



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Participación del canal CatSper en el incremento de calcio intracelular inducido por PGE₁ y progesterona en espermatozoides humanos.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Yadira Libertad Hernández Rueda

TUTOR: DR. Takuya Nishigaki Shimizu

COMITÉ TUTOR: DR. Roberto Muñoz Garay

DRA. María Elena Ayala Escobar



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/566/11

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 8 de agosto de 2011 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del (la) alumno (a) HERNÁNDEZ RUEDA YADIRA LIBERTAD con número de cuenta 99143457 con la tesis titulada "Participación del canal CatSper en el incremento de calcio intracelular inducido por PGE₁ y progesterona en espermatozoides humanos.", realizada bajo la dirección del (la) DR. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU:

Presidente: DRA. MARIA ELENA AYALA ESCOBAR
Vocal: DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ
Secretario: DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
Suplente: DR. ROBERTO MUÑOZ GARAY
Suplente: DR. VÍCTOR MANUEL TORRES FLORES

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de octubre de 2011

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



FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO

MCAA/MJFM/ASR/ mnm

AGRADECIMIENTOS

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

La presente investigación se realizó gracias al Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT) en el proyecto titulado “Efectos de progesterona y prostaglandina E₁ en la movilidad del espermatozoide de mamífero” (IN221110).

Agradezco a los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu.

Dr. Roberto Muñoz Garay.

Dra. María Elena Ayala Escobar.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del **Dr. Takuya Nishigaki Shimizu** y el **Dr. Víctor Manuel Torres Flores**. En el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología y en el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias, por hacerme sentir parte de algo sabio, bello y grande. Por la formación adquirida a lo largo de toda mi estancia en mi máxima casa de estudios UNAM. Porque es todo un orgullo ser y formar parte de la UNAM.

A la memoria del **Dr. Marco Tulio González Martínez** por iniciarme en el maravilloso mundo de la fisiología del espermatozoide. Mil gracias dondequiera que se encuentre...

Quiero agradecer en especial al **Dr. Alberto Darszon Israel** por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo, por compartir sus conocimientos. Mil gracias.

Gracias al **Dr. Takuya Nishigaki Shimizu**, por la dirección de esta tesis, así como por su estímulo y sobre todo la confianza depositada en mí, por su incalculable apoyo, profesionalismo y consejos, poniendo a mi alcance los medios necesarios para llevar a cabo este trabajo de investigación, y por permitirme formar parte de su equipo. Mil gracias por todo el conocimiento transmitido.

Agradezco a los miembros del jurado:

A la **Dra. Ma. Elena Ayala Escobar** por sus ideas, sugerencias, ayuda, apoyo y disponibilidad, así como por todos los conocimientos transmitidos y por la atención proporcionada para la realización y revisión de esta tesis.

Al **Dr. Ignacio López González** y al **Dr. Arturo Hernández Cruz**, por sus atenciones, valiosas sugerencias, orientación y apoyo. Por formar parte de mi jurado, por la evaluación de este trabajo e inigualable experiencia.

Al **Dr. Roberto Muñoz Garay** por sus ideas, consejos, orientaciones profesionales, supervisión y por todos los conocimientos transmitidos, así como por sus sugerencias y aportaciones, que facilitaron la realización de este trabajo.

Al **Dr. Víctor Manuel Torres Flores** por la colaboración y participación a lo largo de todo este proyecto de investigación, facilitando el acceso al equipo e instalaciones del Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM. Por todo el material proporcionado, por sus ideas, sugerencias, ayuda y apoyo, pero sobre todo por el tiempo brindado, su entera disponibilidad y paciencia, que me ayudaron a que este trabajo se concluyera.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, quienes de una u otra forma hicieron posible esta investigación, por su cooperación y ayuda tanto profesional como personal, gracias a todos.

A la laboratorista Araceli del Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina por su apoyo en el trabajo de laboratorio, así como por su buen humor.

A los donadores por haber proporcionado amablemente el material biológico.

DEDICATORIA

"Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas."

Santiago Ramón y Cajal.

"La sabiduría consiste muchas veces en cambiar una cosa por la otra."

Amado Nervo.

"Vive como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a vivir siempre."

Mahatma Gandhi.

Dedicó este trabajo con gratitud y cariño a mis padres Marco A. Hernández González y Leticia Rueda Ramos, y a mi hermana Leticia Gwendoline.

Por ser: mi fuente de inspiración, los pilares más importantes de mi vida, los seres que más amo, pero sobre todo por ser y estar, en todo momento.

A mis sobrinos Dulce y Marco (los yayos) por su compañía, amor, paciencia y formar parte imprescindible de mi vida, porque sin ustedes, esto no sería lo mismo, los amo.

A mí cuñada Catalina por sus consejos y compañía muy singular.

A mis amigos Alma Martínez, Gabriela Pérez, Jonathan Álvarez, Anuar López, Emma Cancino, Esmeralda Pérez, Ivonne Mar, Dafne Vaca, Rosalinda, Celia S., Katia, Laura, Hugo, Rodrigo, Eric H., David y Luis, mis entrañables amigos, quienes de forma incondicional me han prestado su amistad, apoyo en los momentos difíciles, por ser mis consejeros y siempre encontrar soluciones a mis apuros. Deseando que continuemos compartiendo nuestros tiempos, sueños y espacios. Mil gracias.

¡Nos vemos en el futuro!

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1.-Estructura del espermatozoide.....	4
1.2.-Maduración del espermatozoide.....	6
1.2.1.-Maduración en el epidídimo.....	7
1.2.2.-Maduración en el tracto genital femenino.....	9
➤ Movilidad espermática.....	10
➤ Capacitación espermática.....	14
➤ Reacción acrosomal.....	15
II. ANTECEDENTES.....	17
2.1.-El calcio en el espermatozoide humano.....	18
2.1.1.-Canal catiónico específico del espermatozoide (CatSper).....	19
2.2.-Efecto de la progesterona en el espermatozoide humano.....	22
2.3.-Efecto de las prostaglandinas en el espermatozoide humano.....	24
III. JUSTIFICACIÓN.....	28
IV. HIPÓTESIS.....	29
V. OBJETIVO.....	30

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1.-Material y medios.....	31
6.2.-Purificación de los espermatozoides.....	31
6.3.-Carga con Fura-2, AM para la determinación de calcio intracelular en el espermatozoide de humano.....	31
6.4. -Medición de la $[Ca^{2+}]_i$	32
6.4.1.-Calibración de la $[Ca^{2+}]_i$	33
6.5.-Carga con BCECF-AM y determinación de pH_i	34
6.6.-Cargado del detector de sodio SBFI-AM.....	35
6.6.1.-Calibración de la $[Na^+]_i$	36
6.7.- Ensayos experimentales.....	36
6.7.1.-Curva dosis-respuesta de prostaglandinas tipo E_1	36
6.7.2.-Curva dosis-respuesta de mibefradil.....	38
6.7.3.-Efecto de PGE_1 y mibefradil en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en medio MEH a diferentes pH_s	39
6.7.4.-Protocolo para la determinación del efecto de progesterona, PGE_1 y mibefradil sobre el pH_i	40
6.7.5.-Protocolo para la determinación del efecto de progesterona, PGE_1 y mibefradil sobre la $[Na^+]_i$	41
6.8.-Análisis estadístico.....	41
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
7.1.- Efecto de PGE_1 en espermatozoides de humano.....	42
7.2.-Efecto de mibefradil sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con PGE_1 y	

progesterona.....	44
7.3.- Efecto de la adición de diferentes concentraciones de mibefradil sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con PGE_1 o progesterona.....	46
7.4.-Incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con PGE_1 y progesterona en espermatozoides de humano incubados en medio MEH ajustado a diferentes pHs, así como, el efecto de mibefradil sobre este incremento.....	48
7.5.-Efecto de mibefradil, PGE_1 y progesterona sobre el pH_i en espermatozoides de humano.....	51
7.6.-Efecto de PGE_1 , progesterona y mibefradil sobre la $[Na^+]_i$ en espermatozoides de humano.....	52
7.7.- Comparación de este trabajo con reportes recientes.....	54
VIII. CONCLUSIONES.....	56
IX. PERSPECTIVAS.....	57
X. ANEXOS.....	58
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS

Figura 1.....	5
Esquema de la morfología del espermatozoide humano.	
Figura 2.....	7
Diagrama del órgano reproductor masculino, formación de los espermatozoides de mamíferos y procesos asociados.	
Figura 3.....	10
Diagrama del sistema reproductor femenino.	
Figura 4.....	11
Tipos de movilidad.	
Figura 5.....	13
Flujos de iones durante la hiperactivación y la capacitación en los espermatozoides de mamífero.	
Figura 6.....	18
Esquema simplificado de la variedad de canales iónicos en el espermatozoide de humano.	
Figura 7.....	20
Estructura de los canales catiónicos espermáticos (CatSper).	
Figura 8.....	25
Estructura química de la progesterona y de la PGE₁.	
Figura 9.....	26
Efecto de la prostaglandina E₁ y la progesterona en el incremento en la [Ca²⁺]_i y en la RA.	
Figura 10.....	32

Representación esquemática del sistema óptico para la medición de la $[Ca^{2+}]_i$.	
Figura 11.....	33
Calibración para la $[Ca^{2+}]_i$.	
Figura 12.....	35
Calibración de la señal de pH_i.	
Figura 13.....	36
Calibración de la señal de sodio.	
Figura 14.....	43
Efecto de las prostaglandinas tipo E_1 en espermatozoides de humano.	
Figura 15.....	45
Efecto de mibefradil (M) sobre el incremento de Ca^{2+} intracelular inducido con PGE_1 y progesterona (P) en espermatozoides de humano.	
Figura 16.....	47
Curva dosis-respuesta de mibefradil en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con PGE_1 o progesterona (P) en espermatozoides de humano.	
Figura 17.....	50
Incremento de Ca^{2+} inducido con PGE_1 o progesterona (P) y su respectiva inhibición con mibefradil (M) en espermatozoides de humano incubados en MEH ajustado a diferentes pHs.	
Figura 18.....	51
Efecto de mibefradil, PGE_1 y progesterona sobre el pH_i en espermatozoides de humano incubados en MEH ajustado a diferentes pHs.	
Figura 19.....	53

Efecto de mibefradil, PGE₁ y progesterona sobre la [Na⁺]_i en espermatozoides de humano al eliminar el calcio externo.

Figura 20..... 62

Curva dosis-respuesta de prostaglandinas tipo E₁ en espermatozoides de humano.

Tabla 1..... 37

Tratamientos y protocolo del registro de fluorescencia para la curva dosis-respuesta de PGE₁.

Tabla 2..... 38

Tratamientos y protocolo del registro de fluorescencia aplicada para la curva dosis-respuesta de mibefradil.

Tabla 3..... 39

Tratamientos para la determinación de la [Ca²⁺]_i a diferentes pHs.

Tabla 4..... 40

Tratamientos y protocolo del registro de fluorescencia aplicada para la determinación de pH_i.

Tabla 5..... 41

Tratamientos y protocolo del registro de fluorescencia para la determinación de la [Na⁺]_i.

Anexo A..... 58

Espermatobioscopias de los donadores.

Anexo B..... 59

Tablas de ANOVA y pruebas estadísticas.

Anexo C..... 62

Curva dosis-respuesta de PGE₁ en espermatozoides de humano incubados con fluo-3,AM.

LISTA DE ABREVIATURAS

$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentración del ión Ca^{2+} intracelular
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$	Influjo del ión calcio (calcio intracelular en el pico menos el calcio intracelular basal)
$[\text{HCO}_3^-]_i$	Concentración de bicarbonato intracelular
$[\text{Na}^+]_i$	Concentración del ión sodio intracelular
λ	Longitud de onda
ACs	Adenilato ciclasa soluble
AKAPs	Proteínas de anclaje de la cinasa A
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPc/PKA	Proteína cinasa A dependiente de AMPc
ATP	Adenosín trifosfato
BCECF-AM	Carboxietil-carboxifluoresceína acetoxi-metilado
Ca^{2+}	Ión calcio
CatSper	Canales catiónicos específicos del espermatozoide
Ca_v	Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje
COX	Enzimas ciclooxigenasas
EGTA	Acido etilén glicol tetraacético
ES	Error estándar
FD	Factores descapacitantes
FMP	<i>Forward Motility Protein</i>
Fura-2 AM	Acetoximetil éster de Fura-2
GABA	Receptores ácido gamma-aminobutírico
Gd^{3+}	Ión gadolinio
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GNC	Canales modulados por nucleótidos cíclicos

HCO₃⁻	Bicarbonato
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IP₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
IP₃R	Receptores al IP ₃
I_{CatSper}	Corriente de CatSper
La³⁺	Ión lantano
M	Mibefradil
MEH	Medio para espermatozoides humanos
Na_v	Canales de sodio dependientes de voltaje
NBC	intercambiador Na ⁺ /HCO ₃ ⁻
sNHE	Na ⁺ /H ⁺
P	Progesterona
PDE	Fosfodiesterasa
pH_i	pH intracelular
PLC	Fosfolipasa C
PG	Prostaglandina
PGE₁	Prostaglandina E ₁
PKA	Proteína cinasa A
PMCA4	ATPasa de calcio de la membrana plasmática
PTI	Tecnología de Fotón Internacional
PTK	Proteína Tirosin-cinasa
RA	Reacción acrosomal
RIC	Reservas intracelulares de Ca ²⁺
RyRs	Receptores a rianodina
s	Segundos
SBFI-AM	“Sodium-binding benzofuran isophthalate-AM”

sNHE	Intercambiador Na^+/H^+
SOC	Canales activados por pozas internas
SPCA1	ATPasa de calcio ruta secretora
TGF	Tracto Genital Femenino
TRM	Tracto reproductor masculino
TRP	Receptor de Potencial Transitorio (del inglés, “Transient Receptor Potential”)
TRM	Tracto reproductor masculino
Zn²⁺	Ión zinc
ZP	Zona pelúcida

RESUMEN

La reproducción es una característica universal de todos los seres vivos y el proceso más importante que ha aparecido durante la historia de la vida y no del todo entendido. El éxito de la reproducción sexual depende de la correcta comunicación entre los dos gametos, el espermatozoide y el ovocito.

Existen claras evidencias de 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 y la señalización por calcio es esencial para una fecundación exitosa.

En los espermatozoides la capacitación, la movilidad y la reacción acrosomal (RA) son mediadas por incrementos regulados de Ca^{2+} intracelular. Recientemente se identificaron, en la pieza principal del flagelo de los espermatozoides, canales catiónicos específicos del espermatozoide (CatSper). El CatSper es un canal selectivo a Ca^{2+} , activado por alcalinización intracelular, débilmente sensible al voltaje. En ausencia de Ca^{2+} externo, CatSper funciona como un canal permeable a Na^+ de alta conductancia. En la condición fisiológica, CatSper juega un papel central en el desarrollo de la hiperactivación. Su falta en ratones “knock out” produce individuos estériles incapaces de hiperactivarse, sin afectar movilidad activada, capacitación o RA. Aunque estos estudios han demostrado que CatSper participa en la función espermática, su acción y mecanismos siguen siendo poco entendibles.

Por otra parte, entre las señales que median un incremento de Ca^{2+} intracelular transitorio en el espermatozoide son la progesterona, (hormona esteroidea producida por las células de la granulosa que rodean al ovocito) o la prostaglandina E (PGE) (componente activo del líquido folicular), ambos agonistas median esta respuesta vía receptores de membrana plasmática no genómico y por mecanismos aun no identificados. Los eventos de señalización de ambos agonistas se ha reportado son distintos, ya que, no presentan una sensibilización cruzada, si no al contrario, la aplicación simultánea de PGE_1 y progesterona conlleva a un efecto aditivo sobre el incremento de Ca^{2+} intracelular en los espermatozoides. En el presente estudio proponemos como hipótesis de trabajo que tanto PGE_1 como progesterona activan directamente el canal CatSper.

Para comprobar la hipótesis, se determinó el efecto de las PGE_1 y la progesterona basándonos en mediciones ópticas de Ca^{2+} intracelular, pH_i y Na^+ intracelular mediante registros de fluorescencia en poblaciones de espermatozoides humanos.

Encontramos que al estimular a los espermatozoides con diferentes concentraciones de PGE₁, el incremento de Ca²⁺ es dosis dependiente y transitorio; con una EC₅₀ de 207 ± 104 nM, alcanzándose casi la máxima respuesta con 1 μM de PGE₁.

Para evaluar la participación de CatSper en el incremento de Ca²⁺ inducido con PGE₁ y progesterona, incubamos a las poblaciones de espermatozoides en medios con diferentes pHs externos (de 7.2 a 8.0), con lo que fuimos alcalinizando el medio intracelular de los espermatozoides. Al inducir el incremento de Ca²⁺ con PGE₁ o progesterona, observamos que el Ca²⁺ intracelular aumentó de manera pH_e dependiente, a un pH_e 7.2 el Ca²⁺ intracelular fue de ~250 nM y para un pH_e de 8.0 el incremento de calcio intracelular fue de doble (~500 nM).

Recientemente se reportó que mibefradil, un derivado de la tetralina bloquea CatSper. Utilizamos este inhibidor sobre el incremento de Ca²⁺ inducido por PGE₁ y progesterona, encontramos que mibefradil inhibe de manera eficiente este incremento de Ca²⁺. Esta inhibición fue dosis dependiente, con una IC₅₀ = 4.8 ± 1.2 μM y una IC₅₀ = 4.4 ± 1.3 μM respectivamente alcanzándose una inhibición de ~75% con 20 μM para ambos agonistas.

La aplicación de mibefradil sobre el incremento de Ca²⁺ inducido con PGE₁ y progesterona en los diferentes pH_e, tuvo un efecto pH_e dependiente; ~25% en un pH_e 7.2 y de ~80% en un pH_e 8.0. Este resultado sugiere que la eficiencia de bloqueo de mibefradil al CatSper es pH_e dependiente o existe otra vía de entrada de Ca²⁺ aparte de CatSper para ambos agonistas.

Debido a que el canal con el que trabajamos es un canal pH_i dependiente, quisimos evaluar el efecto de nuestros agonistas e inhibidor, sobre el pH intracelular del espermatozoide. Observamos que la adición de ambos no afecta el pH intracelular, lo cual apoya la idea de que el incremento del Ca²⁺ intracelular es directamente por la activación del canal.

Con base en que en ausencia de Ca²⁺ externo CatSper funciona como un canal permeable a Na⁺, abordamos esta característica quelando el Ca²⁺ externo de nuestro medio de registro con EGTA (ácido etilén glicol tetraacético). Al estimular con PGE₁ o progesterona observamos un incremento de Na⁺ masivo que se detiene al readicionar Ca²⁺ al medio de registro. Al adicionar el mibefradil, esta entrada de Na⁺ es inhibida. Estos resultados concuerdan con las características que se reportan para los CatSper. Todos estos resultados apoyan que tanto PGE₁ como progesterona median un incremento de Ca²⁺ en los espermatozoides humanos vía activación de CatSper. Se sabe que CatSper tiene, al menos, 3 subunidades auxiliares (β, γ y δ) cuyos dominios extracelulares son grandes, lo cual sugiere que estas subunidades auxiliares podrían funcionar como receptor extracelular de PGE₁ y progesterona.

ABSTRACT

Sperm-specific cation channel (CatSper) play a central role in the development of hyperactivation, which is characterized as vigorous flagellar motility and required for mammalian fertilization. Currently, CatSper is known to consist of 4 pore-forming (α) subunits (CatSper1-4) and 3 auxiliary subunits (CatSper β , γ and δ). All 3 auxiliary subunits have large extracellular domains, suggesting a possible function as receptors for extracellular ligands. So far, any CatSper subunit "knockout" (4 for each α and 1 for β subunits) produced sterile mice due to the same defect in hyperactivation. Although these studies have shown that CatSper is essential for sperm function, its regulation under physiological condition remains poorly understood. On the other hand, prostaglandin E (PGE) and progesterone, which are natural ligands present in the female genital tract, cause an increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in human sperm. Both agonists mediate this response via non-genomic plasma membrane receptors, but the mechanisms have not yet been identified. A working hypothesis of the present study is that both PGE_1 and progesterone directly activate the CatSper channel. Since it is known that CatSper can be activated by intracellular alkalinization, we incubated human spermatozoa in media with different outside pH (from 7.2 to 8.0), so that we modified the intracellular pH of the sperm. We observed that the increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by PGE_1 and progesterone was potentiated in higher pH media; the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevated up to ~ 250 nM at pH_o 7.2 and it was doubled (~ 500 nM) at pH_o 8.0. Recently it was reported that mibefradil, a derivative of tetralin, blocks CatSper. We used this inhibitor on the Ca^{2+} increase induced by PGE_1 and progesterone and found that mibefradil inhibits efficiently the increase of Ca^{2+} with an $\text{IC}_{50} = 4.8 \pm 1.2$ μM and an $\text{IC}_{50} = 4.4 \pm 1.3$ μM , respectively ($\sim 75\%$ inhibition at 20 μM). We confirmed that both ligands do not affect the intracellular pH, so the increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by PGE_1 or progesterone not mediated by intracellular alkalinization, instead, it may be attributed to direct action to the channel. In the absence of external Ca^{2+} CatSper acts as a channel permeable to Na^+ , we address this feature by external Ca^{2+} removal with EGTA. As anticipated, both PGE_1 and progesterone induced massive Na^+ influx in Ca^{2+} free medium and it was inhibited by mibefradil and also by re-addition of Ca^{2+} . All out data support that PGE_1 and progesterone directly activate CatSper channel in human spermatozoa.

I. INTRODUCCIÓN

La reproducción es una característica universal de todos los seres vivos y el proceso más importante que ha aparecido durante la historia de la vida y no del todo entendido. La variedad de patrones de reproducción en los animales es enorme. La mayoría de los vertebrados se reproducen sexualmente, lo que implica la formación de células sexuales (gametos) generalmente por parte de dos progenitores diferentes (el macho y la hembra), que al unirse durante el proceso conocido como fecundación, dan lugar a un cigoto y se formará un nuevo individuo (Curtis y Barnes, 2001; Hickman *et al.*, 2000).

