maxchelator program (see Methods), the highest magnesium concentration used in this study (2.99 mM) barely increased the external free calcium, from 70 (in normal HHSM + 3.5 mM EGTA) to 120 nM. Consistently, as previously reported (González-Martínez, 2003), no effects were observed in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and a complete hyperpolarization was produced. The addition of 0.25 mM MgCl_2 (trace e) inhibited but did not reverse the $[\text{Na}^+]_i$ increase, an effect that correlated with a partial induction of the hyperpolarization, suggesting that a fraction of the sperm population could stop the Na^+ -dependent depolarization. These effects were also observed when magnesium was added before EGTA; that is, the same amounts of magnesium similarly blocked the $[\text{Na}^+]_i$ increase induced by EGTA (traces not shown).

Because the hyperpolarization induced by calcium restoration or magnesium addition is sensitive to ouabain (González-Martínez, 2003), we studied the effect of this inhibitor on $[\text{Na}^+]_i$ changes. In HHSM medium containing 142 mM sodium (including EGTA-NaOH), the calcium removal-induced $[\text{Na}^+]_i$ increase was remarkably enhanced by ouabain, and as expected for an extrusion mechanism involving the Na^+, K^+ -ATPase, calcium restoration did not tend to reverse it (Figure 4A). It should be noted that ouabain barely affects that Na^+ -dependent depolarization induced by calcium removal (González-Martínez, 2003), indicating that the observed enhanced increase in $[\text{Na}^+]_i$ was not related to an increase in sodium influx but to the inhibitory action on the Na^+, K^+ -ATPase. Likewise, as expected, magnesium did not induce $[\text{Na}^+]_i$ decrease in calcium removal-induced depolarized sperm treated with ouabain (Figure 4B). These results indicated that the sodium increase induced by calcium removal resulted from a balance between sodium influx produced by the gating of the putative channel and sodium extrusion, activated by the increase in $[\text{Na}^+]_i$, catalyzed by the Na^+, K^+ -ATPase.

Discussion

In this work, we show evidence that the Na^+ -dependent depolarization induced by calcium removal produces $[\text{Na}^+]_i$ increase. This hypothesis is strongly supported by 1) the correlation of the extent of $[\text{Na}^+]_i$ increase with the

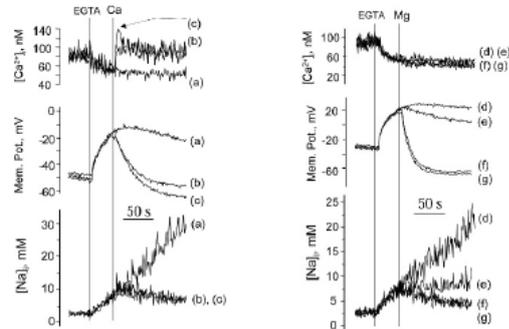


Figure 3. Effect of calcium and magnesium on the intracellular sodium ($[\text{Na}^+]_i$) influx induced by calcium removal with ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) in SBFI-loaded human sperm. Calcium was removed from the medium with 3.5 mM EGTA, and 40 seconds later, appropriate amounts of either calcium (left panel) or magnesium (right panel) were brought to different external concentrations. A sample of the same semen was also loaded with fura 2 to compare the effects with intracellular calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and membrane potential (detected simultaneously). Left panel: Effect of calcium addition. The amounts of free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reached in the presence of 3.5 mM EGTA are indicated in parentheses: (a) no addition (70 nM), (b) 0.92 mM (1 μM), and (c) 3.5 mM (2.5 mM). Right panel: Effect of magnesium addition. The amount of free magnesium (0.49 mM of the HHSM plus the amounts added, in the presence of 3.5 mM EGTA) are indicated in parentheses: (d) no addition (0.37 mM), (e) 0.25 mM (0.56 mM), (f) 1.5 mM (1.61 mM), and (g) 2.5 mM (2.99 mM). The free divalent cations in the presence of EGTA were calculated by the Maxchelator (V2.1) program (see Methods). The traces are representatives of sperm samples obtained from 5 individuals.

extent Na^+ -dependent depolarization and 2) the blocking of an increase in $[\text{Na}^+]_i$ by calcium and magnesium at micromolar and millimolar concentrations, respectively, which are conditions that also block the Na^+ -dependent depolarization and then cause a Na^+, K^+ -ATPase-dependent hyperpolarization (González-Martínez, 2003). Furthermore, the enhancing effect of ouabain, which blocks Na^+, K^+ -ATPase, on the $[\text{Na}^+]_i$ increase induced by calcium removal and its blocking effect on the $[\text{Na}^+]_i$ decrease produced by calcium restoration or magnesium addition, indicates that the pump is rapidly activated as a consequence of the $[\text{Na}^+]_i$ increase.