Los gametos (ovocito y espermatozoide) son células que han evolucionado y especializado para la propagación de los genes que transportan mediante la recombinación genética favoreciendo la variabilidad genética, aspecto importante para la evolución. La formación de los gametos procede de una serie de transformaciones que ocurren durante la gametogénesis, en donde ambos gametos se desarrollan por meiosis: proceso biológico que genera células haploides con características genéticas diferentes a las que les dieron origen debido a la recombinación genética de los cromosomas homólogos. Este proceso se denomina ovogénesis en el caso de la generación del gameto femenino, y espermatogénesis en el caso del gameto masculino; estos gametos están especializados en la producción y almacenamiento de nutrientes (óvulos) o en la movilidad, como en los espermatozoides (Gilbert, 2003). A continuación se describen las características morfológicas de los espermatozoides de mamífero y posteriormente se detalla la maduración espermática, requisito indispensable para que el gameto masculino se convierta en una célula funcionalmente competente para fecundar al ovocito.

1.1.- Estructura del espermatozoide.

El espermatozoide es la célula madura al final de la gametogénesis, contiene solamente la mitad de cromosomas de una célula somática; es decir, es haploide; y es el portador de la información genética paterna. Presenta importantes variaciones tanto en forma como en tamaño entre las diferentes especies de mamíferos, pero en términos generales se compone por: una cabeza, y un flagelo o cola (Figura 1) (Gartner y Hiatt, 2002).

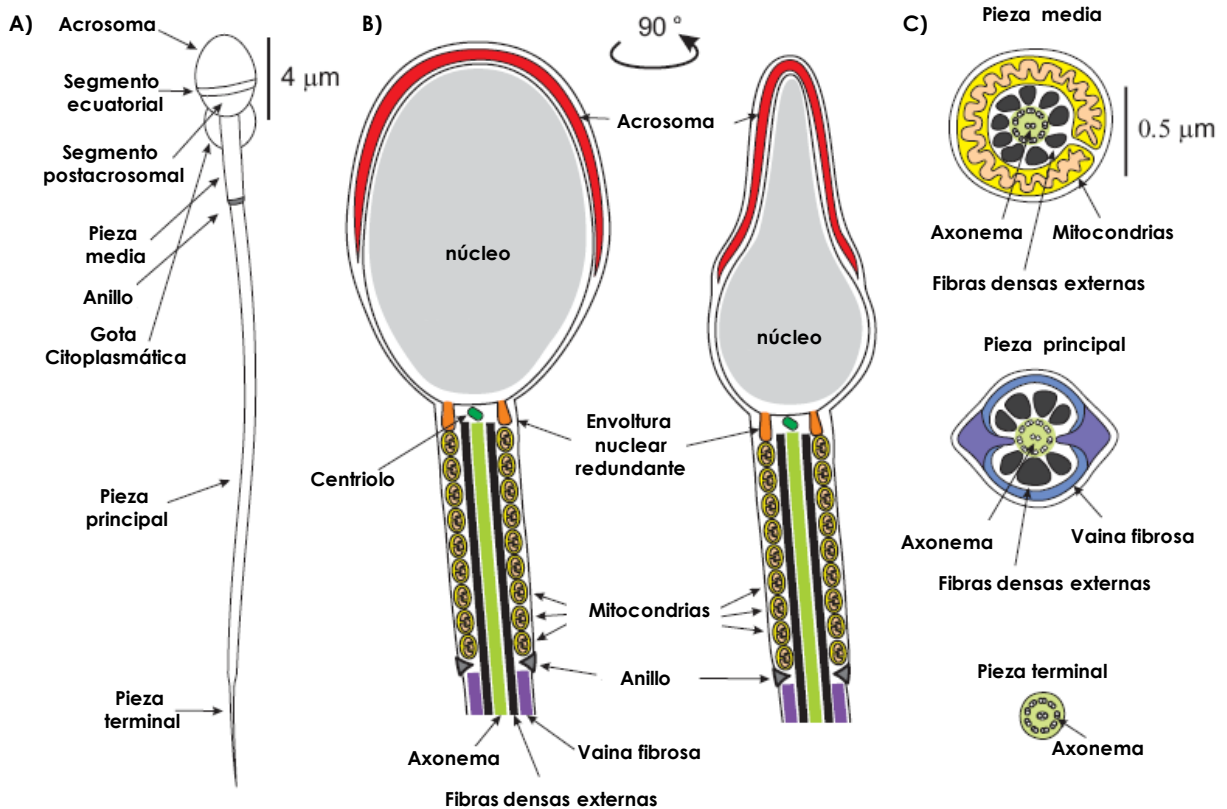


Figura 1. Esquema de la morfología del espermatozoide humano. A) Cuerpo entero del espermatozoide humano; consta de una cabeza redondeada con un acrosoma en forma de tapa, en la parte anterior. En la parte posterior de la cabeza se encuentra el segmento ecuatorial y el postacrosomal. El flagelo de los espermatozoides de mamífero se divide en pieza media, principal y terminal. La pieza media está separada de la principal por el anillo. Con frecuencia en espermatozoides maduros humanos se observa una gota citoplasmática. B) Ampliación de la cabeza y de la región de la pieza media del espermatozoide humano [secciones transversales desde dos ángulos diferentes (90 ° de rotación)]. El núcleo ocupa la mayor parte del espacio de la cabeza y se cubre por el acrosoma, hay muy poco citosol en estas células. El centríolo y la envoltura nuclear se encuentran en la base de la cabeza. El axonema está rodeado por las fibras externas densas en la pieza media y la pieza principal. Las fibras densas externas están rodeadas de mitocondrias en la pieza media, mientras que por la vaina fibrosa en la pieza principal. C). Ampliación de la sección transversal del flagelo del espermatozoide de los mamíferos. El axonema se localiza en el centro y a lo largo de todo el flagelo, está rodeado por las mitocondrias y fibras densas externas en la pieza media, mientras que en la pieza principal está rodeado por las fibras densas externas y por una vaina fibrosa (2 de 9 fibras densas externas se fusiona con la vaina fibrosa). La pieza final sólo contiene el axonema (Modificado de Darszon *et al.*, 2011).

La principal función de la cabeza es la entrega de la información genética paterna dentro del ovocito, mientras que la del flagelo es la de proporcionar a la célula movilidad que le va a permitir viajar en el tracto genital femenino (TGF) y penetrar la zona pelúcida (ZP) (Mortimer, 1997).

El flagelo consta de 4 regiones: cuello, pieza intermedia, principal y terminal. Los componentes estructurales presentes en el flagelo son el axonema, el complejo mitocondrial, la vaina fibrosa y las fibras densas externas (Oko y Clermont, 1990).

El axonema se encuentra en el centro del flagelo y es la estructura responsable de la movilidad; contiene a la dineína, proteína encargada de convertir la energía química liberada

mediante la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) en energía mecánica para la movilidad (De Jonge y Barratt, 2006; Eckert, 1990; Mortimer, 1997).

El complejo mitocondrial es el portador de enzimas oxidantes responsables de la fosforilación oxidativa, constituye una región importante para la generación de ATP y se encuentra únicamente en la pieza intermedia (Gartner y Hiatt, 2002; Oko y Clermont, 1990; Ruiz, 1988). Sin embargo, la importancia de la mitocondria en el funcionamiento del espermatozoide está en debate debido a que, en algunas especies como el ratón, la glicolisis es fundamental para generar la energía para mantener la movilidad del espermatozoide (Miki *et al.*, 2004) mientras que el citocromo C de esta célula no es esencial (Narisawa *et al.*, 2002).

La vaina fibrosa está compuesta por tres columnas longitudinales que van a correr a lo largo de la pieza principal. En algunas especies, el 50% de las proteínas presentes en esta estructura van a ser las proteínas de anclaje de la cinasa A (AKAPs); y su fosforilación en tirosinas se cree que está relacionada con su deslizamiento. También, la vaina fibrosa se ha propuesto como un andamiaje para enzimas glicolíticas (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa-S, hexoquinasa HK1-S, etc.), lo cual indica la importancia de esta estructura en la movilidad espermática (De Jonge y Barratt, 2006, Miki *et al.*, 2002).

Otras estructuras presentes son las fibras longitudinales densas externas que a lo largo de la pieza media (en número de 9) y parte de la pieza principal (solo 7) van a rodear al axonema; estas estructuras van a estar compuestas por varios filamentos de proteínas ricos en cisteína, serina y prolina con alto grado de puentes disulfuro (S-S) dependientes de zinc (De Jonge y Barratt, 2006; Álvarez, 2003; Mortimer, 1997).

Los espermatozoides son células genéticamente y morfológicamente diferenciadas (Figura 1), sin embargo, recién formados, todavía no poseen movimiento progresivo ni, mucho menos, están preparados para fusionarse con el ovocito, por lo que requieren de un proceso conocido como maduración espermática (De Jonge, 2005; Visconti y Kopf, 1998).

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 TGF (Sullivan *et al.*, 2007; Breitbart, 2002).

1.2.1.- Maduración en el epidídimo

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos y se transportan hasta el epidídimo, sitio en el que se llevarán a cabo distintos eventos como su maduración, su concentración y almacenamiento (Figura 2) (Sullivan *et al.*, 2007).

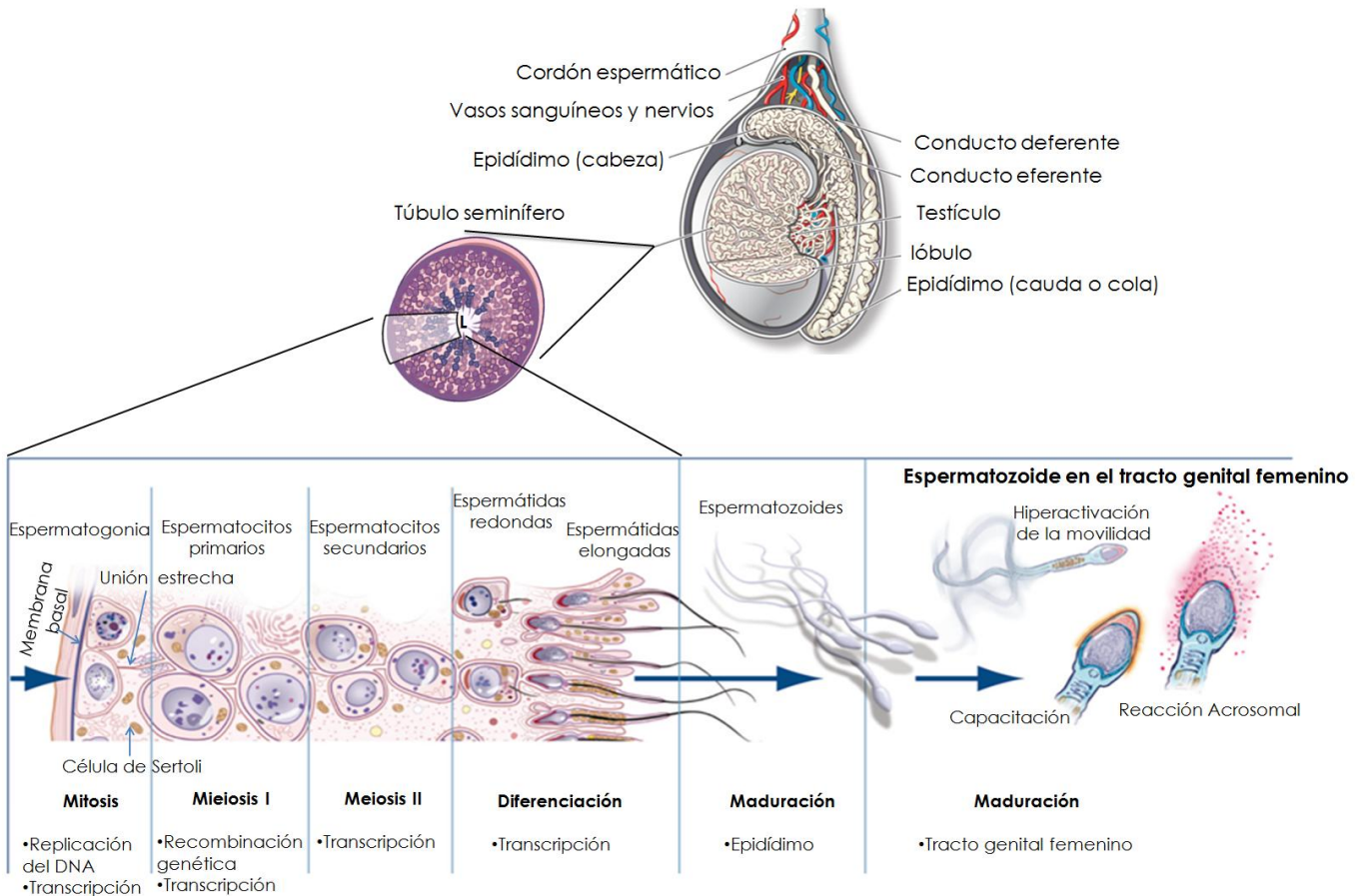


Figura 2. Diagrama del órgano reproductor masculino, formación de los espermatozoides de mamíferos y procesos asociados. En la parte inferior izquierda del diagrama se observa la espermatogénesis. La espermatogénesis avanza desde la base hasta la luz de los túbulos seminíferos. Los túbulos seminíferos se componen básicamente de dos tipos de células: somáticas (células de Sertoli), células que apoyan, protegen y nutren a las células germinales (espermatogénicas); este segundo tipo celular se organiza en varias capas de células con una distribución vectorial en las que las células germinales son más maduras cuanto más cerca de la luz se encuentran. Las espermatogonias (células germinales madre) residen en el compartimento basal y proliferan a espermatocitos primarios (Leptoteno), al diferenciarse las espermatogonias atraviesan la barrera hemato-testicular formada por la unión estrecha de las células de Sertoli adyacentes. Los Espermatocitos secundarios (paquiteno y diploteno) se forman por la primera meiosis y se convierten en espermátidas redondas por la segunda meiosis. Las espermátidas son células alargadas que experimentan el proceso de espermiación, es decir; se someten a una notable transformación morfológica del núcleo y del cuerpo celular. En la etapa final de la espermiación, la mayor parte del citoplasma se eliminará (es fagocitado por las células de Sertoli) para formar espermatozoides completamente desarrollados. En la parte central superior de la figura se observa un corte en sección transversal de un túbulo seminífero. Los espermatozoides recién formados son transportados hacia el epidídimo a través de la luz del túbulo (L). En el lado derecho superior de la figura se observa el epidídimo y el testículo. El testículo está lleno de túbulos seminíferos. El epidídimo también está lleno de tubos estrechos y enroscados. Este órgano se puede dividir en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. El transporte de los espermatozoides a lo largo de estos túbulos se requiere para la primera fase de maduración de los espermatozoides. La segunda fase de maduración se dará en el TGF (parte inferior izquierda) (Modificado de du Plessis *et al.*, 2011).

El epidídimo es un tubo con forma de espiral (5-6 m. de longitud, en el caso del hombre) que forma parte del sistema de conductos extratesticulares del sistema reproductor masculino; se encuentra empaquetado en un saco de tejido conectivo, que es una extensión de la túnica albugínea; ubicado entre el conducto eferente y el conducto deferente; este último se comunica a 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 (RA) en el tracto reproductor masculino (TRM), fenómeno que el espermatozoide cumple al tener contacto con la ZP del ovocito (Jones, 1998).

Así mismo, en el epidídimo se completan cambios morfológicos en su tamaño y su forma, así como en la estructura interna del acrosoma y en la posición de la gota citoplasmática, que migra desde una posición proximal hasta una 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 epidídimo (proteínas, ácido siálico, carnitina, iones inorgánicos, etc.); en todos los compartimentos celulares del espermatozoide: el acrosoma, el núcleo, el flagelo y la membrana plasmática presentan modificaciones; la membrana plasmática 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).

La actividad metabólica de los espermatozoides también se ve modificada durante su trayecto por el epidídimo: se da una modificación en su actividad glicolítica y en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) como resultado del incremento de la actividad de la enzima adenilato-ciclase y una disminución de la actividad de una fosfodiesterasa de AMPC (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 por movimientos

peristálticos del plasma seminal pasan por la uretra; para ser liberados al TGF durante la eyaculación (De Jonge y Barratt, 2006).

Al momento de la eyaculación los espermatozoides entran en contacto con secreciones de las glándulas anexas accesorias del TRM, que en su conjunto conforman el líquido seminal para ser depositados en el TGF (Bedford, 1975; Robaire y Hermo, 1998).

Estos tejidos accesorios producen grandes cantidades de sustancias biológicamente importantes como: prostaglandina (PG), espermina, fructosa, ácido cítrico y altas concentraciones de zinc, proteínas y enzimas específicas como inmunoglobulinas, proteasas, esterases y fosfatasas (Espey y Lipner, 1994; Harper, 1994).

1.2.2.- Maduración en el tracto genital femenino.

Los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos son depositados en la vagina y de aquí son transportados del cérvix hasta un pequeño orificio en el oviducto (trompas de Falopio), es decir, hasta la unión útero-tubal mediante la movilidad activada (ver más adelante) así como por las contracciones musculares de la vagina, cérvix y útero (Figura 3). La unión útero-tubal funciona como una barrera para los espermatozoides, ya que sólo logran pasar aquellos que presentan una movilidad activada, es decir, de los miles que son depositados sólo unos cuantos pasan esta barrera. El oviducto consta de dos regiones: el istmo y el ampulla. Cuando el espermatozoide activado logra pasar al oviducto, se encuentran primero con el istmo, el cual se conoce como el reservorio del oviducto, ya que los espermatozoides se fijan fuertemente al epitelio oviductual, quedando atrapados y formando un reservorio. Es en este sitio donde los espermatozoides son almacenados y poco a poco son hiperactivados y capacitados asincrónicamente (ya que es aquí donde se pierden los factores descapacitantes, ver más adelante), con lo que pierden afinidad por el epitelio y son liberados a la región del ampulla en donde se va a llevar a cabo el encuentro de un espermatozoide 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). Los espermatozoides una vez capacitados e hiperactivados son guiados hacia el ovocito mediante secreciones de sustancias quimiotácticas de las células de la granulosa que lo rodean (*cumulus oophorus*), proceso conocido como quimiotaxis (Eisenbach y Giojalas, 2006), el cual en los mamíferos sigue siendo controversial (Kaupp *et al.*, 2008).

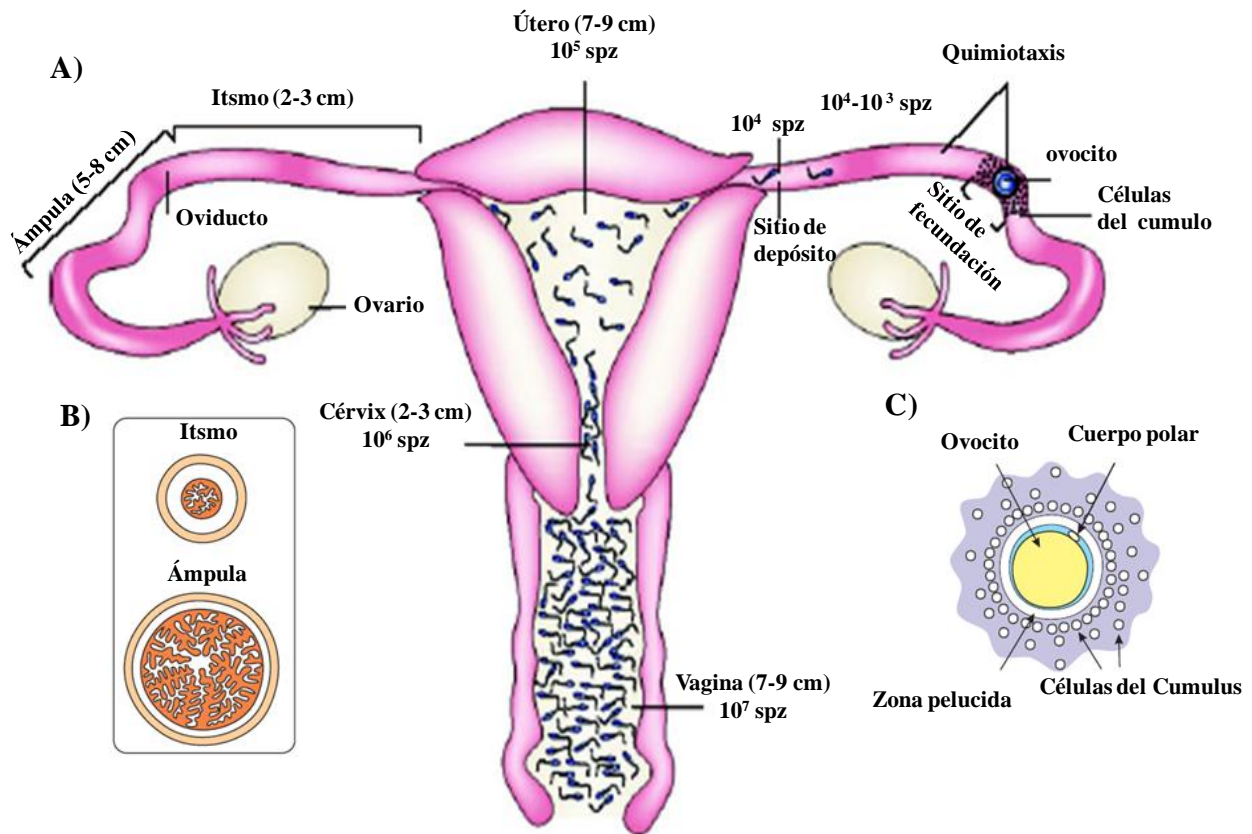


Figura 3. Diagrama del sistema reproductor femenino. A) Muestra la arquitectura y los componentes principales del aparato reproductor femenino. La vagina es el sitio de la eyaculación y el punto de inicio del viaje de los espermatozoides. La natación y las contracciones musculares permiten que los espermatozoides puedan pasar el cuello uterino y después al istmo. El istmo es el primer segmento de la trompa de Falopio y es el sitio en donde se almacenan los espermatozoides, en ausencia de espermatozoides los ovocitos pueden esperar unido a las grietas de este tejido durante varios días, dependiendo de la especie. El ampulla es el segundo segmento de la trompa de Falopio y es el sitio de la fertilización. Los ovarios se encuentran al final de las trompas de Falopio. Durante la ovulación, el ovocito migra al ampulla y los espermatozoides desde el depósito (istmo) se desprenden hasta llegar al ovocito. B) Sección transversal que muestra las invaginaciones que caracterizan la morfología de las regiones del istmo y ampulla. C) Esquema del ovocito, donde se muestra la ZP y las células del cumulo que lo rodean (Modificado de Darszon *et al.*, 2011; Eisenbach y Giojalas, 2006).