Interestingly, the $[\text{Na}^+]_i$ increase induced by calcium removal is blocked in HHSM medium still containing 70 mM NaCl (Figure 2), an effect that is related to blocking of the Na^+ -dependent depolarization induced under the same conditions (González-Martínez, 2003). Evidently, the sodium gradient still favors sodium entry at 70 mM external sodium, as supported by a fast sodium influx induced by gramicidin in this condition. Given that the Na^+ -dependent depolarization does not reach the Nernst potential for sodium distribution (E_{Na}), the lack of depolarization might reasonably

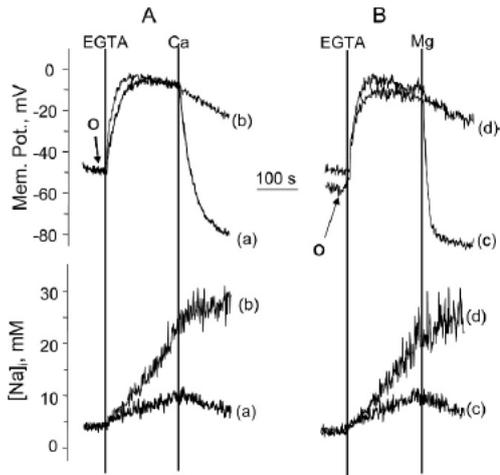


Figure 4. Effect of inhibition of the Na^+, K^+ -ATPase on calcium removal-induced sodium influx in human sperm. SBF1-loaded human sperm was poured in HEPES-buffered human sperm medium containing 128 mM sodium, and sodium influx was induced by calcium removal with 3.5 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA; total amount of sodium was 142 mM including EGTA-NaOH). Membrane potential (V_m) was recorded in sperm obtained from the same batch under identical conditions. Three minutes after EGTA, either 3.5 mM CaCl_2 (Ca) (that restores to 2.5 mM) (panel A) or 2.5 mM MgCl_2 (Mg) (panel B) were added as indicated. (a, c) control traces, (b, d) ouabain (O) was added 15 s before EGTA. Traces are representative of sperm samples obtained from 5 individuals.

result from a contribution of potassium exiting through the same, or other, channels (González-Martínez, 2003). In this regard, at different external sodium concentrations, the depolarization induced by calcium removal reaches a constant value in about 1 minute, whereas that the $[\text{Na}^+]_i$ steadily increases for 3 minutes, suggesting that the sodium influx through the channel is perhaps opposed by potassium efflux. Thus, in medium containing 70 mM sodium, an $[\text{Na}^+]_i$ increase should have been detected. The lack of effect in low-sodium HHSM medium suggests that, besides the effect of gradient, external sodium could affect the opening of the channel. It should be additionally noted that in ic-HHSM, which has no calcium added, the $[\text{Na}^+]_i$ was unaffected in the range of external 0.5–100.5 mM sodium (Figure 1A). It is possible that contaminant calcium, the acidic pH of the medium (pH 6.7), or both prevented sodium influx. The effect of pH on the phenomena described here remains to be studied.

The results presented here are consistent with the hypothesis that, in resting conditions, there is a calcium channel the activity of which contributes to the resting

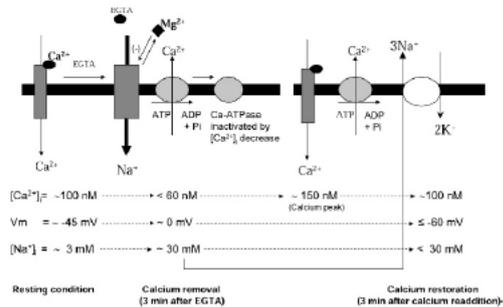


Figure 5. Hypothetical scheme of the ion transport systems activated by external calcium removal and by the subsequent calcium restoration in human sperm. The activation of these systems would lead to the indicated changes in intracellular calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), intracellular sodium ($[\text{Na}^+]_i$), and membrane potential (V_m) (see Discussion).

intracellular calcium (González-Martínez, 2003). As schematized in Figure 5, the calcium selectivity of this channel would be conferred by the binding of calcium at an external site with a K_d in the hundreds of nanomolar units of micromolar range, a site that could be occupied by magnesium with a K_d in the millimolar range. Therefore, when calcium is removed from this site, the selectivity would be shifted to the large-conductance sodium channel. This would result in the observed depolarization from approximately -45 mV to values close to 0 mV (González-Martínez, 2003), the observed $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decrease, because of the calcium-extruding activity present in the cell (reasonably the Ca^{2+} -ATPase) and the observed increase in $[\text{Na}^+]_i$ from approximately 3 mM to values close to 30 mM (this work). In this condition, the Na^+, K^+ -ATPase would be rapidly activated by the increase in $[\text{Na}^+]_i$ to oppose massive sodium entry. Upon external calcium restoration, the channel would recover its selectivity to a low-conductance calcium channel, producing a peak of calcium, and then a reactivation of the Ca^{2+} -ATPase, bringing the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels to normal values. Consequently, the membrane potential would become mainly dependent on the highly active electrogenic Na^+, K^+ -ATPase hyperpolarizing the cell. Accordingly, the $[\text{Na}^+]_i$ would tend to decrease to resting values, although at a much slower rate than the hyperpolarization (this work). This finding suggests that the sustained hyperpolarization, which reaches values more negative than resting and frequently even more negative to the Nernst potential for potassium distribution (E_k) (González-Martínez, 2003), is supported by the enhanced $[\text{Na}^+]_i$. Interestingly, in a glucose-deprived medium, glucose induces a ouabain-sensitive hyperpolarization (Guzmán-Gren-

fell et al, 2000), indicating a relevant role of the enzyme in setting the membrane potential in human sperm subjected to these particular stressing conditions.