La hiperactivación y la capacitación permiten al espermatozoide unirse a la ZP del ovocito, específicamente a la glicoproteína ZP3, que además induce la RA, proceso que permite al espermatozoide penetrar sus capas y fusionarse con el ovocito (Darszon *et al.*, 2006; Turner, 2006; Suarez y Pacey, 2006). Estos tres procesos son esenciales para que el espermatozoide fecunde al ovocito y se describen brevemente a continuación.

➤ Movilidad espermática.

Los espermatozoides requieren ser móviles progresivos para poder cumplir su principal objetivo: la fecundación, para lo cual presentan dos formas de movilidad: activada e hiperactivada (Figura 4) (Darszon *et al.*, 2011; Suarez, 1996).

Activada. Esta movilidad se refiere a una amplitud baja del batido flagelar que presentan los espermatozoides recién eyaculados; la activación les permite llegar al istmo, donde son capturados (Figura 4A) (Darszon *et al.*, 2011; De Jonge y Barratt, 2006; Suarez y Pacey, 2005; Suarez, 1996).

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, mientras que en medios viscosos (como el del fluido folicular) este movimiento es rectilíneo y más progresivo que la movilidad activada. Este tipo de movimiento le confiere la capacidad de liberarse del epitelio oviductual del istmo 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 de penetración (Figura 4B) (Darszon *et al.*, 2011; De Jonge y Barratt, 2006; Suarez y Pacey, 2005; Suarez, 1996).

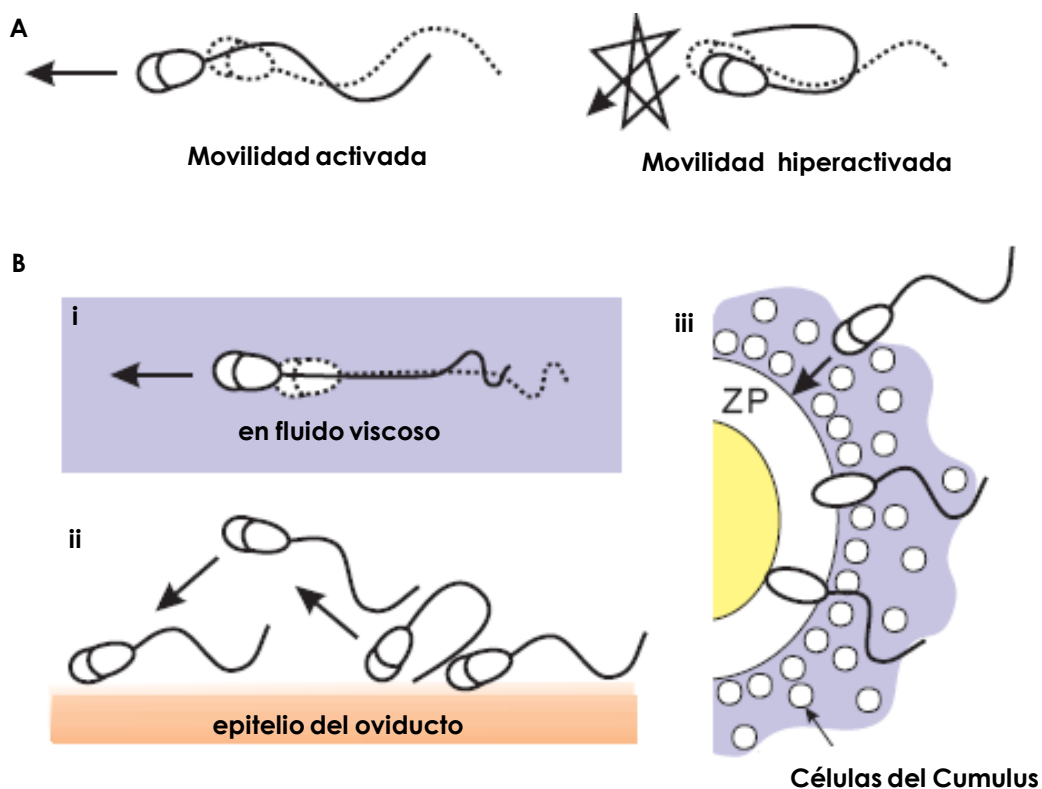


Figura 4. Tipos de movilidad. A) Movilidad activada (izquierda) e hiperactivada (derecha). La forma flagelar y la dirección de la motilidad se muestra con las flechas, estos tipos de movilidad son los que experimentan los espermatozoides en medios experimentales no viscosos. B). Importancia de la movilidad hiperactivada de los espermatozoides: i) avanzar en la alta viscosidad del tracto genital femenino de manera más eficiente que el espermatozoide con movilidad activada, ii) poder separarse de los espermatozoides del reservorio (istmo) y avanzar hacia la ampulla (sitio de la fertilización) y iii) facilita la penetración de los espermatozoides a través de las células del cumulus y la ZP (Modificado de Darszon *et al.*, 2011).

La activación y la hiperactivación dependen de la funcionalidad del axonema y cuya proteína motora principal es la dineína (De Jonge y Barratt, 2006). La movilidad espermática de los mamíferos se ha reportado puede ser regulada por dos rutas de señalización: una mediada por la proteína cinasa A dependiente de AMPc (AMPc/PKA) y la otra por Ca^{2+} (Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006; Turner, 2006).

El AMPc es un segundo mensajero esencial en la fisiología espermática que induce, entre otros procesos, la activación tardía de una proteína tirosin-cinasa (PTK) que fosforila proteínas en sus tirosinas aunque su mecanismo aún no se conoce. El incremento de AMPc se debe a la activación de la adenilato ciclasa soluble (ACs) dependiente de bicarbonato (HCO_3^-) y por la inactivación de la fosfodiesterasa (PDE) (Turner, 2006). Las proteínas de anclaje de PKA (AKAPs) de la vaina fibrosa, que son las proteínas estructurales de la pieza principal del flagelo son blanco para PTK y su fosforilación parece ser de suma importancia para la iniciación de la movilidad flagelar, ya que su inhibición suprime la capacitación y la hiperactivación de la movilidad (Bajpai y Doncel, 2003). Por otra parte, el incremento de AMPc debido a la inhibición de las fosfodiesterasas induce no solo la fosforilación de proteínas, sino además la hiperactivación de los espermatozoides (Figura 5) (Buffone *et al.*, 2005).

La importancia del AMPc en la función espermática se pone de manifiesto en el hecho de que se presenta infertilidad en ratones “knock out” para la ACs, debido a defectos en la movilidad; y estos defectos son reversibles al tratarlos con un análogo permeable de AMPc (Esposito *et al.*, 2004), por esto se ha establecido que el AMPc actúa como una molécula señal para la regulación de la movilidad espermática.

El Ca^{2+} es un factor esencial para la modulación de la movilidad del 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 (mM) de este ion inhiben la movilidad flagelar. Este Ca^{2+} puede provenir, además del medio extracelular, de varias fuentes intracelulares como: la envoltura nuclear redundante (ENR) mediada por los receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) o la mitocondria (Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006; Ho y Suarez, 2001). El ingreso de Ca^{2+} del medio extracelular se da a través de canales iónicos (Figura 5).

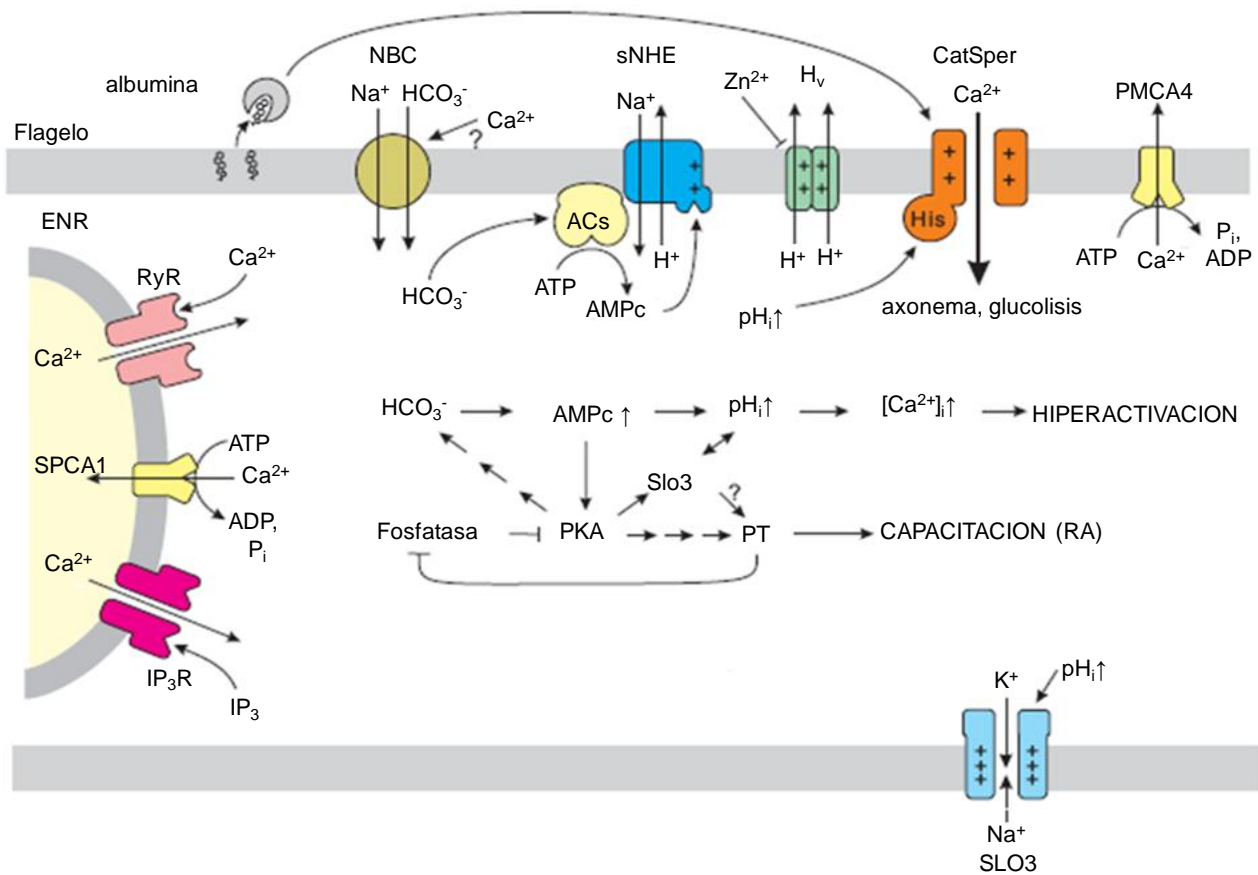


Figura 5. Flujos de iones durante la hiperactivación y la capacitación en los espermatozoides de mamífero. Ambos procesos ocurren en paralelo a lo largo del TGF, pero solo algunas vías de señalización son compartidas. La albúmina presente en el TGF remueve el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide modificando algunas de sus propiedades y también activa directamente a los canales CatSper, aumentando la $[Ca^{2+}]_i$. La activación de un intercambiador Na^+/HCO_3^- (NBC) (posiblemente activado por Ca^{2+} externo), aumentando los niveles de HCO_3^- con lo que se da la activación de la adenilato ciclasa soluble (ACs) y la producción de AMPc. Este AMPc puede activar el intercambiador Na^+/H^+ (sNHE) y junto con la activación del canal de protones (H_v) (por el retiro de Zn^{2+}) aumenta el pH_i , otro parámetro celular que activa los canales CatSper y los canales SLO₃. El aumento global de Ca^{2+} influye en la glucólisis 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 (RyRs)) 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. Las posibles conexiones entre las vías de señalización de la hiperactivación y la capacitación se indican, en el centro de la figura (Modificado de Darszon *et al.*, 2011).

En el flagelo se han reportado varias subunidades de canales dependientes de voltaje (Ca_v) (reportados en ratones y humanos), canales del receptor de potencial transitorio (TRP; en ratones y humanos), canales dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG) y canales catiónicos específicos del espermatozoide (CatSper) (Darszon *et al.*, 2006; Turner, 2006). De estos canales, el CatSper es el que al parecer juega un papel central en el desarrollo de la hiperactivación. Su ausencia en ratones “knock out” produce ratones estériles incapaces de hiperactivarse, sin afectar movilidad activada, capacitación o reacción acrosomal. Estos canales se encuentran en la pieza principal del flagelo y son exclusivos de los espermatozoides (descripción detallada en los antecedentes) (Ren *et al.*, 2001).

➤ **Capacitación espermática.**

La capacitación significa adquisición de la capacidad para fecundar al ovocito. Consiste en una serie de modificaciones tanto bioquímicas como biofísicas en el espermatozoide que se dan a lo largo del TGF, y particularmente en el itsmo 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 concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). 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 (Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006; Baldi *et al.*, 2000).

Durante la capacitación también se ha propuesto que la membrana plasmática del espermatozoide se hace más fluida y permeable, debido a que los lípidos y las proteínas de la misma se reorganizan. El contenido rico en albúmina y lipoproteínas de alta densidad (HDL) del fluido del oviducto promueven la remoción del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide con lo que se altera el transporte iónico incrementándose la concentración de $[HCO_3^-]_i$ y la $[Ca^{2+}]_i$ en el citosol (Figura 5) (Darszon *et al.*, 2011; Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006).

Se cree que la entrada de HCO_3^- puede estar mediada por un cotransportador Na^+/HCO_3^- (NBC) o por difusión como dióxido de carbono (Krapf *et al.*, 2010). 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 PKA, dependiente de AMPc. (Krapf *et al.*, 2010; Darszon *et al.*, 2006; De Jonge y Barratt, 2006). Este AMPc puede activar el intercambiador Na^+/H^+ (sNHE) y junto con la activación del canal de protones (H_V) (por el retiro de Zn^{2+}) aumenta el pH_i , otro parámetro celular que activa los canales CatSper y los canales SLO3. Durante la capacitación el pH_i se alcaliniza (de 6.7 a 6.85 en humano: Neri-Vidaurre *et al.*, 2006) (Figura 5).

Todos estos cambios durante la capacitación son responsables de dotar a los espermatozoides con la capacidad de reaccionar con el ovocito, proceso conocido como RA y que se dé posteriormente la fecundación (Darszon *et al.*, 2011; Blackmore, 1993; Mendoza, y Tesarik, 1993; Baldi, *et al.*, 1991).

➤ **Reacción acrosomal.**

La RA es un fenómeno de exocitosis particular, en el que se da la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en múltiples puntos de la región anterior de la cabeza del espermatozoide y se caracteriza por la liberación de vesículas de estas membranas junto con el contenido acrosomal. A consecuencia de la RA, ocurre un cambio funcional de la membrana plasmática en la parte ecuatorial de la cabeza, lo que permite su fusión a la membrana plasmática del óvulo, todo esto como un paso inicial de la fecundación propiamente dicha (Baldi *et al.*, 1996). Este fenómeno es disparado por un influjo de Ca^{2+} que incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Breitbart, 2002; Wassarman *et al.*, 2001).

Entre los ligandos que inducen la RA destacan, por aproximarse más a las condiciones fisiológicas y por ende son los más estudiados hasta el momento, son la progesterona, hormona secretada por las células de la granulosa (células del cumulus) que acompañan al ovocito, y la ZP3, que es una glicoproteína que forma parte estructural de la ZP del ovocito (González-Martínez, 2002; Wassarman *et al.*, 2001; Baldi *et al.*, 2000). Otro inductor fisiológico, son las prostaglandinas, prostanoides derivados de los ácidos grasos y componentes activos del líquido folicular (Espey *et al.*, 1994; Harper, 1994). Estos tres agonistas aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pero las vías de señalización aún se están estudiando.

Con base en lo anterior, la movilidad, la capacitación y la RA están mediados por mecanismos de señalización de Ca^{2+} ; en los que, los canales iónicos juegan un papel fundamental en la fisiología de la célula espermática.

Los cambios en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se dan a diferente tiempo y en espacios celulares específicos, dependiendo del tipo de estímulo logrando una regulación espacio-temporal fina de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que es muy importante ya que las respuestas del espermatozoide deben ser específicas, apropiadas y a su debido tiempo para que la fecundación ocurra (Suarez, 2008; Publicover *et al.*, 2007).

Sin embargo, las identidades moleculares y bioquímicas que provocan y regulan el aumento en el Ca^{2+} intracelular en la movilidad, capacitación y RA no se han esclarecido del todo y en algunos casos sigue siendo controversial, por ejemplo, en la movilidad se ha reportado que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está relacionada con el grado de asimetría flagelar (Brokaw, 1979). Sin embargo, recientemente se reportó que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no necesariamente está relacionado con el grado de asimetría

flagelar (Abou-haila y Tulsiani, 2009; Shiba *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2007; Darszon *et al.*, 2006), lo que refleja que la relación entre la $[Ca^{2+}]_i$ y la asimetría flagelar sigue siendo controversial y abre la pauta a explorar dicha relación.

II. ANTECEDENTES

Cuando los espermatozoides son depositados en el TGF interactúan con diferentes compuestos mediadores de su funcionalidad. Algunos de estos compuestos provienen de las glándulas accesorias anexas (vesícula seminal, próstata y glándula bulbouretral) y otros son secretados por las células del TGF (principalmente el oviducto) (Lefièvre *et al.*, 2009; Gadella, 2008; Suarez y Pacey, 2006).

Por parte de las glándulas accesorias, en los mamíferos, el plasma seminal es considerado la principal fuente de compuestos mediadores de la funcionalidad espermática. El fluido de la vesícula seminal es el principal componente del plasma seminal y contiene principalmente: prostaglandina (PG), espermina, fructosa, ácido cítrico y altas concentraciones de zinc (mM en caso de humano), proteínas y enzimas específicas como inmunoglobulinas, proteasas, esterases y fosfatasas (Espey y Lipner, 1994; Harper, 1994), mientras que la secreción oviductual se va a caracterizar por la presencia de glicoproteínas, iones de bicarbonato, oviductina; así como por prostaglandinas (PG), y progesterona (Suarez y Pacey, 2006).

Al momento se tiene un conocimiento limitado de las funciones fisiológicas de las secreciones tanto en el TGM como en el TGF. Al mezclarse los espermatozoides con las secreciones de las glándulas anexas y con el fluido oviductual se ha observado que se termina la maduración espermática y facilita la fusión de los gametos, la fertilización así como el desarrollo del embrión (Sullivan *et al.*, 2007; Breitbart, 2002).

Existen algunos estudios relacionados con los cambios en el funcionamiento del espermatozoide después de la incubación con algunos de estos mediadores; con lo que se ha caracterizado de modo parcial, funciones como la motilidad, la capacitación y la RA (Suarez y Pacey, 2006; Robertson, 2005; Kopf, 2002; Wassarman, 1999).

2.1.- El calcio en el espermatozoide humano.

El Ca^{2+} es un segundo mensajero ampliamente utilizado en la señalización celular. Está involucrado en una diversidad de procesos desde la secreción, la contracción muscular, transcripción de genes, motilidad, actividad enzimática y transporte, en el estado de fosforilación de proteínas, incluso en varias formas de muerte celular. Como ya se ha ido abordando, es esencial en la fisiología del espermatozoide (Clapham, 2007; Darszon *et al.*, 2006; Berridge *et al.*, 2003).

El Ca^{2+} regula la RA, la movilidad inicial, así como el modo de batido flagelar (incluyendo la hiperactivación) y la capacitación. Esta participación implica que un espermatozoide debe asegurarse de que cada uno de estos procesos activados por Ca^{2+} se inicie en el momento oportuno. Ya que los espermatozoides no pueden sintetizar proteínas; los mecanismos post-traduccionales son los encargados de controlar las actividades celulares, por lo que el Ca^{2+} es un regulador fundamental para tales eventos (Publicover *et al.*, 2007), al grado de que una discapacidad en la señalización de Ca^{2+} da como resultado hombres subfértiles (Espino *et al.*, 2009; Baldi *et al.*, 1991).

El espermatozoide puede responder a las señales ambientales gracias a la presencia de canales iónicos en la membrana plasmática (Figura 6) (Navarro *et al.*, 2008; Darszon *et al.*, 2006; Jimenez-González *et al.*, 2006).

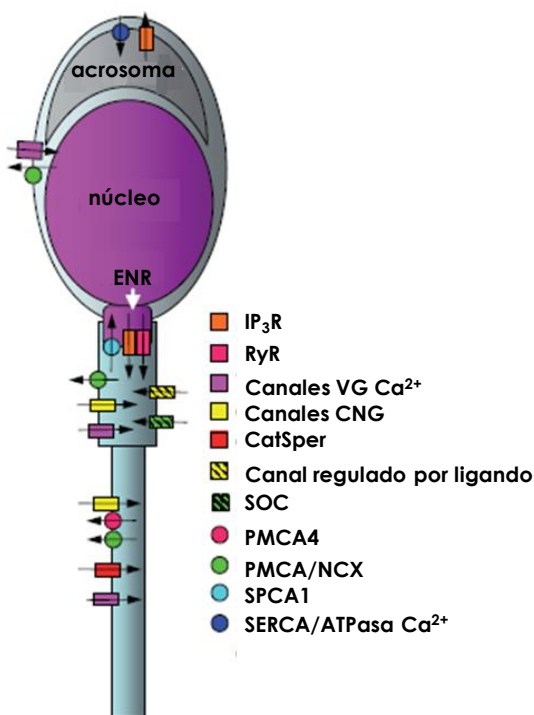


Figura 6. Esquema simplificado que muestra la variedad de canales iónicos en el espermatozoide de humano. Receptores al IP₃ (IP₃R). Receptores a rianodina (RyRs). Canales de calcio dependientes de voltaje (VG Ca²⁺). Canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNG). Canales catiónicos específicos del espermatozoide (CatSper). Canales operados por pozas internas (SOC). ATPase de calcio de la membrana plasmática (PMCA4). Intercambiador sodio-calcio (NCX). ATPasa de calcio ruta secretora (SPCA1). (Imagen tomada de Navarro *et al.*, 2008).

El influjo de Ca^{2+} se logra a través de los canales de la membrana plasmática al citoplasma (donde la concentración es mantenida muy baja ~ 100 nM) desde el espacio extracelular y/o de los organelos intracelulares donde la concentración de Ca^{2+} es mucho mayor (~ 2 mM) gracias a este gradiente electroquímico, que el espermatozoide utiliza como fuerza motriz (Darszon *et al.*, 2005). La regulación de las concentraciones de Ca^{2+} se da por su expulsión a través de ATPasas de Ca^{2+} que se encuentran en la membrana plasmática (PMCA) y por intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Figura 6) (Publicover *et al.*, 2007).

Como puede observarse en la figura 6 el espermatozoide está provisto de una gran batería de canales de Ca^{2+} . En el flagelo se han reportado subunidades 1.2, 2.1 y 2.3 de canales dependientes de voltaje de alto umbral (Ca_v 1 y 2) (reportados en ratones); 3 subunidades de canales dependientes de voltaje de bajo umbral o tipo T (Ca_v 3) (en ratones y humanos); canales TRPC (en ratones y humanos); canales de Ca^{2+} dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG) y canales catiónicos específicos del espermatozoide (CatSper) (Darszon *et al.*, 2006; Turner, 2006). De estos canales, el CatSper es el que al parecer juega un papel central en el desarrollo de la hiperactivación, por lo que a continuación abordaré un poco más sobre estos canales.

2.1.1.- Canal catiónico específico del espermatozoide (CatSper).

El CatSper, es un canal catiónico específico de los espermatozoides. Como su nombre lo indica se expresan exclusivamente en los espermatozoides, particularmente en la pieza principal del flagelo. El CatSper forma un canal selectivo a Ca^{2+} débilmente sensibles al voltaje, que es activado por pH_i elevado y es esencial para la hiperactivación espermática (Navarro *et al.*, 2008).

Hasta la fecha se ha propuesto que el canal está compuesto por cuatro subunidades alfa separadas CatSper1-4, que forman el poro del canal; así como 3 subunidades auxiliares CatSper β , CatSper γ y CatSper δ (Figura 7) (Chung *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007).

La topología prevista de los 4 miembros de la familia CatSper consta de 6 segmentos transmembranales (6TM, S1-S6), en donde se encuentra la secuencia consenso de selectividad a calcio (TxDxW), con los N y C terminales del lado del citoplasma. El cuarto segmento transmembranal (S4) tiene varios residuos cargados positivamente (R/K), aunque en las subunidades CatSper 3 y 4 solo presentan dos (Lobley *et al.*, 2003), las cuales explican la ligera dependencia a voltaje. La subunidad CatSper 1 se caracteriza además por presentar en su amino

terminal una región rica en histidinas, de la que se especula funciona como un sensor de pH (Navarro *et al.*, 2008).

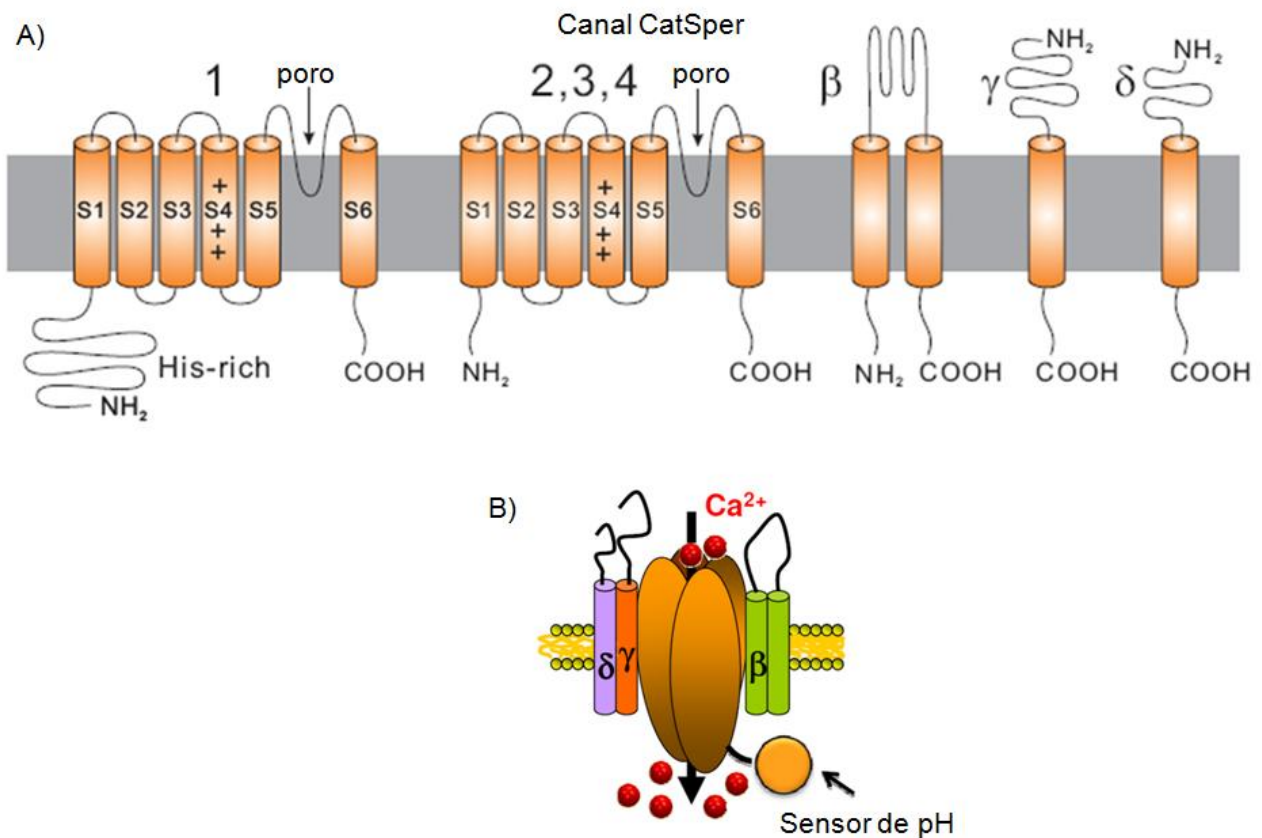


Figura 7. Estructura de los canales cationicos espermáticos (CatSper). A) Predicción topológica de las 4 subunidades que se ensamblan en B) para formar el canal (Darszon *et al.*, 2011; Kirichok y Lishko, 2011).

Las subunidades auxiliares CatSper β , CatSper γ fueron identificadas como proteínas asociadas a CatSper1 (Chung *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2009). CatSper β contiene dos segmentos transmembranales con dos dominios citoplasmáticos cortos y una asa extracelular grande. Mientras que CatSper γ y CatSper δ tienen solo un segmento transmembranal con un gran dominio extracelular y uno citoplasmático corto. Se les atribuyó la característica de proteínas auxiliares en base a que están ausentes en espermatozoides maduros de ratones nulos para CatSper 1 (Chung *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009; Lobley *et al.*, 2003). Las funciones exactas de CatSper β , CatSper γ , y CatSper δ aún no se han establecido. Sin embargo, Chung y cols (2011) demostraron que CatSper δ es esencial para que el canal CatSper sea funcional.

La reciente innovación de hacer “whole cell patch-clamp” en espermatozoides 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) (Qi *et al.*, 2007; Kirichok *et al.*, 2006). La I_{CatSper} de espermatozoides silvestres se elimina en aquellos ratones mutados para CatSper1-4 (Jin *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2007; Kirichok *et al.*, 2006). En cambio en la corriente de CatSper no se altera en ratones mutados para el intercambiador Na^+/H^+ cuando se controla el pH_i (Qi *et al.*, 2007).

La importancia de este canal se hace evidente cuando la ausencia o interrupción de CatSper1, CatSper2, CatSper3 o de CatSper4 causa infertilidad masculina. Esta infertilidad está asociada a la incapacidad de los espermatozoides de hiperactivarse, sin afectar a la movilidad activada o la capacitación. Por lo anterior, espermatozoides sin CatSper no pueden fecundar a los óvulos intactos, pero sí cuando la ZP está eliminada (Ren *et al.*, 2001). Estos datos permiten concluir que la movilidad hiperactivada, es esencial para que el espermatozoide pueda penetrar a través de la ZP del ovocito.

Los espermatozoides mutantes para CatSper no solo no se pueden hiperactivarse, si no también presentan una disminución gradual de la movilidad (Jin *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2007) y niveles más bajos de ATP en comparación con las células espermáticas silvestres (Xia *et al.*, 2007), lo que sugiere que el influjo de Ca^{2+} a través de los canales CatSper podrían regular otras vías de señalización, como la glicólisis (Miki *et al.*, 2004).

Con base a lo antes señalado, la señalización de Ca^{2+} en el espermatozoide debe ser específica, de ahí, que no es de extrañarse la localización selectiva de los distintos tipos de canales en la membrana plasmática permitiendo la entrada de Ca^{2+} de una manera controlada, ya sea por agonistas o por voltaje (Darszon *et al.*, 2006; Darszon *et al.*, 2005; Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2006).

En espermatozoides humanos, se ha reportado la entrada de Ca^{2+} estimulada por inductores como progesterona (Bedu-Addo *et al.*, 2008; Bedu-Addo *et al.*, 2007; Harper y Publicover, 2005; Kirkman-Brown *et al.*, 2000; Blackmore, 1993; Thomas y Meizel, 1989), óxido nítrico (Machado-

Olivera *et al.*, 2008; Bedu-Addo *et al.*, 2008) y prostaglandinas tipo E (PGE) (Schaefer *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1998). En este proyecto estudiamos el papel que tiene la PGE₁ en la fisiología del espermatozoide humano.

Pero antes de abordar dicho tema y dada la participación de la progesterona en la funcionalidad del espermatozoide se dará un breve panorama del efecto que tiene este esteroide en los procesos de movilidad y la RA, ya que es uno de los más estudiados dentro de los diferentes agonistas fisiológicos para los espermatozoides humanos.

2.2.-Efecto de la progesterona en el espermatozoide humano.

La progesterona (Figura 8A) es una hormona esteroide, conocida principalmente por su participación, junto con otras hormonas, en la regulación del ciclo menstrual femenino (en el caso de los seres humanos). Además de esta función, la progesterona induce diversas respuestas en la fisiología del espermatozoide humano, entre las que destacan: la inducción de la RA en espermatozoides capacitados (Meizel *et al.*, 1997), la inducción de quimiotaxis (Teves *et al.*, 2006) y la estimulación de la movilidad hiperactivada (Uhler *et al.*, 1992). Los eventos mencionados que induce la progesterona se debe a un aumento rápido de la $[Ca^{2+}]_i$ mediante la activación de receptores no genómicos (Blackmore, 1993). Además la respuesta de los espermatozoides a la progesterona de pacientes oligozoospermicos o infértiles se ha reportado que es reducida, poniendo aún más en relevancia la importancia y participación del efecto de la progesterona en los espermatozoides (Oehninger *et al.*, 1994; Falsetti *et al.*, 1993; Tesarik *et al.*, 1993).

Pese a que el efecto de la progesterona es una de las respuestas más estudiadas, el receptor responsable del incremento de Ca^{2+} sigue siendo un tema sin esclarecerse. Tanto receptores citoplásmicos (clásicos) como receptores de membrana plasmática para progesterona se han reportado en los espermatozoides humanos (Losel *et al.*, 2005).

Sin embargo, todo parece indicar que el receptor involucrado en el efecto que induce la progesterona es a través de un receptor acoplado a proteínas G (GPCR), esto con base en que Zhu y colaboradores (2003); quienes reportaron la presencia de un receptor GPCR para progestina en ovocitos de peces; así como su homólogo (mPR α) en testículos humanos y mediante inmunocitoquímica, el mismo grupo, determino la localización de la proteína mPR en la pieza

media del espermatozoide, convirtiéndolo como un buen candidato como receptor de progesterona (Thomas *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2003a; Zhu *et al.*, 2003b).

Lo que es interesante de este estímulo dado por la progesterona es el hecho de que su efecto en el espermatozoide es distinto dependiendo de su concentración (Bedu-Addo *et al.*, 2007).

Roldán y colaboradores (1994) demostraron que la progesterona actúa como inductor a nivel del receptor ácido gamma-aminobutírico (GABA), esta interacción promueve una salida de Cl⁻ preparando al espermatozoide para su interacción con la ZP. Por otra parte, Harper y Publicover (2005) demostraron que cuando el espermatozoide se expone a un gradiente de progesterona, situación similar a lo que ocurre fisiológicamente; se produce un ligero aumento en la [Ca²⁺]_i, de modo que ~30% de las células presentan oscilaciones en la concentración de Ca²⁺ intracelular. Dicho porcentaje de células que manifiestan este patrón no sufren la RA, pero en cambio muestran un patrón de actividad flagelar asociado con aumentos y descensos de la concentración de calcio. Con base en estos resultados, los autores proponen que la RA y el batido del flagelo están regulados por almacenes de Ca²⁺ diferentes, con mecanismos independientes que responden frente a distintos agonistas, siendo la progesterona *in vivo* responsable de la activación de las oscilaciones de Ca²⁺ que regulan el batido flagelar y no de la RA.

El efecto de la progesterona en espermatozoides es mediado principalmente por tres rutas de señalización: un incremento rápido de la [Ca²⁺]_i y la fosforilación de proteínas tirosina, salida de Cl⁻ y estimulación de la fosfolipasa C(PLC) (Torres-Flores *et al.*, 2008; Baldi *et al.*, 1996).

Sí la progesterona actúa vía receptor acoplado a proteínas G, debe de algún modo de activar indirectamente un canal de Ca²⁺ en la membrana plasmática del espermatozoide, aunque aún sigue siendo imprecisa esta información ya que, Kilic y colaboradores (2009) utilizando fluorometría de flujo reportan que no hay ningún retraso en el incremento de Ca²⁺ inducido con progesterona, lo que sugiere que actúa directamente en un canal de Ca²⁺, por lo que sigue siendo controversial cuál es la vía o vías que activa la progesterona. Otro hallazgo interesante es el encontrado por Servin-Vences y colaboradores (2011), mediante imágenes de Ca²⁺ y utilizando progesterona enjaulada*, fue que el incremento de Ca²⁺ se da, casi simultáneo en la cabeza así como en el flagelo de

*Progesterona modificada químicamente con un grupo fotosensible, que al ser irradiada con luz UV, se remueve el grupo fotosensible, convirtiéndose así en progesterona biológicamente activa (Ellis-Davies, 2007; Mayer y Heckel, 2006). 23

espermatozoides humanos y no en onda de la base del flagelo a la cabeza, como se había reportado en espermatozoides de ratón, sugiriendo diferencias en las vías de señalización.

Sigue habiendo inconsistencias en el origen de la respuesta dada por la progesterona, y hasta la fecha no se han reportado compuestos que inhiban el incremento de Ca^{2+} inducido con la progesterona. Sin embargo, la información que hasta ahora se tiene, parece indicar que la progesterona activa más de una vía de entrada de Ca^{2+} en el espermatozoide (Guzman-Grenfell y González-Martínez, 2004; Kirkman-Brown *et al.*, 2003; Aitken *et al.*, 1996).

2.3.-Efecto de las prostaglandinas en el espermatozoide humano.

Las prostaglandinas (PGs) son un conjunto de sustancias de carácter lipídico derivadas de los ácidos grasos de 20 carbonos (eicosanoides) que contienen un anillo ciclopentano y constituyen una familia de mediadores celulares. Junto con los tromboxanos, forman la familia de los prostanoides; ambos son derivados de los ácidos grasos de las membranas celulares. Las PGs se derivan del ácido araquidónico, el cuál es catalizado por las enzimas ciclooxigenasas (COX) (Buecher *et al.*, 2001). Ya que son moléculas de señalización de vida media corta, actúan como mensajeros autocrinos y paracrinos.

La primera molécula de esta familia fue aislada del fluido seminal y el nombre le fue asignado debido a que se creía que provenía de la próstata. Posteriormente, se identificó que el órgano encargado de secretar las PGs al fluido seminal es la vesícula seminal; mientras que la próstata y los testículos sintetizan solo pequeñas cantidades. Sin embargo, se encuentran en las células de todo el cuerpo. Hay seis tipos, A, B, C, D, E y F, el grado de saturación de la cadena lateral es designado por los subíndices 1, 2 y 3.

A pesar de su identificación en el fluido seminal, su papel fisiológico en la fecundación todavía no es muy claro. La presencia de PGs en el semen humano facilitaría la fecundación; ya que se han descrito acciones como dilatación del cuello uterino, aumento de la movilidad del cuerpo uterino y de las trompas de Falopio, con lo que se facilitaría el ascenso espermático (Kelly, 1981). Sin embargo; el papel de las PGs en el semen es todavía objeto de conjeturas, pese a que se ha reportado que hombres con bajas concentraciones de PGs en el líquido seminal son infértiles. El semen de hombres fértiles contiene cerca de 400 $\mu\text{g/ml}$ de PGE y PGF, existiendo 20 veces más PGE que PGF (Wathes *et al.*, 2007).

Las PGs (principalmente del tipo PGE₁) (Figura 8B), son componentes activos del líquido folicular. Al igual que la progesterona se ha reportado que inducen la reacción acrosomal de hámster y de humanos, mediante el influjo de Ca²⁺ extracelular hacia el citoplasma de los espermatozoides, y además la respuesta de ambos inductores es aditiva; cabe señalar que aunque también este presente PGF, este tipo de PGs no induce un incremento del Ca²⁺ intracelular en el espermatozoide humano (Figura 9A y E) (Schaefer *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1998).

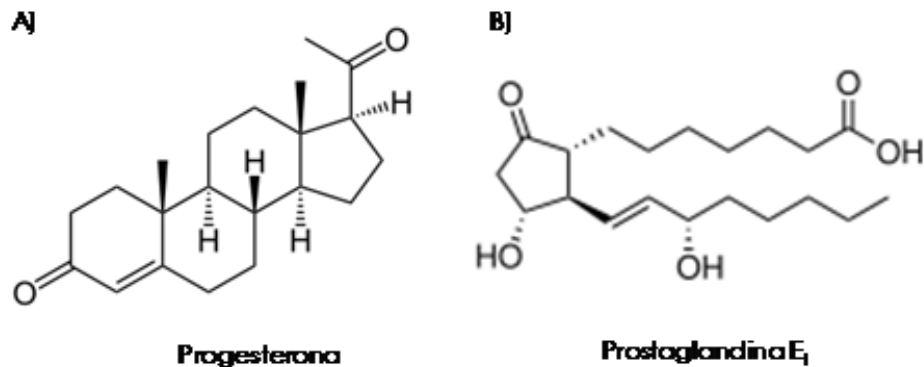


Figura 8. Estructura química de la progesterona y de la PGE₁

Este influjo se debe principalmente a la entrada de Ca²⁺ extracelular, ya que la remoción del Ca²⁺ extracelular impide este incremento (Figura 9) (Shimizu *et al.*, 1998).

La acción de las PGs en las células es a través de receptores acoplados a proteínas G. Se han identificado varios tipos de receptores para PGs (Narumiya *et al.*, 1999). Experimentos con fármacos específicos como: la toxina *pertussis* no inhiben el influjo de Ca²⁺ inducido con PGE₁, por lo que su vía de acción en el espermatozoide es dada por una vía insensible a la toxina *pertussis* sugiriendo que la familia de proteínas G_{q/11} probablemente estén mediando esta señalización de Ca²⁺ a través de la cascada de señalización de la fosfolipasa C (PLC), pero aún no se sabe la identidad molecular del canal que permite la entrada de Ca²⁺ (Figura 9) (Schaefer *et al.*, 1998).

Es posible inhibir el incremento en la [Ca²⁺]_i y la RA inducido por PGE₁ con La³⁺, Gd³⁺ y Zn²⁺ en un rango micromolar (μM). Se sabe que el fluido seminal humano contiene una alta concentración de Zn²⁺ (mM), la cual podría interferir con el efecto de PGE₁ del mismo fluido.