Patch clamp recordings performed with mouse sperm in cytoplasmic droplets show that the sperm flagellum contains an alkaline-activated, weakly voltage dependent calcium-selective channel named catsper (Kirichok et al, 2006). Sperm lacking this channel, which actually consists of 4 heterotetramers (catsper1–4; Jin et al, 2007; Qi et al, 2007) are unable to hyperactivate their motility; as a consequence, males are infertile (Ren et al, 2001; Carlson et al, 2003). In the absence of external calcium, these channels conduct sodium in a voltage-independent manner (Kirichok et al, 2006). In this regard, it is reasonable to assume that the Na^+ -dependent depolarization induced by external calcium removal and the $[\text{Na}^+]_i$ increase reported here might be due to catsper opening in zero-calcium medium (Kirichok et al, 2006). Consequently, this channel (catsper) would contribute to set the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$. It is interesting to note that catsper null sperm incubated in the absence of external calcium maintain initial motility, whereas the wild-type sperm become motionless (Jin et al, 2007). This finding implies that internal calcium stores play a role in supplying calcium for sperm motility in zero-calcium medium and, according to the results presented here, it raises the possibility that an increase in intracellular sodium, a membrane potential depolarization (Espinosa and Darszon, 1995; González-Martínez, 2003), or both might inhibit calcium release from internal stores in wild-type sperm.

On the other hand, T-type VDCC detected in mouse (Arnoult et al, 1996; Santi et al, 1996) and man (Jagannathan et al, 2002) spermatocytes, which in GH3 pituitary cells also permit sodium permeation in the absence of external calcium (Suarez-Kurtz et al, 1987), have been immune detected in mature sperm of both species (Treviño et al, 2004). Thus, these channels could also be involved in the responses discussed here. The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ has also been involved in setting the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in human sperm (Kraznai et al, 2006). In other cells, such as smooth muscle, there is evidence that VDCC and store-operated calcium channels, which also allow sodium permeation in the absence of external calcium (Minke and Cook, 2002), could contribute to resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Montano and Bazan-Perkins, 2005).

Acknowledgments

This work was supported by grant IN213105 from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México

(UNAM) and by grant 49517 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

References

- Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:13004–13009.
- Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF. CatSper1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:14864–14868.
- Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Trevino CL, Felix R, Beltran C. Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol*. 2005;243:79–172.
- Diarrá A, Sheldon C, Church J. In situ calibration and H^+ sensitivity of the fluorescent Na^+ indicator SBF. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C1623–C1633.
- Espinosa F, Darszon A. Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca^{2+} . *FEBS Lett*. 1995;372:119–125.
- Foresta C, Rossato M, DiVirgilio F. Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. *Biochem J*. 1993;294:279–283.
- González-Martínez MT. Induction of a sodium-dependent depolarization by external calcium removal in human sperm. *J Biol Chem*. 2003;278:36304–36310.
- Guzmán-Grenfell AM, Bonilla-Hernández MA, González-Martínez MT. 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*. 2000;1464:188–198.
- Jagannathan S, Punt EL, Gu Y, Arnoult C, Sakkas D, Barratt CL, Publicover SJ. Identification and localization of T-type voltage-operated calcium channel subunits in human male germ cells. Expression of multiple isoforms. *J Biol Chem*. 2002;277:8449–8456.
- Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, Yan W. Catsper3 and catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility. *Biol Reprod*. 2007;77:37–44.
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature*. 2006;439:737–740.
- Kraznai Z, Kraznai ZT, Morisawa M, Bazsáné ZK, Henádi Z, Fazekas Z, Trón L, Goda K, Márián T. Role of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in calcium homeostasis and human sperm motility regulation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2006;63:66–76.
- Minke B, Cook B. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev*. 2002;82:429–472.
- Montano LM, Bazan-Perkins B. Resting calcium influx in airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005;83:717–722.
- Patrat C, Serres C, Jouannet P. Induction of a sodium ion influx by progesterone in human spermatozoa. *Biol Reprod*. 2000;62:1380–1386.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA, Clapham DE. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:1219–1223.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. 2001;413:603–609.
- Santi CM, Darszon A, Hernandez-Cruz A. A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am J Physiol*. 1996;271:C1583–C1593.

- Suarez SS, Wolf DP, Meizel S. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res.* 1986;14:107-121.
- Suarez-Kurtz G, Katz GM, Reuben JP. Currents carried by sodium ions through transient calcium channels in clonal GH3 pituitary cells. *Pflugers Arch.* 1987;410:345-347.
- Trevino CL, Felix R, Castellano LE, Gutierrez C, Rodriguez D, Pacheco J, Lopez-Gonzalez I, Gomora J, Tsutsumi V, Hernandez-Cruz A, Fiordeliso T, Scaling AL, Darszon A. Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca^{2+} channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett.* 2004;563:87-92.