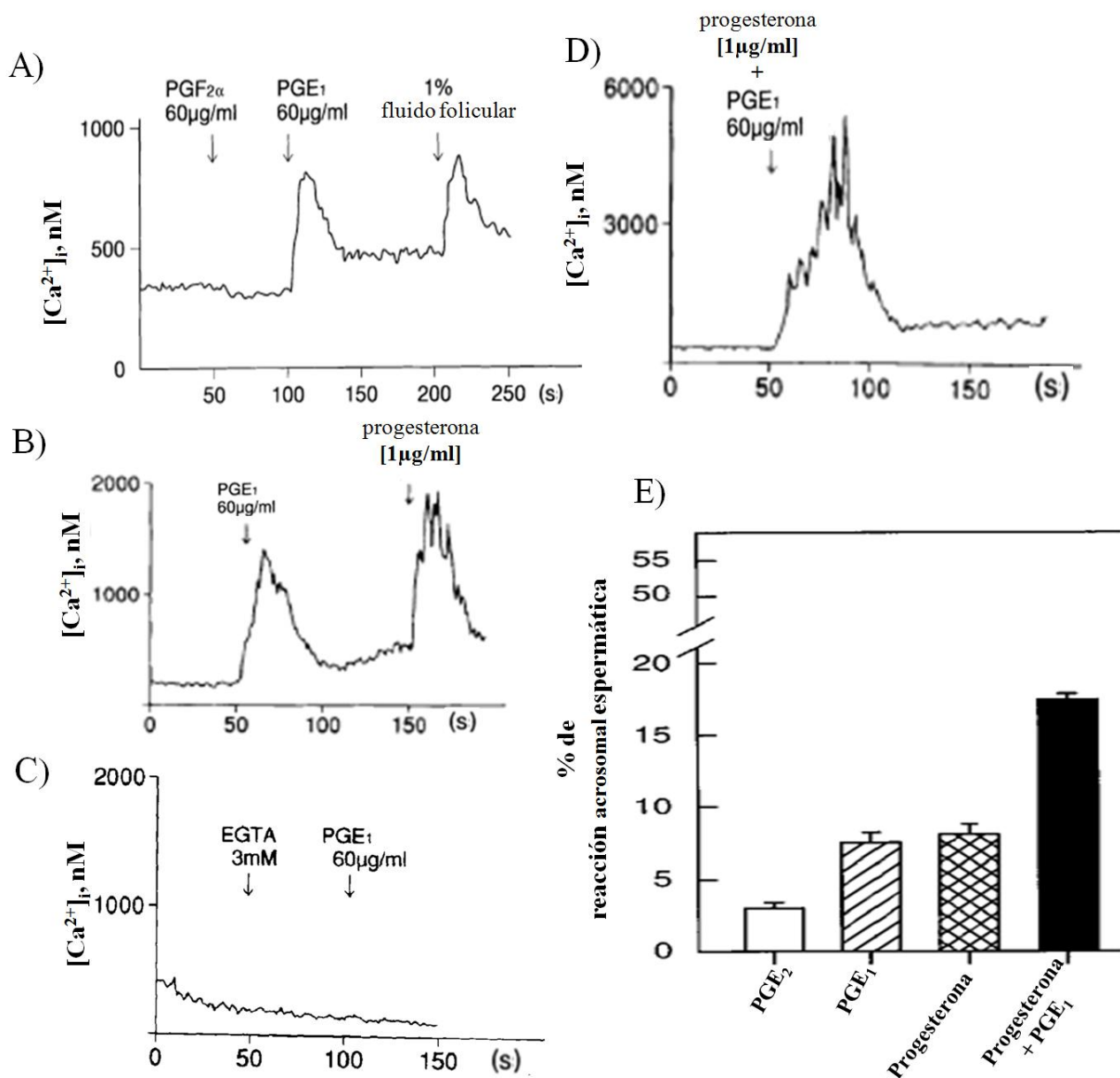


Figura 9. Efecto de la Prostaglandina E₁ y la progesterona en el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y en la RA. A) Efecto de la administración de prostaglandina F_{12α} (PGF_{12α}) en la $[Ca^{2+}]_i$. Como se puede notar la aplicación de 60 μg/ml no tuvo ningún efecto en la $[Ca^{2+}]_i$ mientras que 60 μg/ml de PGE₁ o 1% del fluido folicular si aumentaron la $[Ca^{2+}]_i$. B) Efecto de la administración de 60 μg/ml de PGE₁ en la $[Ca^{2+}]_i$ con una adición posterior de 1 μg/ml de progesterona, ambos incrementaron la $[Ca^{2+}]_i$. C) La adición de 3 mM de EGTA suprime el efecto de 60 μg/ml de PGE₁. D) La administración de 60 μg/ml de PGE₁ + P4 duplican el efecto en la $[Ca^{2+}]_i$ (tienen una respuesta aditiva). E) Inducción de la RA por diferentes agonistas en espermatozoides humanos capacitados. Concentración aplicada en todos los casos 1 μM. 200 espermatozoides fueron evaluados en un único ensayo. Los datos representan la media ± ES (n= 16-32) de 4 experimentos independientes. (A-D reportados por Shimizu *et al.*, 1998 y E por Schaefer *et al.*, 1998).

El ensayo de la unión de PGE₁ marcado por radioisótopo reportado por Schaefer y cols. (1998), muestra que los espermatozoides humanos tienen receptores específicos a PGE₁. Este dato es interesante, ya que la selectividad de los receptores para PGs de tipo E que se conocían hasta el momento presentaban una mayor selectividad al tipo E₂ con respecto a E₁ (PGE₂ >PGE₁). Esta diferencia, permite presuponer que el espermatozoide de humano probablemente tiene un receptor aun no identificado, con una selectividad inversa al resto de las células (PGE₁>PGE₂) (EC₅₀: 10 nM y 300 nM, respectivamente) (Figura 9E) (Sugimoto y Narymiya, 2007; Breyer, 2001; Schaffer *et al.*, 1998).

Durante el proceso de fecundación se han reportado varias fuentes de PGs que podrían estimular al espermatozoide, entre ellas las células del cumulus, el oviducto y el mismo espermatozoide (Kodithuwakku *et al.*, 2007; Espey y Lipner, 1994; Harper, 1994). No obstante, hasta ahora no existe ningún reporte sobre los efectos de las PGs en la movilidad del espermatozoide. Considerando que la PGE₁ incrementa la [Ca²⁺]_i del espermatozoide, esta molécula probablemente tenga un papel relevante en la movilidad espermática durante su trayectoria rumbo al ovocito y por ende en la función esencial del espermatozoide que es la fecundación.

III. JUSTIFICACIÓN

La modulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular es fundamental para entender los mecanismos involucrados en aspectos específicos de la fisiología del espermatozoide, tales como: la movilidad hiperactivada, la capacitación y la RA. CatSper es un canal específico de los espermatozoides, y su función se ha asociado principalmente con el desarrollo de la hiperactivación, ya que espermatozoides de ratón “knock out” para CatSper son infértiles, esta infertilidad está asociada a la incapacidad a hiperactivarse (Qi *et al.*, 2007). En seres humanos se ha detectado la supresión del gen CatSper en varios hombres infértiles (Hildebran *et al.*, 2010; Hildebran *et al.*, 2009) y se sabe que la hiperactivación está asociada con la fertilidad en los seres humanos. Así mismo, la progesterona es uno de los inductores fisiológicos más estudiado hasta la fecha, y se ha reportado la correlación de la respuesta de Ca^{2+} inducida con progesterona y la capacidad para fecundar (Krausz *et al.*, 1996).

Por otra parte, la participación de las PGE_1 en el incremento del Ca^{2+} intracelular en espermatozoides humanos se ha estudiado menos y el efecto que tiene este agonista es muy similar al de la progesterona. Además, la distribución de PGE_1 a lo largo de todo el TGF sugiere una influencia fisiológica sobre el espermatozoide. Con base a lo anterior, en el presente trabajo se estudio el incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por PGE_1 , así como de progesterona en el espermatozoide humano, lo cual permitió conocer de una forma más clara, el efecto o el papel que tienen estos agonistas sobre la fisiología del espermatozoide humano.

IV. HIPÓTESIS

Hipótesis general:

Prostaglandina E_1 y progesterona son inductores de incrementos de Ca^{2+} intracelular en espermatozoides humanos, dado que en estas células el CatSper contribuye en los incrementos de Ca^{2+} , entonces estos canales pudieran ser sujetos a la modulación directa por estos agonistas.

Hipótesis particulares:

- El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por prostaglandina E_1 se verá estimulado por el incremento del pH_i .
- El mibefradil, un bloqueador del CatSper, inhibirá el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por prostaglandina E_1 y progesterona.
- La adición de PGE_1 , progesterona y el mibefradil no tendrán ningún efecto sobre el pH_i en los espermatozoides de humano.
- Sí CatSper es estimulado con PGE_1 y progesterona, entonces al quelar el Ca^{2+} externo se incrementará la permeabilidad a Na^+ y aumentara su concentración en el citoplasma de los espermatozoides humanos.
- El mibefradil inhibirá el incremento de la $[Na^+]_i$ en los espermatozoides de humano al ser estimulados con PGE_1 y progesterona.

V. OBJETIVO

General:

Evaluar la participación de CatSper en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PGE_1 y progesterona en espermatozoides humanos.

Particulares:

- Determinar el efecto de PGE_1 en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de humano, mediante la realización de una curva dosis-respuesta de prostaglandina E_1 .
- Evaluar el efecto de mibefradil sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ al ser estimulado con PGE_1 y progesterona, mediante la realización de una curva dosis-respuesta de mibefradil.
- Evaluar el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PGE_1 y progesterona en medio MEH ajustado a diferente pHs; así como, el efecto de mibefradil sobre este incremento.
- Evaluar el efecto de la adición de PGE_1 , progesterona y mibefradil sobre el pH_i en espermatozoides de humano.
- Evaluar el efecto de PGE_1 , progesterona y mibefradil en la $[Na^+]_i$ al quelar el Ca^{2+} externo en espermatozoides de humano.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Material y medios

El fura-2, AM, SBFI-AM y BCECF-AM se obtuvieron de Molecular Probes. Prostaglandina E₁ y progesterona se obtuvo de Sigma. Los otros reactivos se obtuvieron de Sigma o Merck. El medio para espermatozoides humanos (MEH) se preparo con la siguiente composición (mM): NaCl, 120; KCl, 4; NaHCO₃, 15; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; piruvato de sodio, 1; L-lactato de sodio, 10; D-glucosa, 5; HEPES-N bis, 25; pH 7.6.

6.2.- Purificación de los espermatozoides

El semen humano se obtuvo de 11 donantes entre los 22 y los 30 años con tres días de abstinencia sexual como tiempo mínimo y seis días como máximo. Los donadores conocieron y firmaron una carta de consentimiento informado sobre el uso experimental de su muestra y donde se nos notificó que no seguían ningún tratamiento con algún tipo de fármaco.

Las muestras fueron seleccionadas según las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud, es decir, con parámetros normales, de acuerdo con el siguiente criterio: densidad celular $\geq 20 \times 10^6$ espermatozoides/ml; movilidad $> 50\%$ y con una morfología $>14\%$ de espermatozoides normales (WHO, 2010) (Anexo A). Una vez colectada la muestra, se incubó 30 minutos a 37 °C para su licuefacción.

Con la finalidad de trabajar solo con los espermatozoides vivos, se realizó la separación de éstos del plasma seminal por centrifugación en un gradiente discontinuo de percoll isotónico a 75 % y 50 % (ambos gradientes amortiguados a pH 7.4 con HEPES 10 mM y NaCl 150 mM) por 20 minutos a 3500 rpm en tubos cónicos de 15 ml (Linares-Hernández *et al.*, 1988).

Después de centrifugar la pastilla obtenida (espermatozoides) en la parte cónica fue separada y lavada también por centrifugación 5 minutos a 3500 rpm. Los espermatozoides se lavaron con MEH.

6.3.-Carga con Fura-2, AM para la determinación de calcio intracelular en el espermatozoide de humano.

Los espermatozoides purificados ($0.6-1.5 \times 10^8$ 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 esterases separan al acetoximeto, haciendo al colorante sensible al Ca^{2+} . Una vez pasado el tiempo, se lavaron las células por centrifugación 5 min a 3500 rpm con 5 ml de medio MEH. Los espermatozoides se subdividieron e incubaron en 5 ml de medio MEH a 37°C por 10 min para la medición de Ca^{2+} intracelular.

6.4. Medición de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se midió con el colorante fluorescente Fura-2, AM. Los espermatozoides cargados con Fura-2, AM (1×10^7 espermatozoides) se centrifugaron a 3500 rpm por 3 min. La pastilla (100 μl) se añadió inmediatamente a la celda que contenía 2.5 ml de MEH, previamente calentada a 37°C y bajo agitación magnética constante. La fluorescencia se cuantificó con un espectrofluorómetro PTI (*Photon Technology International*). El fluorómetro tiene un fotomultiplicador colocado a 90° con respecto a la fuente de la lámpara de Xenón (Figura 10). El fotomultiplicador detecta la señal de Fura-2, AM con un filtro de 488 nm (Andover), la excitación fue a 340/380 nm con el monocromador de excitación del sistema PTI. Los datos se adquirieron y digitalizaron a 0.83 Hz con la interfase PTI.

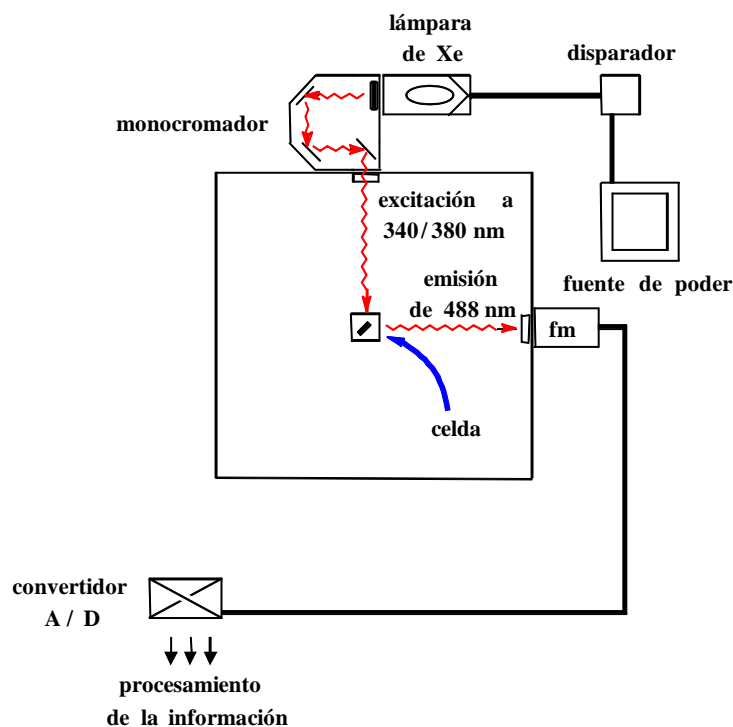


Figura 10. Representación esquemática del sistema óptico para la medición de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se ilustra la posición del monocromador con respecto a la celda. El sistema de agitación se adaptó en la parte inferior de la celda, la cual cuenta con un termo-estabilizador incluido en el equipo (espectrofluorómetro PTI).

6.4.1.- Calibración de la $[Ca^{2+}]_i$.

Los registros de Ca^{2+} se calibraron como se muestra en la figura 11, añadiendo 5 μM de ionomicina, que permeabiliza la célula a Ca^{2+} y satura el fura, con lo que se obtuvo la relación 340/380 nm máxima (Rmax); posteriormente se queló el Ca^{2+} con 6 mM EGTA + 0.12 % Tritón X-100 para obtener la relación 340/380nm sin Ca^{2+} (Rmin). Los valores de R a lo largo del registro, se convirtieron a valores de Ca^{2+} intracelular con la ecuación descrita por Grynkiewicz (Grynkiewicz *et al.*, 1985):

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

en donde $\beta = (F_{f380}/F_b380)$, esto es, la relación de fluorescencias detectadas excitando a 380 nm en medio sin Ca^{2+} (EGTA-tritón) y con Ca^{2+} (ionomicina), respectivamente (Figura 11). La Kd que es la constante de disociación, para el fura-2, AM es de 260 nM (Neri-Vidaurre *et al.*, 2006). Finalmente los datos se expresaron como $\Delta [Ca^{2+}]_i$.

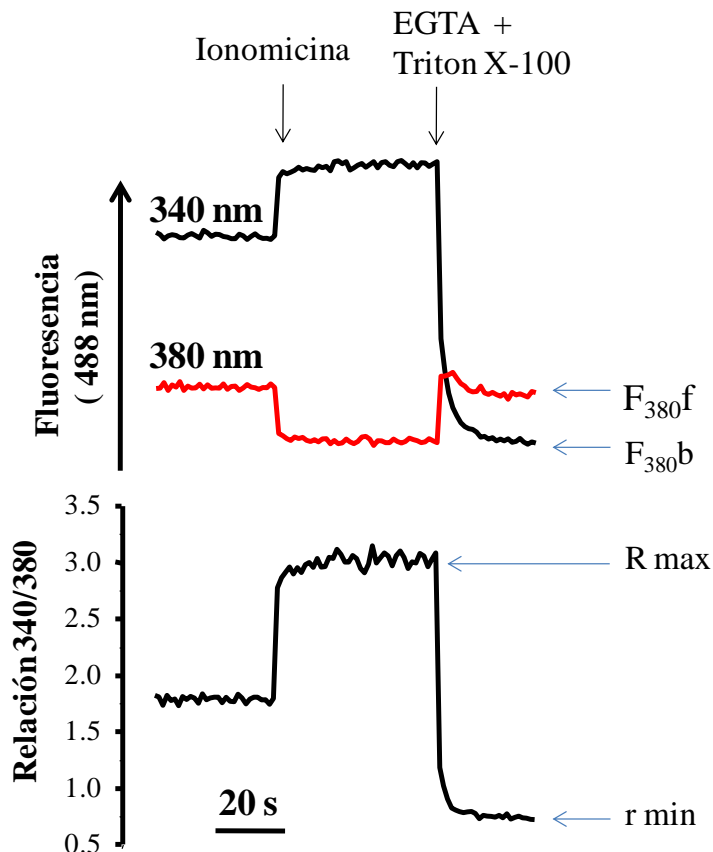


Figura 11. Registro de calibración para la $[Ca^{2+}]_i$. Después de terminar cada uno de los experimentos, en éste se comienza uno nuevo. Después de 60 segundos se agrega ionomicina (5 μM) posteriormente a los 120 segundos se agrega simultáneamente EGTA (6 mM) más triton X-100 (0.12 %), se sustituyen los valores en la ecuación de Grynkiewicz, para obtener la $[Ca^{2+}]_i$.

6.5. Carga con BCECF-AM y determinación de pH_i .

Después de la separación de los espermatozoides del líquido seminal, se dividió la muestra en 5 alícuotas y se llevaron a 1 ml con MEH a diferentes pHs: 7.2, 7.4, 7.6, 7.8 y 8.0. Cada una de las alícuotas se cargaron con 1 μ M por 30 min de la sonda fluorescente carboxietil-carboxifluoresceína acetoxi-metilado (BCECF-AM), 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 (λ de emisión del fluoróforo sensible a pH) y a 440 nm (λ de emisión del fluoróforo independiente al pH).

Para calibrar la señal, se permeabilizaron las células con 0.12 % Tritón X-100. 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 MEH, de acuerdo a la condición experimental a la que se estuviera trabajando (pH 7.2, 7.4, 7.6, 7.8 y 8.0) (Figura 12 a y b).

Posteriormente se acidificó a tres valores diferentes mediante adiciones de HCl (10 μ L) al 0.3% (Figuras 12a y b) y se compararon los valores de R con los pH medidos con un electrodo de pH en cada administración (Figura 12c), 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 12d) (Neri-Vidaaurri, 2007; Fraire-Zamora y González-Martínez, 2004).

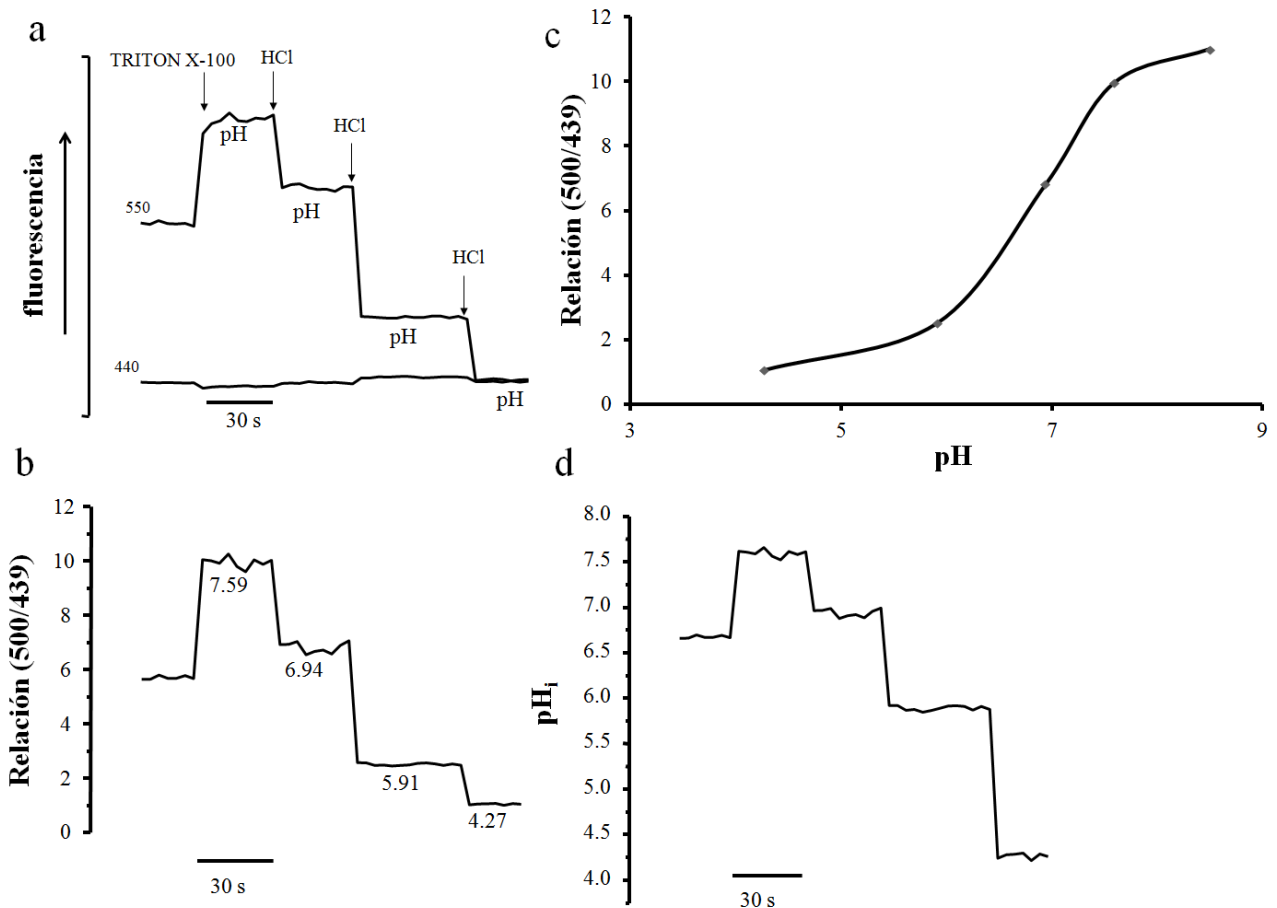


Figura 12. Calibración de la señal de pH_i . a-b. Se permeabilizaron las células con 0.12 % Tritón X-100. Esta permeabilización aumentó el valor de R (fluorescencia a 550 nm y su excitación a 500 nm dividida entre 440 nm: 500/440) a un valor correspondiente al pH del medio MEH, (el ejemplo en la figura es a 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 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 (Modificada de Neri-Vidaurre, 2007; Fraire-Zamora y González-Martínez, 2004).

6.6.- Cargado del detector de sodio SBFI-AM.

Los espermatozoides purificados ($0.6-1.5 \times 10^8$ células) se cargaron con 20 μ M del derivado acetoximetil éster de SBFI (SBFI-AM) por 90 min a 37 °C en presencia del detergente ácido plurónico (0.06 %). El principio de cargado es el mismo que el del fura 2-AM. La unión al Na^+ 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 13). La relación de estas fluorescencias se utilizó para la calibración de la señal (Torres-Flores *et al.*, 2008).

6.6.1.- Calibración de la $[Na^+]_i$.

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

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

Se utilizó una $Kd = 9.45 \pm 0.70$ mM como se describe en Torres-Flores y colaboradores (2008).

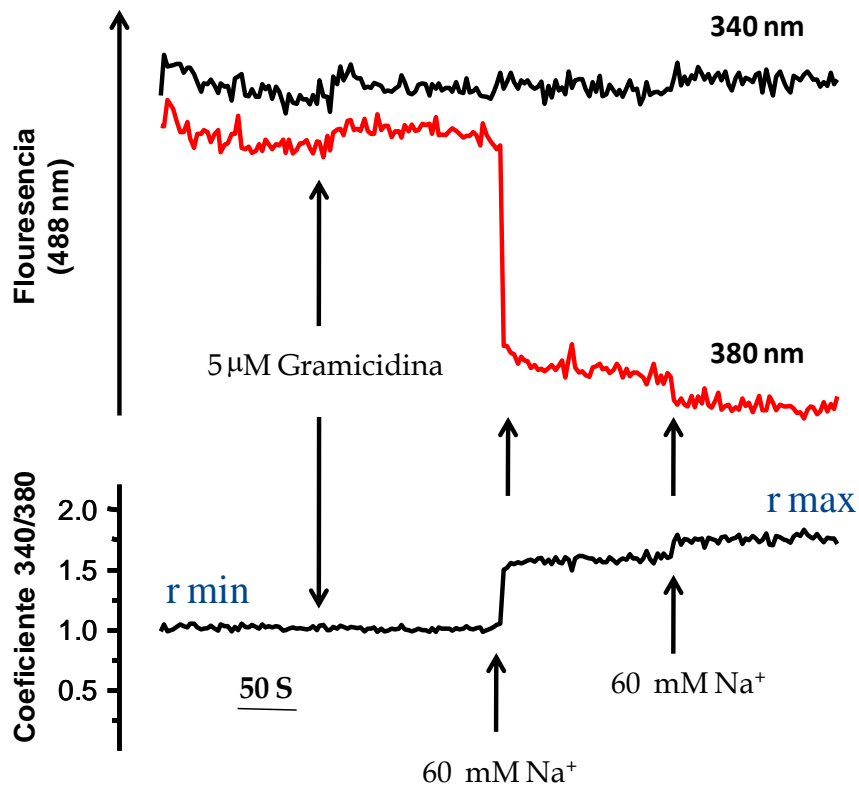


Figura 13. Calibración de la señal de Na^+ . Después de terminar cada uno de los experimentos se calibra como se indica. Se incuban los espermatozoides en medio sin Na^+ por 20 min. En el registro después de 60 segundos (s) se agrega gramicidina (5 μM) posteriormente a los 120 y 180 s se agrega 60 mM de NaCl, finalmente los valores obtenidos se sustituyen en la ecuación de Grynkiewicz para obtener la $[Na^+]_i$.

6.7. Ensayos experimentales.

6.7.1.- Curva dosis-respuesta de prostaglandinas tipo E_1 .

Los espermatozoides cargados con Fura-2, AM (1×10^7 espermatozoides) se subdividieron en 7 alícuotas e incubaron en 6 ml de medio MEH (pH 7.6) a 37 °C por 10 min para que se

homogenizaran. Una vez homogenizada las alícuotas, se fueron sacando una por una y se centrifugaron a 3500 rpm por 3 min. La pastilla (100 μ l) se añadió inmediatamente a la celda que contenía 2.5 ml de MEH, previamente calentada a 37 °C y bajo agitación magnética constante. Se estimularon con diferentes concentraciones de prostaglandinas E₁ (1 nM-40 μ M) para la realización de una curva dosis-respuesta (Tabla 1), tomándose como control positivo la progesterona, ya que esta respuesta es una de las más estudiadas (Bedu-Addo *et al.*, 2008; Bedu-Addo *et al.*, 2007; Harper y Publicover, 2005; Kirkman-Brown *et al.*, 2000; Blackmore, 1993; Thomas y Meizel, 1989).

Cada trazo se estimuló después de 60 s de que comenzó el registro, es decir; se añadió 5 μ l del compuesto a probar (diferentes [PGE₁]) y se detenía en el segundo 150. El control consistió en añadir 5 μ l de progesterona (P) (Tabla 1). La fluorescencia se cuantificó con un espectrofluorómetro PTI (*Photon Technology International*) usando un filtro de 488 nm y se excitó a 340/380 nm con el monocromador de excitación del sistema PTI.

ESPERMATOZOIDES + Medio MEH	prostaglandina E ₁ (PGE ₁)	progesterona (P)
Alícuota 1 Control		4 μM
Alícuota 2	1 nM	-
Alícuota 3	10 nM	-
Alícuota 4	100 nM	-
Alícuota 5	1 μM	-
Alícuota 6	10 μM	-
Alícuota 7	20 μM	-
Alícuota 8	40 μM	-

Protocolo del registro de fluorescencia

Tabla 1. Tratamientos y protocolo del registro de fluorescencia para la curva dosis-respuesta de PGE₁. Las muestras se incubaron a 37°C.

6.7.2.- Curva dosis-respuesta de mibefradil

Los espermatozoides se trataron como ya se describió previamente en la curva dosis-respuesta de PGE₁. Cada trazo se estimuló después de 120 s de que comenzó el registro, es decir; se añadió 5 µl del compuesto inductor a probar (progesterona (P) o PGE₁) y se detenía en el segundo 210. El mibefradil se incorporó a la muestra 60 s antes del estímulo con el inductor (Tabla 2).

ESPERMATOZOIDES + MEH	mibefradil	P [4µM]	PGE ₁ [1µM]
Alícuota 1		+	
Alícuota 2			+
Alícuota 3	2.5 µM	+	
Alícuota 4	2.5 µM		+
Alícuota 5	5 µM	+	
Alícuota 6	5 µM		+
Alícuota 7	10 µM	+	
Alícuota 8	10 µM		+
Alícuota 9	20 µM	+	
Alícuota 10	20 µM		+

Protocolo del registro de fluorescencia

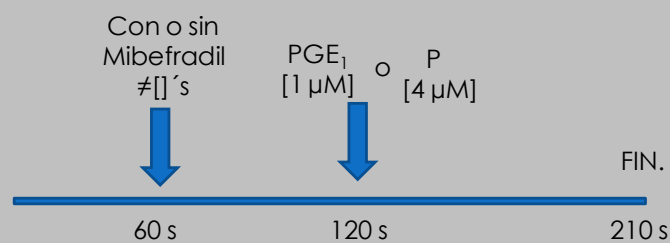


Tabla 2. Tratamientos y protocolo del registro de fluorescencia aplicada para la curva dosis-respuesta de Mibefradil. Las muestras de semen (divididas en 10 alícuotas). Las muestras se incubaron a 37 °C.

6.7.3.- Efecto de PGE₁ y mibefradil en el incremento de la [Ca²⁺]_i en medio MEH a diferentes pHs.

Los espermatozoides se trataron como ya se describió previamente en las curvas dosis-respuesta. Se trabajaron en 5 pHs diferentes (7.2, 7.4, 7.6, 7.8 y 8.0). Para el caso de progesterona o PGE₁ cada trazo se estimuló después de 120 s de que comenzó el registro, es decir; se añadió 5 µl del compuesto a probar y se detenía en el segundo 210. El mibefradil se incorporó a la muestra 60 segundos antes del estímulo ya sea con progesterona o PGE₁ a los diferentes pHs del MEH (Tabla 3). El protocolo que se siguió fue el que se muestra en la tabla 2, salvo, utilizando solo una concentración de mibefradil ([20 µM]).

		Mibefradil	P	PGE ₁
		[20 µM]	[4 µM]	[1 µM]
Espermatozoides en MEH a diferentes pHs	pH 7.2		+	
				+
		+	+	
				+
	pH 7.4		+	
				+
		+	+	
				+
	pH 7.6		+	
				+
		+	+	
				+
pH 7.8		+		
			+	
	+	+		
			+	
pH 8.0		+		
			+	
	+	+		
			+	

Tabla 3. Tratamientos para la determinación de la [Ca²⁺]_i a diferentes pHs. Las muestras se dividieron en 12 alícuotas y se incubaron a 37 °C.

6.7.4.- Protocolo para la determinación del efecto de progesterona, PGE₁ y mibefradil sobre el pH_i.

Una vez cargadas las células con BCECF-AM, como ya se describió; se dividió la muestra en 12 alícuotas (Tabla 4). A los 60 segundos se añadió 5 µl de mibefradil [20 µM], 60 s después progesterona [4 µM] o PGE₁ [1 µM] y 60 s después [10 mM] NH₄.

Espermatozoides en MEH a diferentes pHs		Mibefradil [20 µM]	P[4 µM]	PGE ₁ [1 µM]	NH ₄ [10 mM]	
	pH 7.2		+	+		+
			+		+	+
	pH 7.4		+	+		+
			+		+	+
	pH 7.6			+		+
					+	+
			+	+		+
	pH 7.8		+	+		+
		+		+	+	
pH 8.0		+	+		+	
		+		+	+	

Protocolo del registro de fluorescencia

[4 µM] Progesterona

○

[1 µM] PGE₁ [10 mM] NH₄

↓ ↓

—————

120 s 180 s

[4 µM] Progesterona

○

[20 µM] Mibefradil [1 µM] PGE₁ [10 mM] NH₄

↓ ↓ ↓

—————

60 s 120 s 180 s

Tabla 4. Tratamientos y protocolo del registro de fluorescencia aplicada para la determinación de pH_i. Las muestras se incubaron a 37 °C.

6.7.5.- Protocolo para la determinación del efecto de progesterona, PGE₁ y mibefradil sobre la [Na⁺]_i.

Una vez cargadas las células con SBFI-AM, como ya se describió; se dividió la muestra en 5 alícuotas y se aplicó el siguiente protocolo (Tabla 5):

ESPERMATOZOIDES + MEH (pH 7.6)	mibefradil [20 μM]	EGTA [3.5 mM]	EGTA [3.5 mM] +P [4 μM]	EGTA [3.5 mM] +PGE ₁ [1 μM]	Ca ²⁺ [2 mM]
Alícuota 1		+			+
Alícuota 2			+		+
Alícuota 3				+	+
Alícuota 4	+			+	+
Alícuota 5	+		+		+

Protocolo del registro de fluorescencia

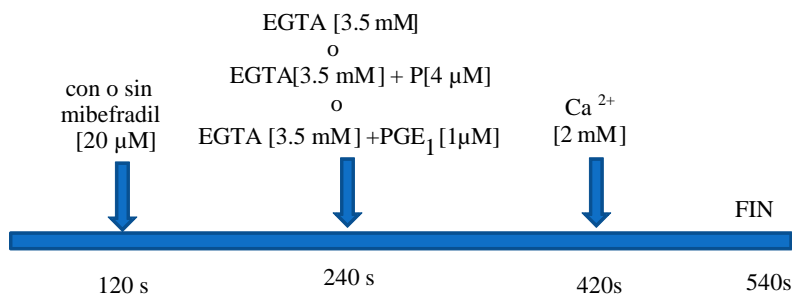


Tabla 5. Tratamientos y protocolo del registro de fluorescencia para la determinación de la [Na⁺]_i. Las muestras se incubaron a 37 °C.

6.8.- Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media ± error estándar (ES). Se aplicó una ANOVA y una prueba de Tukey donde los valores de P < 0.05 fueron aceptados como diferencias significativas de acuerdo a los datos obtenidos de cada experimento. El análisis de los datos se realizó con el software STATISTICA (data analysis software system) versión 7.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.- Efecto de PGE₁ en espermatozoides de humano.

De acuerdo con los antecedentes se decidió realizar una curva dosis-respuesta con la finalidad de determinar la concentración de PGE₁ donde se alcanza el 50% de respuesta máxima (EC₅₀) en espermatozoides no capacitados, basados en las concentraciones reportadas por Schaefer y colaboradores (1998).

La Figura 14 muestra el efecto en el incremento de la [Ca²⁺]_i en los espermatozoides humanos no capacitados al ser estimulados con las diferentes concentraciones de PGE₁, donde se observa el efecto dosis-dependiente que tiene este lípido sobre la [Ca²⁺]_i en los espermatozoides, observándose la máxima respuesta a 40 μM (Figura 14A). Sin embargo, desde 1 hasta 40 μM el efecto que tienen las PGE₁ no mostraron diferencias significativas (Anexo B). Las diferencias significativas se presentaron en dosis más bajas (1 y 100 nM), indicando que 1 μM de PGE₁ induce casi la máxima respuesta.

Se obtuvo la EC₅₀ para el promedio de los datos (n=3) ajustando este promedio con la ecuación de Hill (línea roja en la figura 14B), dando 207 ± 104 nM. Este valor fue más grande que el obtenido por Schaefer y colaboradores EC₅₀: 10 nM (1998). En nuestros experimentos, al igual que lo que reporta Shimizu y colaboradores (1998) la respuesta de Ca²⁺ inducida con PGE₁ mostró mucha variabilidad entre donadores e incluso entre las muestras del mismo donante evaluadas en diferente día. Estas diferencias podrían ser reflejo de la heterogeneidad de las muestras, ya que en los experimentos se utilizaron espermatozoides de solamente 3 donadores. Por otro lado, progesterona induce el incremento de la [Ca²⁺]_i de manera más constante (menos variable) comparado a la respuesta de PGE₁. Considerando que se encuentran prostaglandinas y Zn²⁺ (inhibidor) en el líquido seminal, la alta variabilidad de la respuesta a PGE₁ podría ser atribuida a efectos de compuestos activos del líquido seminal de cada donador. Hemos observado que la función espermática varía entre eyaculados; además, los donadores estuvieron sujetos a diferentes variables, como por ejemplo: cambios climáticos, cambios en la dieta, cambios en los niveles de estrés, etc.

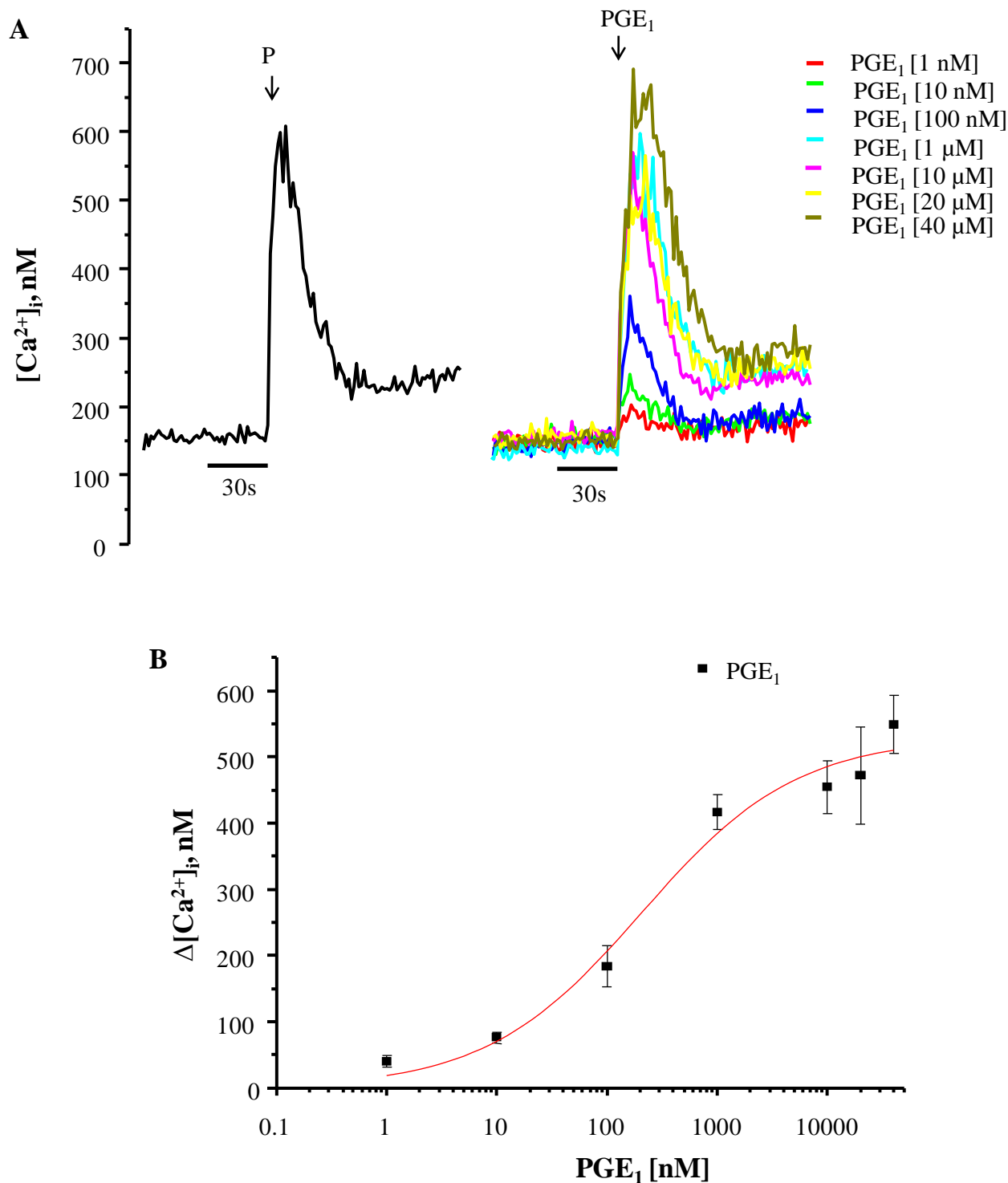


Figura 14. Efecto de las prostaglandinas tipo E₁ en espermatozoides de humano. A) Trazos representativos de la aplicación de diferentes concentraciones de PGE₁: 1 nM (trazo rojo), 10 nM (trazo verde), 100 nM (trazo azul), 1 μM (trazo verde claro), 10 μM (trazo rosa), 20 μM (trazo amarillo) y 40 μM (trazo verde soldado). El trazo negro es la aplicación de 4 μM de progesterona (P) (control positivo). La flecha indica la adición del agonista. B) Incremento de Ca²⁺ en función de la concentración de PGE₁. La gráfica muestra el $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (Ca²⁺ intracelular en el pico menos el Ca²⁺ intracelular basal) expresado en media \pm ES de una n=3. A partir de 1 μM a 40 μM el efecto de PGE₁ fue significativamente diferente ($P < 0.05$) en comparación con las concentraciones más bajas. La línea roja es el ajuste con la ecuación de Hill ($R^2 = 0.979$. $EC_{50} = 207 \pm 104$ nM).

Por otro lado, antes de utilizar fura-2 como el indicador fluorescente para medir la $[Ca^{2+}]_i$, se realizó el mismo experimento con Fluo-3. Debido a que no se puede determinar el valor absoluto de la $[Ca^{2+}]_i$ con Fluo-3 sin realizar la calibración en cada muestra, se normalizó el valor de la respuesta por el cambio de la intensidad de fluorescencia (F/F_0) con lo que se determinó la EC_{50} de PGE_1 . Se obtuvo una EC_{50} de PGE_1 alrededor de 20 nM tanto en espermatozoides capacitados ($n=5$) como en no capacitados ($n=6$), además de que no se observaron diferencias en el incremento de Ca^{2+} inducido con PGE_1 entre capacitados y no capacitados (Anexo C). Estos valores son más cercanos al valor reportado por Schaefer y colaboradores (EC_{50} : 10 nM). La diferencia entre los dos experimentos no se puede explicar por la diferencia de la sensibilidad de ambos indicadores debido a que la K_d de fura-2, AM (260 nM) es más pequeña que la de fluo-3, AM (390 nM). Considerando que el número de experimentos de fura-2 fue pequeño ($n=3$), la diferencia podría explicarse por la particularidad de las muestras que utilizamos. Por otro lado, no se puede descartar la posibilidad de oxidación de PGE_1 en el transcurso del proyecto.

Se decidió utilizar 1 μM de PGE_1 , para inducir una respuesta casi saturante para experimentos subsecuentes; aunque se utilizó 20 μM de PGE_1 para explorar el efecto que tendría mibefradil en una concentración saturante (ver sección 7.2).

7.2. Efecto de mibefradil sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con PGE_1 y progesterona.

En una conferencia dada en el 11^o Simposio Internacional de Espermatología en Okinawa, Japón (Junio 24-29, 2010) reportaron, mediante un estudio de electrofisiología, que progesterona y prostaglandinas activan la corriente de CatSper en espermatozoide de humano. Recientemente se reportó que mibefradil, un bloqueador de canales de Ca^{2+} , bloquea el canal CatSper (Torres-Flores *et al.*, 2011). Por lo anterior, se decidió probar este fármaco y estudiar su efecto sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por estos agonistas (Figura 15).

La aplicación de 20 μM de mibefradil (M) 30 s previos a la adición de 4 μM de progesterona (P) o de 20 μM de PGE_1 inhibió el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, la inhibición fue del 92 % y del 80 % respectivamente, siendo significativamente diferentes comparado con sus controles (Figura 15B).

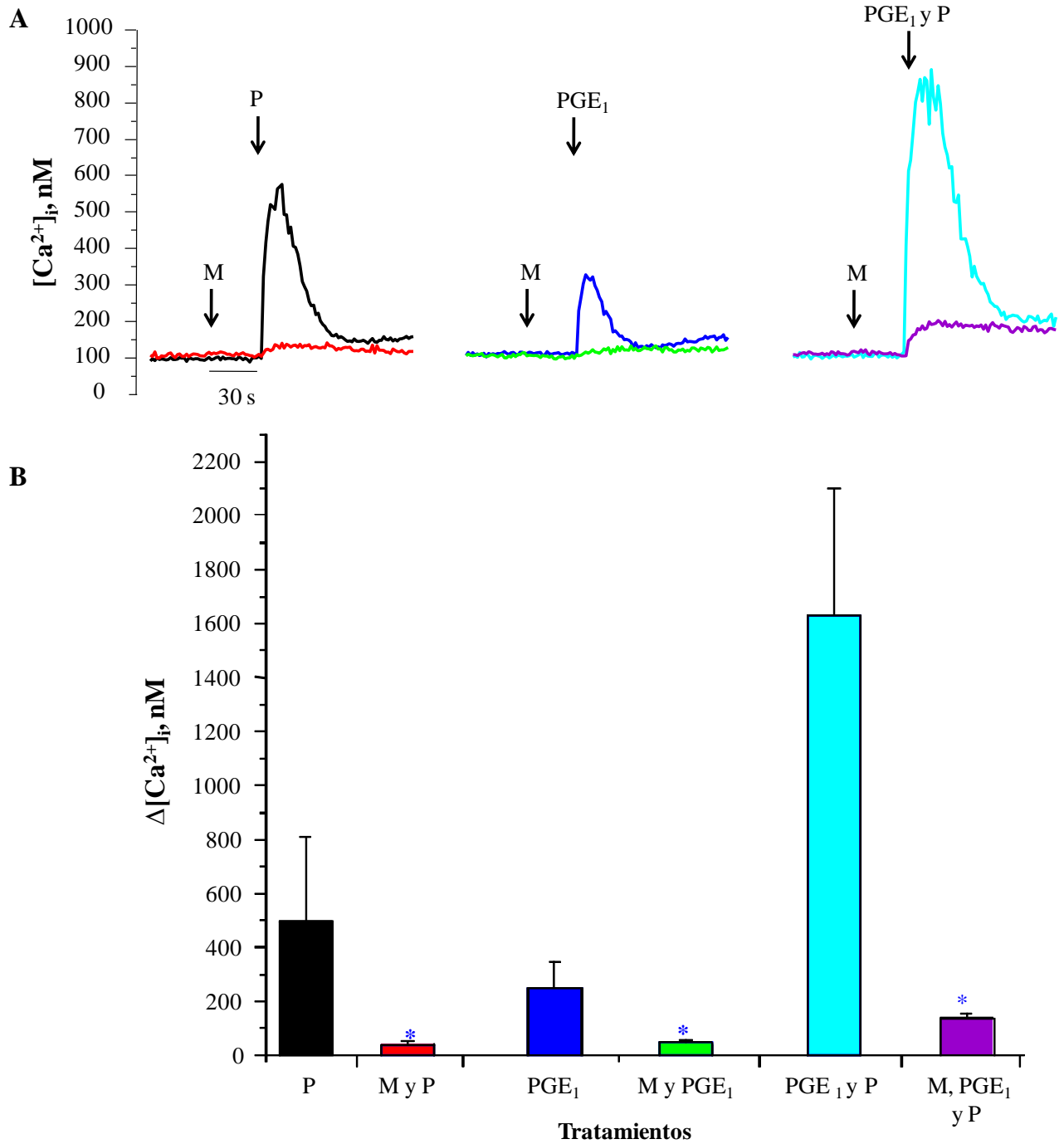


Figura 15. Efecto de mibefradil (M) sobre el incremento de Ca^{2+} intracelular inducido con PGE_1 y progesterona (P) en espermatozoides de humano. A) Trazos representativos del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con $4\mu M$ de progesterona (P) (trazo negro), $20\mu M$ de PGE_1 (trazo azul) o la adición de ambas (trazo cian) (controles). La adición de $20\mu M$ de mibefradil (M) 30 s antes (trazos rojo, verde claro y morado) inhibe el efecto producido por los agonistas, de modo significativo. Las flechas indican la adición del tratamiento. B) $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (diferencia entre el pico y la basal de la respuesta, el dato del Ca^{2+} basal se tomó antes de la adición de los agonistas). Media \pm ES de $n=3$. * indica diferencias significativas con su respectivo control ($P<0.05$).

Con base en los datos de Shimizu y colaboradores (1998) quienes reportaron que la adición simultánea de ambos agonistas incrementan el efecto sobre la $[Ca^{2+}]_i$, es decir, tienen un efecto aditivo; nos pareció interesante estudiar el efecto de la aplicación simultánea de 4 μM de progesterona y 20 μM de PGE_1 ; así como sobre la inhibición del pico de Ca^{2+} por mibefradil.

Como puede verse en la figura 15 la aplicación simultánea de ambos agonistas tuvo un efecto aditivo en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, y la aplicación de mibefradil 30 s antes de 20 μM de ambos inductores bloqueó el 91.5% del efecto aditivo de ambos agonistas; encontrándose de igual forma, diferencia significativa con su respectivo control.

Estos resultados, junto con los reportados por Shimizu y colaboradores (1998) muestran que la vía de señalización activada por PGE_1 y progesterona no se desactiva o desensibiliza, ejerciendo una rápida acción por un receptor en la membrana plasmática del espermatozoide con un sitio de unión diferente para cada agonista. Además la presencia de ambos agonistas en el líquido folicular se ha correlacionado con un mecanismo común para inducir el incremento de Ca^{2+} en los espermatozoides de varones fértiles e infértiles, revelando que el incremento de Ca^{2+} es directamente proporcional a la capacidad de fecundación (Shimizu *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1993; Blackmore *et al.*, 1991).

Debido a que 20 μM de mibefradil tuvo un efecto inhibitorio sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido tanto por progesterona como PGE_1 , se realizó una curva dosis-respuesta de mibefradil, para determinar su IC_{50} en el incremento de Ca^{2+} inducido por ambos agonistas.

7.3. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de mibefradil sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con PGE_1 o progesterona.

La figura 16A muestra los trazos representativos obtenidos por espectrofluorimetría del efecto de mibefradil sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de humano. Se obtuvo una inhibición de manera dosis dependiente sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por los agonistas. Sin embargo, se pudo observar que la adición de 2.5 μM de mibefradil no inhibe el pico de Ca^{2+} estimulado por los agonistas e incluso incrementó la $[Ca^{2+}]_i$ al ser estimulados los espermatozoides con PGE_1 un 41 % más, respecto a su control, siendo un incremento significativo (*, Figura 16C).

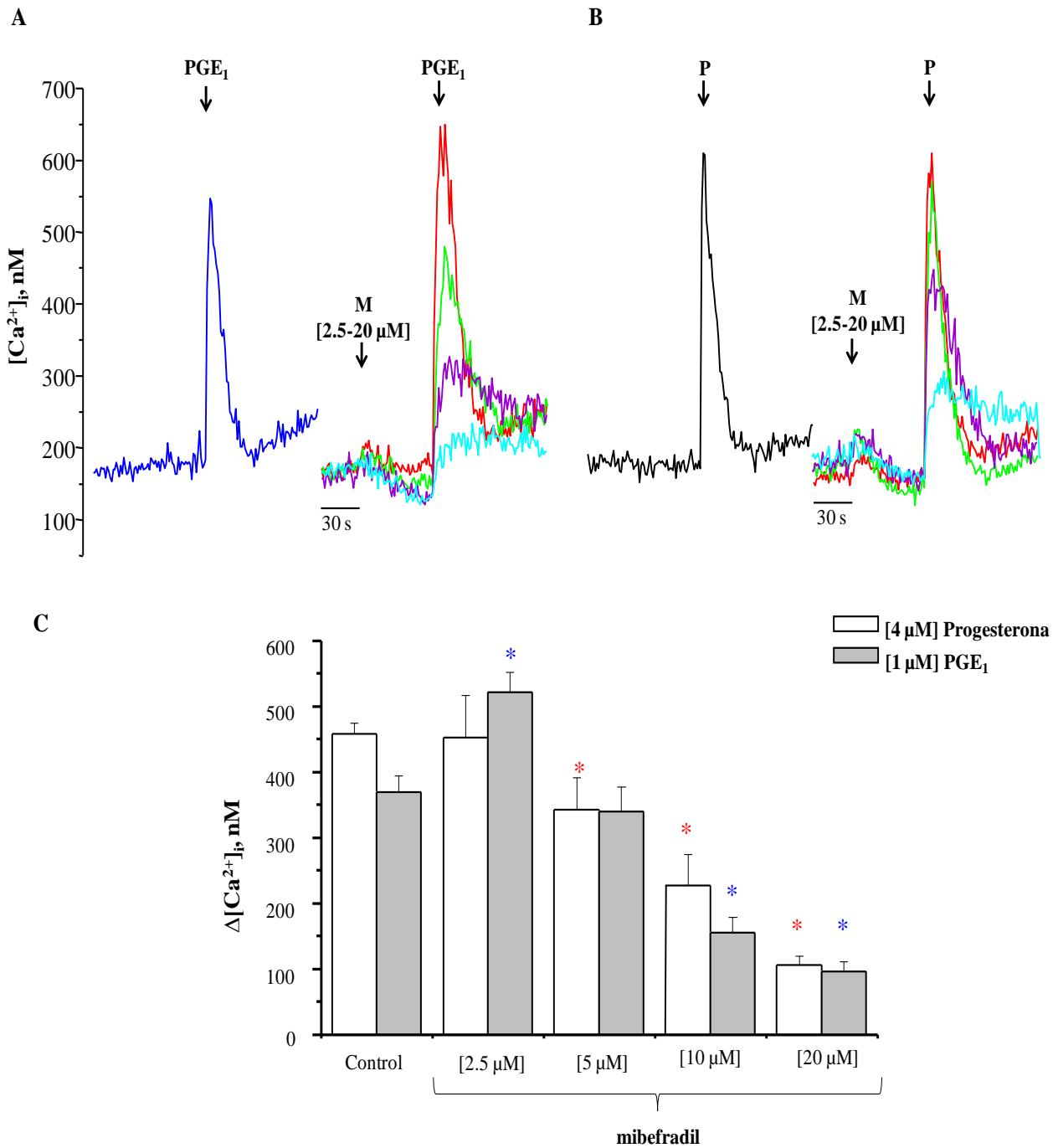


Figura 16. Curva dosis-respuesta de mibefradil en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con PGE₁ o progesterona (P) en espermatozoides de humano. A. Efecto de mibefradil en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con PGE₁. El trazo azul muestra el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con 1 μ M de PGE₁; 30 s previos a la aplicación del agonista, se añadieron las siguientes cantidades de mibefradil: 2.5 μ M (trazo rojo), 5 μ M (trazo verde), 10 μ M (trazo morado) y 20 μ M (trazo cian), posteriormente se añadió a cada uno 1 μ M de PGE₁. B. Efecto de mibefradil en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con P. El trazo negro muestra el efecto de la aplicación de 4 μ M de progesterona y a los trazos de la derecha las diferentes [mibefradil]: 2.5 μ M (trazo rojo), 5 μ M (trazo verde), 10 μ M (trazo morado) y 20 μ M (trazo cian). C. Gráfica que muestra el $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ($[Ca^{2+}]_i$ en el pico menos la $[Ca^{2+}]_i$ basal. El dato del Ca^{2+} basal se tomó justo antes de la adición de cada agonista) expresado con la media \pm ES de una n= 5. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) en el efecto de mibefradil en comparación con su correspondiente control: * para PGE₁; * para P.

Un punto importante de la adición de 2.5 μM de mibefradil fue que el incremento del Ca^{2+} fue de manera transitoria, regresando en la mayoría de los casos a la concentración basal antes de ser estimulados con el agonista. En el caso de progesterona también en algunas poblaciones de espermatozoides, el incremento transitorio de Ca^{2+} dado por 2.5 μM también se presentó, sin embargo un vez que se promedió el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por progesterona el efecto de mibefradil no es significativo (Figura B). Conforme se va incrementando la concentración de mibefradil, el efecto del influjo transitorio de Ca^{2+} que se observó con mibefradil, se revirtió, es decir; en algunas muestras, disminuyó levemente el Ca^{2+} basal, antes de que se adicionará el agonista (Figura 16A y B).

La adición de 5 a 20 μM de mibefradil; inhibió de manera dosis-dependiente el pico transitorio de Ca^{2+} inducido por PGE_1 o por progesterona. Los porcentajes de inhibición fueron, para PGE_1 : 8%, 59% y 74%; y para progesterona: 26 %, 51 % y 77%, respectivamente. Mostrándose diferencias significativas ($P < 0.05$) en 5, 10 y 20 μM con progesterona; mientras que para PGE_1 solo se observó una inhibición significativa a concentraciones más altas (10 y 20 μM) (Figura 16C). Estos resultados pudieran decirnos que mibefradil tiene un mayor efecto inhibitorio sobre el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la progesterona que por el de PGE_1 . Sin embargo; no se obtuvo diferencias significativas en la IC_{50} de mibefradil entre ambos agonistas ($\text{IC}_{50} = 4.8 \pm 1.2 \mu\text{M}$ para PGE_1 y $\text{IC}_{50} = 4.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$ para progesterona). Por lo que, el mibefradil inhibió con la misma afinidad el efecto de estos dos agonistas, sugiriendo que comparten receptor, y que esté puede tratarse de CatSper.

7.4. Incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido con PGE_1 y progesterona en espermatozoides de humano incubados en medio MEH ajustado a diferentes pHs, así como, el efecto de mibefradil sobre este incremento.

Ante la hipótesis de que se podría tratar de un CatSper, los siguientes experimentos se enfocaron a estudiar el efecto de incubar a los espermatozoides en medio MEH ajustado a diferentes pHs, en virtud de que los CatSper son activados por pH_i elevado (Navarro *et al.*, 2008).

Bajo el modelo experimental trabajado hasta el momento y considerando lo anterior, decidimos incubar a la población de espermatozoides en medio MEH ajustado a cinco pHs diferentes: 7.2, 7.4, 7.6, 7.8 y 8.0.

Como se anticipaba, el incremento de Ca^{2+} intracelular inducido con los agonistas fue potenciado conforme se fue alcalinizando el medio de incubación, favoreciéndose la entrada de Ca^{2+} a mayor pH_e . En la Figura 17A podemos observar cómo fue aumentando la entrada de Ca^{2+} en los espermatozoides estimulados con 4 μM de progesterona (trazo negro) o con 1 μM de PGE_1 (trazo azul) conforme se cambió el pH_e ($n = 5$ y $n = 7$, respectivamente). El pico de Ca^{2+} a pH_e 7.2 fue de ~ 300 nM para progesterona y de ~ 250 nM para PGE_1 , mientras que para el pH_e 8.0, incrementó significativamente ($P < 0.05$) (Anexo B), siendo el doble para PGE_1 (~ 500 nM) y casi el doble para progesterona (~ 550 nM). Estos resultados apoyan la idea de que tanto PGE_1 y progesterona activan CatSper. Aunque entre los agonistas no se observaron diferencias en el efecto que tuvieron en el influjo de Ca^{2+} al mismo pH_e , si se pudo apreciar que la progesterona estimuló una mayor entrada de Ca^{2+} que PGE_1 (Figura 17B y C).

De manera interesante, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal (antes de agregar agonistas) incrementó conforme el pH_e se fue alcalinizando, y la aplicación de 20 μM de mibefradil indujo una disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en pH_e arriba de 7.6. Estos resultados sugieren que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal estaba elevada en pH_e arriba de 7.6 por el influjo de Ca^{2+} a través de CatSper. Sin embargo, el incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por mibefradil en pH_e 7.2 y 7.4 es difícil de explicar por CatSper y posiblemente mibefradil tiene otro blanco que genera este cambio (Figura 17A). Estos resultados sugieren dos posibilidades: 1) El efecto inhibitorio de mibefradil al CatSper es pH_e dependiente, 2) Ambos agonistas inducen el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por otro mecanismo aparte de CatSper y en pH_e alto, es decir, en pH_i alto (ver la siguiente sección 7.5) el influjo de Ca^{2+} a través de CatSper domina el efecto.

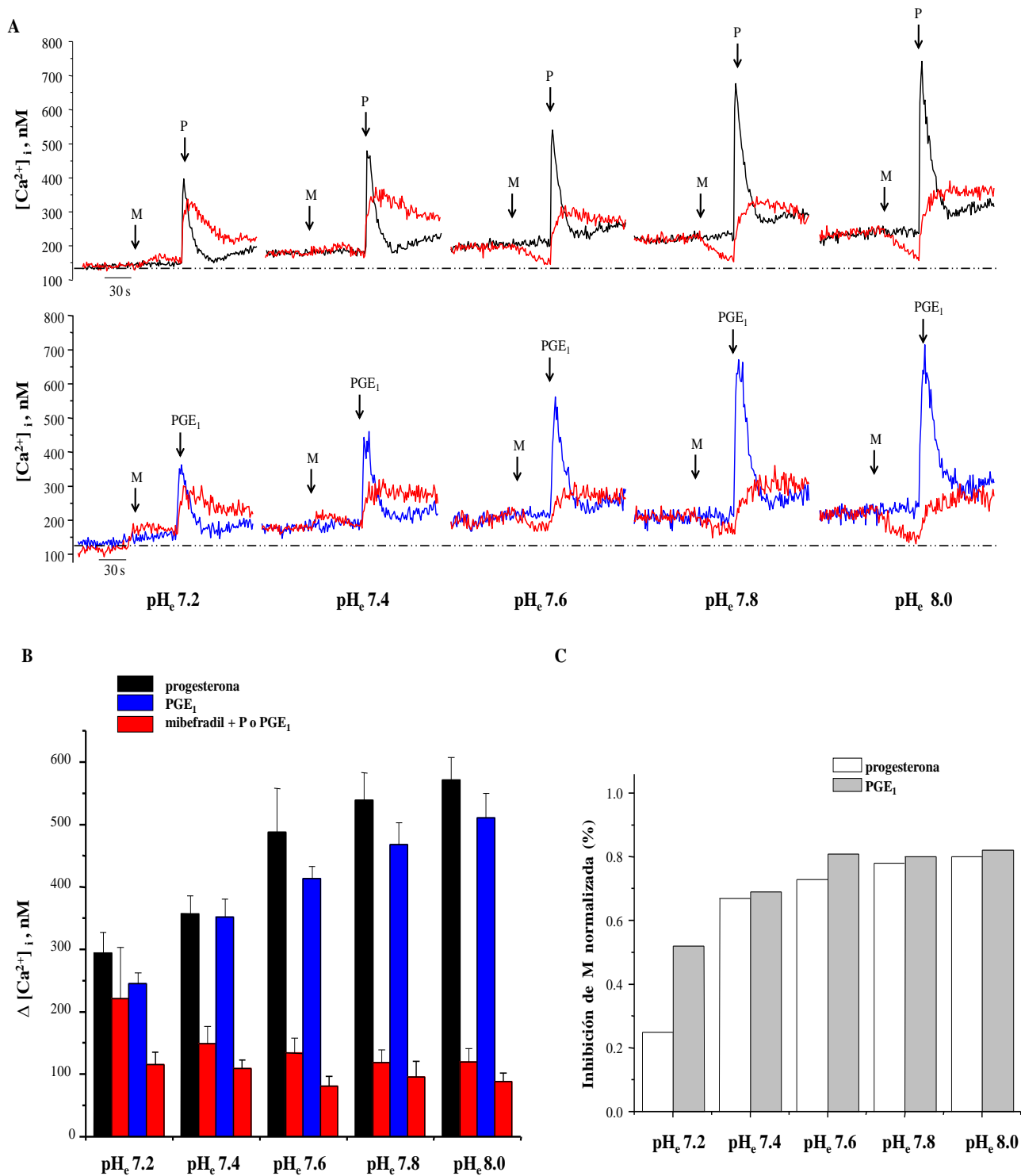


Figura 17. Incremento de Ca^{2+} inducido con PGE_1 o progesterona (P) y su respectiva inhibición con mibefradil (M) en espermatozoides de humano incubados en MEH ajustado a diferentes pHs. A. Trazos representativos de los espermatozoides de humano incubados en MEH ajustado a pH 7.2, 7.4, 7.6, 7.8 y 8.0; donde se puede observar el incremento de calcio inducido con 4 μM de progesterona (P) (trazo negro; panel superior) y 1 μM de PGE_1 (trazo azul, panel inferior); así como la inhibición dada por la aplicación de 20 μM de mibefradil (trazo rojo). La línea discontinua indica el contenido de calcio basal en pH_e 7.2. B. Gráfica que muestra el $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el pico menos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal). El dato del Ca^{2+} basal se tomó justo antes de la adición de cada agonista) expresado con la media \pm ES de $n=5$ para P y $n=7$ para PGE_1 . C. Porcentaje de la inhibición de mibefradil (M) normalizada a 1=100 % (Inhibición de mibefradil sobre el $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenidos por la adición de PGE_1 o P).

7.5. Efecto de mibefradil, PGE₁ y progesterona sobre el pH_i en espermatozoides de humano.

Los cambios de pH_i son muy importantes en la fisiología de todas las células ya que modulan múltiples enzimas y canales iónicos, como es el caso de CatSper. Por lo anterior, se nos hizo importante descartar que los fármacos tienen un efecto sobre el pH_i, por sí mismos, y que el efecto que se observo en el incremento del calcio se debiera a este cambio. En la Figura 18 se presenta el efecto que tienen mibefradil, progesterona y PGE₁ sobre el pH_i de espermatozoides no capacitados. La aplicación tanto de 20 μM de mibefradil, 1 μM PGE₁ y 1 μM de progesterona no tuvieron ningún efecto en el pH_i, con lo que podemos concluir que no promueven la entrada de Ca²⁺ por una alcalinización. En cambio el tratamiento con 10 mM NH₄Cl incrementó el pH_i, lo que validó nuestro sistema experimental, demostrando que las células si fueron capaces de responder a un agente alcalinizante.

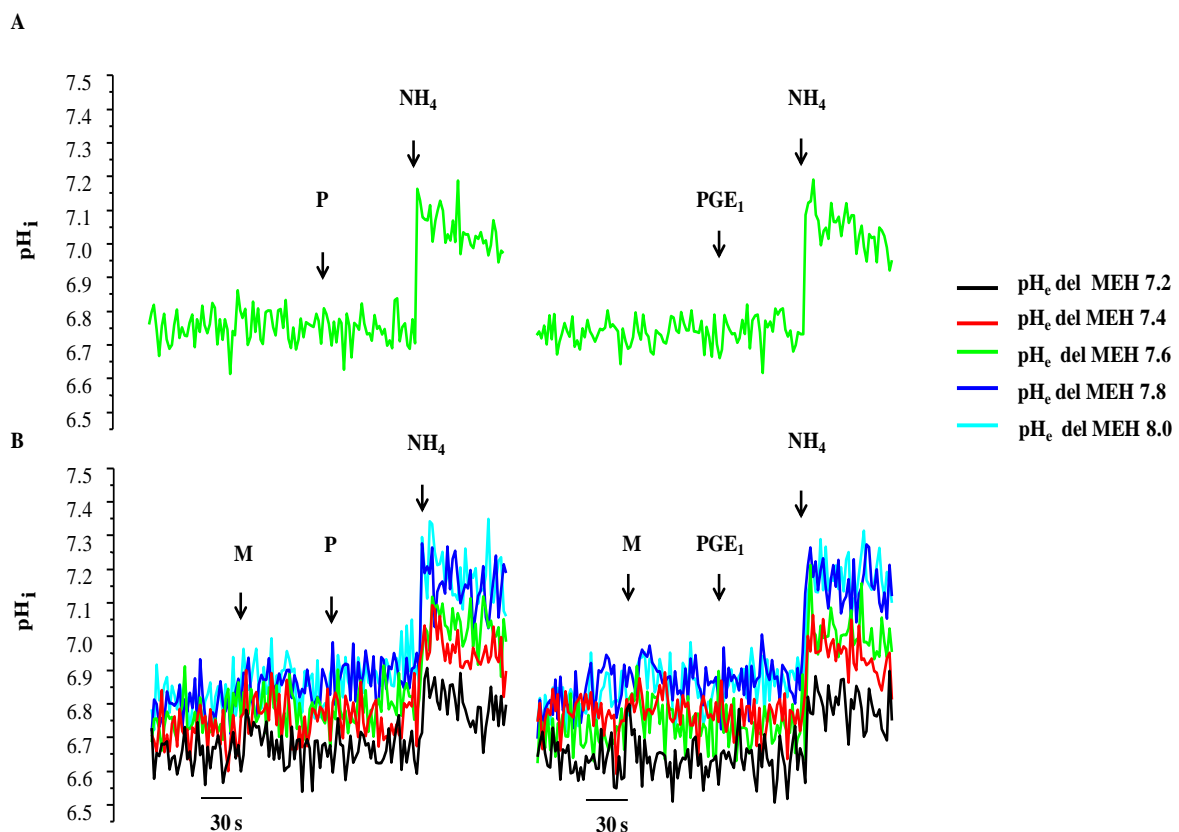


Figura 18. Efecto de mibefradil, PGE₁ y progesterona sobre el pH_i en espermatozoides de humano incubados en MEH ajustado a diferentes pHs. Trazos representativos de una n= 4. A. La aplicación de 1 μM de PGE₁ y 4 μM de P en un medio MEH ajustado a 7.6, no causó un cambio en el pH_i en los espermatozoides humanos. B. Aplicación de 20 μM de mibefradil y 1 μM de PGE₁, así como 4 μM de progesterona no cambiaron el pH_i en los espermatozoides incubados en MEH ajustado a diferentes pHs, por el contrario la adición de 10 mM de NH₄ si cambió el pH_i (control positivo), tanto en el panel A como en el panel B.

En la figura 18B se muestra que el pH_i cambio dependiendo al pH del medio (pH_e), lo cual confirma que la actividad de CatSper estaba alterada por el pH_e antes de agregar agonista en la figura anterior (Figura 17A). Estos experimentos nos permiten sugerir que un incremento del pH del fluido del oviducto (pH_e) podría ser un mecanismo para activar CatSper.

Recientemente Lishko y colaboradores (2011) evaluaron, por medio de la técnica de “patch clamp” en espermatozoides humanos, el efecto de las PGE_1 y la progesterona en el canal H_v1 (canal de H^+ , importante en la regulación del pH_i), el cual se encuentra en la pieza principal del flagelo y puede activar CatSper por una alcalinización intraflagelar (Kirichok y Lishko, 2011; Lishko *et al.*, 2010). En este trabajo concluyen que este canal no está involucrado en el influjo de Ca^{2+} mediado por ambos agonistas, ya que la corriente del canal H_v1 no se afecta ni con progesterona ni con PGE_1 (Lishko *et al.*, 2011). Nuestro experimento apoya esta idea ya que no detectamos ningún cambio en el pH_i por los agonistas.

7.6. Efecto de PGE_1 , progesterona y mibefradil sobre la $[Na^+]_i$ en espermatozoides de humano.

En condiciones fisiológicas los CatSper son selectivos a Ca^{2+} , pero en condiciones libres de cationes divalentes, dejan pasar cationes monovalentes, como el Na^+ (Kirichok *et al.*, 2006). Torres-Flores y colaboradores (2008) reportan que al eliminar el Ca^{2+} del medio externo con EGTA, un agente quelante de Ca^{2+} , causa un decremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y un aumento en la $[Na^+]_i$. Al restituir el Ca^{2+} el incremento de la $[Na^+]_i$ se detienen. Interesantemente, el mibefradil (bloqueador de canales de Ca^{2+} tipo T y L) detiene la entrada de Na^+ y disminuye la $[Na^+]_i$ provocada por la eliminación de Ca^{2+} externo; es decir, bloquea CatSper (Torres-Flores *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, se nos hizo interesante seguir este protocolo y evaluar el efecto de 4 μM de progesterona y de 1 μM de PGE_1 sobre el incremento de la $[Na^+]_i$ y corroborar su inhibición con la adición de 20 μM de mibefradil.

El panel izquierdo de la Figura 19 muestra, el incremento de la $[Na^+]_i$ al eliminar el Ca^{2+} por la adición de 3.5 mM de EGTA (trazo negro), al restituir el Ca^{2+} con la adición de 2 mM de Ca^{2+} , el canal recobra su permeabilidad a Ca^{2+} , por lo que deja de entrar Na^+ por este canal. En los trazos del panel central y derecho se puede observar como la remoción de Ca^{2+} intracelular por EGTA junto

con la estimulación ya sea con progesterona (trazo rojo) o con PGE₁ (trazo azul) incrementó de modo significativo, con respecto al control la entrada de Na⁺ en los espermatozoides y de igual forma al restituir el Ca²⁺ el contenido de Na⁺ intracelular disminuyó. Esta entrada masiva de Na⁺ confirmó la hipótesis de que ambos agonistas están activando CatSper. Al agregarle el inhibidor (20 μM de mibefradil) 60 segundos previos a la adición de EGTA + el agonista (trazo verde para P y trazo cian para PGE₁), se observó una disminución dramática en la entrada de Na⁺. Estos resultados concuerdan con las características que se reportan para los CatSper (Kirichok *et al.*, 2006). Mientras que 20 μM de mibefradil no inhibió totalmente el incremento de la [Ca²⁺]_i inducido por PGE₁ o progesterona (se quedó ~ 20 % de la respuesta como fracción resistente), el mismo fármaco inhibió casi 100 % de la entrada de Na⁺ activado por los mismos agonistas. Es una pregunta importante para entender la vía de señalización de estos agonistas y debe resolverse en el futuro.

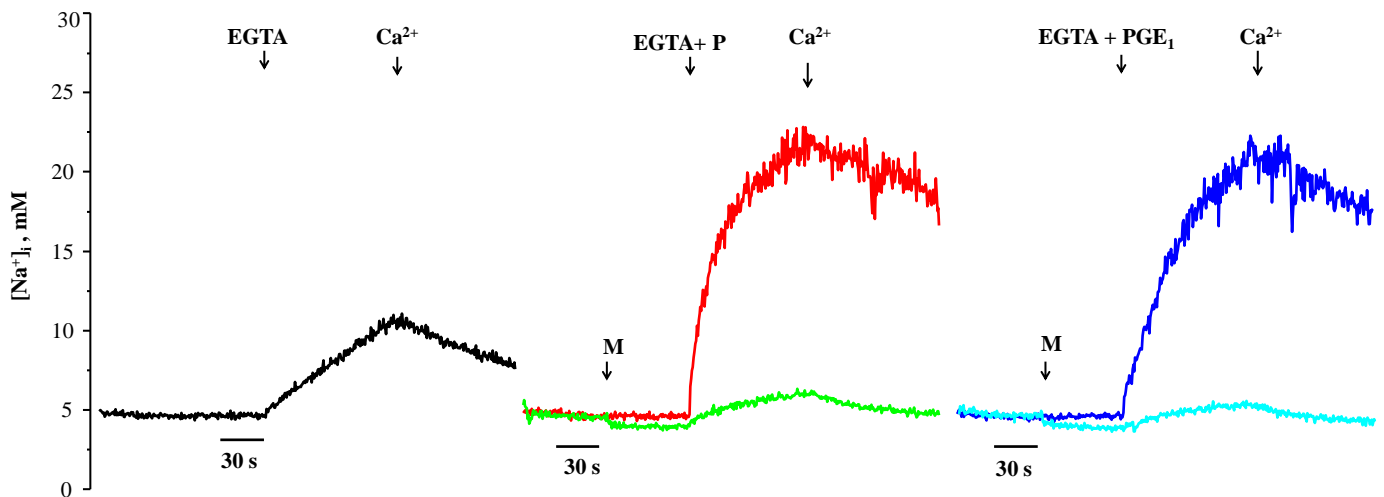


Figura 19. Efecto de PGE₁ y progesterona sobre la [Na⁺]_i en espermatozoides de humano al eliminar el calcio externo. Trazos representativos del contenido de Na⁺ intracelular en espermatozoides de humano, donde se puede observar el incremento de la [Na⁺]_i al remover el Ca²⁺ externo con la adición de 3.5 mM de EGTA (trazo negro); con 3.5 mM de EGTA + 4 μM de progesterona (P) (trazo rojo) o con 3.5 mM de EGTA+ 1 μM de PGE₁ (trazo azul), 240 s después se restituyó el Ca²⁺ externo con la adición de 2 mM de Ca²⁺, con lo que se observó que la entrada de Na⁺ disminuye. La aplicación de 20 μM de mibefradil 60 s antes de la remoción de Ca²⁺ externo junto con la adición de los agonistas, inhibió la entrada de Na⁺ (trazos verde y cian). n = 3.

7.7 Comparación de este trabajo con reportes recientes.

En este trabajo se presentan evidencias que indican que la vía de entrada de Ca^{2+} estimulada con progesterona o PGE_1 es vía CatSper. Estos resultados se corroboran con los recientes datos publicados por Strunker y colaboradores (2011) y por Lishko y colaboradores (2011) quienes demostraron de forma independiente, utilizando la técnica de “patch-clamp” y por el aparato “stopped-flow” que el CatSper es el canal responsable del incremento de Ca^{2+} inducido por la progesterona y la prostaglandina en el espermatozoide de humano. Las subunidades CatSper β , γ y δ tiene grandes dominios extracelulares, lo cual sugiere la posibilidad de que funcionen como receptores de diferentes ligandos para activar al CatSper.

Además reportan diferencias significativas a nivel linaje, en la respuesta dada por estos agonistas, ya que no afectan la corriente CatSper de ratón, indicando una diferencia evolutiva muy interesante. Frecuentemente los ratones se toman como modelo de estudio y los mecanismos se extrapolan a lo que pasaría en células humanas, por el hecho de ser mamíferos. Sin embargo, hay casos que tienen diferencias significativas entre estas dos especies y CatSper parece ser una de ellas. Se sabe que CatSper1, aún dentro de diferentes primates, tiene muchas mutaciones, incluso deleciones e inserciones de varios amino ácidos (Podlaha y Zhang, 2003). Estas variaciones formadas por selección positiva en el proceso evolutivo pueden explicar la diferencia del modo de regulación y los diferentes agonistas para CatSper en cada especie. El aspecto evolutivo de estas diferencias es un tema muy interesante para estudiar.

Por otro lado, ya que este canal exclusivo de los espermatozoides, CatSper es un blanco perfecto para un anticonceptivo. Hasta la fecha se ha reportado que CatSper está compuesto por 4 subunidades alfa (CatSper 1-4) y 3 subunidades accesorias (β , γ y δ), pero no se ha podido expresar al canal funcional en un sistema heterólogo, lo que sugiere que probablemente faltan piezas por encontrar. De manera consistente a esta idea, hasta el momento se ha reportado que los nucleótidos cíclicos, la despolarización, la alcalinización, las glicoproteínas de la ZP y la BSA (Ren y Xia, 2009) inducen un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependiente de CatSper. Nuestros resultados son consistentes con los de Lishko y colaboradores (2011), así como con los resultados de Strunker y colaboradores (2011), quienes observaron que la progesterona y diferentes prostaglandinas ($\text{PGF}_{1\alpha} \geq \text{PGE}_1 > \text{PGA}_1 \geq \text{PGE}_2$) activan directamente el CatSper de los espermatozoides humanos. Considerando la diferencia de agonistas que encontraron entre ratón y humano, se debe explorar

más sobre la diferencia del modo de regulación de CatSper en varias especies para reconocer la particularidad de cada especie y entender la relación de estructura y función de CatSper.

Por otro lado, los efectos de mibefradil en medios con diferente pH (pH_e) indican que existe otra vía aparte de CatSper para el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por PGE_1 y progesterona. Por ejemplo, hay reportes que muestran un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por progesterona en el espermatozoide de ratón (Kobori *et al.*, 2000; Fukami *et al.*, 2003), a pesar de que progesterona no activa CatSper de ratón, sugieren que existe otra vía de señalización para estos agonistas. Por ejemplo, para el caso de progesterona, el receptor de progestina (mPR) localizado en la pieza media del espermatozoide podría ser otra vía (Zhu *et al.*, 2003a; Zhu *et al.*, 2003b) o a través de alguno de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que se encuentran en el espermatozoide, y que se sabe, median la respuesta para las prostaglandinas.

VIII. CONCLUSIONES

- 1) En los espermatozoides humanos, las PGE₁ inducen un incremento transitorio en la [Ca²⁺]_i, dependiente de la dosis, la respuesta se satura a 1 μM.
- 2) Mibefradil inhibe el pico transitorio de Ca²⁺ intracelular, inducido con PGE₁ y progesterona, de forma dosis-dependiente alcanzándose una inhibición del ~75% con 20 μM.
- 3) El incremento en el pH intracelular por modulación del pH del medio externo (pH_e) potencia el incremento de Ca²⁺ intracelular inducido por PGE₁ y progesterona.
- 4) La adición de PGE₁, así como progesterona no afectan el pH_i en los espermatozoides de humano.
- 5) Tanto PGE₁ como progesterona potencian la entrada de Na⁺ inducido por remoción de cationes divalentes del medio y mibefradil inhibe completamente esta entrada de Na⁺.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo confirman nuestra hipótesis que indica que “Tanto PGE₁ como progesterona activan CatSper en espermatozoides de humano”.

IX. PERSPECTIVAS

Determinar la dinámica espacio-temporal del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PGE_1 en registros de célula única del espermatozoide de humano para identificar el sitio de inicio del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PGE_1 .

Identificar el sitio de unión, tanto para progesterona como para PGE_1 , por medio de técnicas bioquímicas (entrecruzamiento con agonistas químicamente modificados) y/o de biología molecular (proteínas recombinantes de los dominios extracelulares de CatSper β , γ y δ).

Determinar el efecto de PGE_1 y progesterona en diferentes especies de mamíferos para correlacionar la estructura de CatSper (secuencia de amino ácido de cada subunidad) y su función, lo cual nos proporcionaría un aspecto evolutivo muy interesante.

X. ANEXOS

Anexo A. Espermatobioscopias de los donadores utilizados en este proyecto, donde se muestra que las muestras de los donadores cumplen con los parámetros establecidos como normales por la OMS (OMS, 2010).

Espermatobioscopias												
Donadores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	"límites Clínicos"
Evaluación Macroscópica												
Días de Abstinencia	4	4	5	5	3	4	5	5	5	3	4	3-6 días
Color	blanco- grisáceo	blanco- grisáceo	blanco- grisáceo	blanco- grisáceo	blanco- grisáceo	blanco- grisáceo	blanco- grisáceo	blanco- grisáceo	blanco- grisáceo	blanco- grisáceo	blanco- grisáceo	blanco- grisáceo
Olor	a cloro	a cloro	a cloro	a cloro	a cloro	a cloro	a cloro	a cloro	a cloro	a cloro	a cloro	
licuefacción	17	25	25	20	20	20	15	20	22	20	20	Antes de 30 min
Acidez iónica	8	8	7,8	8	7,5	8	8	8	7	7	7,5	7 - 8 pH
Volumen	3,6	2,3	2,5	2	2	5	5,5	2,8	3	3,5	3	2-5 ml
Evaluación Microscópica												
Zoospermas/ml	72,3	65,2	58,7	94,6	76,6	58,2	26,8	70	78,3	21,6	21,6	> 20 millones
Zoospermas móviles/ml	54,2	53,7	43	51,3	65,2	49,6	21,9	60	66,1	13,3	13,8	> 10 millones
Vivos %	86	89	88	80	98	98	74	88	83	80	76	> 50 %
Movilidad (%)	74	81	73	54	85	85	82	82	84	61	65	> 50 %
Índices de Velocidad												
Velocidad promedio (VAP)	49,2	37,3	42	37,2	49	63,4	70,9	37,9	66,9	58,7	55,9	30.0-42.4 mic/seg
Velocidad progresiva (VSL)	35,3	27	32,1	25,6	37,6	47,4	56,9	40,2	48,1	46,2	46,5	26.0-34.8 mic/seg
Velocidad rectilínea (STR)	71	75	74	71	74	74	79	72	71	76	82	71-89 %
Amplitud Lateral de la cabeza (ALH)	5,2	3,5	3,5	3,9	4,6	6	5,2	6,2	6,3	5,3	4,4	> 3.3 mic
Morfología												
Normales (%)	18	15	18	16	18	16	15	15	16	18	15	>14 %

Anexo B. Tablas de ANOVA y pruebas estadísticas.

Los valores en rojos, en cada una de las tablas indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos analizados.

10. 1. ANOVA para la curva dosis-respuesta de PGE₁

Prueba de significancia para Delta Ca ²⁺ intracelular (Datos_curva de PGE1) Sigma-restricted parameterization. Effective hypothesis decomposition					
Efecto	SS	Grados de libert	MS	F	p
"PGE1"	778318	6	129720	2.82E+01	4.79E-07
Error	64434	14	4602		

Prueba HSD Tukey; variable DeltaCa ²⁺ intracelular (Datos_curvaPGE)								
Cell No.	PGE1	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
		39.733	76.200	183.80	416.40	454.90	471.87	549.50
1	1		9.93E-01	1.98E-01	2.85E-04	2.03E-04	1.90E-04	1.75E-04
2	10	9.93E-01		4.87E-01	5.31E-04	2.78E-04	2.30E-04	1.78E-04
3	100	1.98E-01	4.87E-01		1.22E-02	3.54E-03	2.10E-03	3.30E-04
4	1000	2.85E-04	5.31E-04	1.22E-02		9.91E-01	9.45E-01	2.66E-01
5	10000	2.03E-04	2.78E-04	3.54E-03	9.91E-01		1.00E-00	6.22E-01
6	20000	1.90E-04	2.30E-04	2.10E-03	9.45E-01	1.00E-00		7.93E-01
7	40000	1.75E-04	1.78E-04	3.30E-04	2.66E-01	6.22E-01	7.93E-01	

10.2. ANOVA para la curva dosis-respuesta de mibefradil en el incremento de la [Ca²⁺]_i inducido con progesterona.

Prueba de significancia para Delta Ca ²⁺ intracelular (Curva_Mibefradil con Progesterona)					
Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Mibefradil_Progesterona	450753	4	112688	11.84	4.29E-05
Error	190414	20	9521		

Prueba HSD Tukey; variable ΔCa^{2+} intracelular (Curva_Mibefradil con Progesterona)						
Cell No.	Mibefradil_Progesterona	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
		457.00	451.40	342.40	226.80	107.94
1	Mibefradil 0		1.00E-00	3.71E-01	1.04E-02	2.54E-04
2	Mibefradil 2.5uM	1.00E-00		4.19E-01	1.27E-02	2.82E-04
3	Mibefradil 5uM	3.71E-01	4.19E-01		3.63E-01	8.94E-03
4	Mibefradil 10uM	1.04E-02	1.27E-02	3.63E-01		3.36E-01
5	Mibefradil 20uM	2.54E-04	2.82E-04	8.94E-03	3.36E-01	

10.3. ANOVA de la curva dosis-respuesta de mibefradil en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con PGE_1 .

Prueba de Significancia para $\Delta Ca^{2+}_{PGE_1}$ (Curva_Mibefradil con PGE_1)					
Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Mibefradil_PGE	586105	4	146526	38.30	4.15E-09
Error	76524	20	3826		

Prueba HSD Tukey. Curva dosis-respuesta de mibefradil $_PGE_1$						
Cell No.	Mibefradil_PGE ₁	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
		368.26	520.00	339.18	154.58	96.100
1	Mibefradil 0		7.50E-03	9.44E-01	3.23E-04	1.36E-04
2	Mibefradil 2.5uM	7.50E-03		1.48E-03	1.32E-04	1.32E-04
3	Mibefradil 5uM	9.44E-01	1.48E-03		1.21E-03	1.62E-04
4	Mibefradil 10uM	3.23E-04	1.32E-04	1.21E-03		5.77E-01
5	Mibefradil 20uM	1.36E-04	1.32E-04	1.62E-04	5.77E-01	

10.4 ANOVA del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con PGE_1 , progesterona y la inhibición de mibefradil en espermatozoides de humano incubados en medio MEH ajustado a diferentes pHs.

Prueba de Significancia para Delta Ca^{2+} (Datos_Curva Ca^{2+}) Diferentes pHs externos					
Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Agonista	76937	1	76937	11.99	7.87E-04
pHs	174300	4	43575	6.79	7.05E-05
Inhibidor	2635450	1	2635450	410.81	0.00E-01
Agonista*pHs	9942	4	2486	0.39	8.17E-01
Agonista*Inhibidor	12	1	12	0.00	9.66E-01
pHs*Inhibidor	437967	4	109492	17.07	1.07E-10
Agonista*pHs*Inhibidor	11685	4	2921	0.46	7.68E-01
Error	641529	100	6415		

Unequal N HSD: variable Delta Calcio (Datos_Curva Calcio)																							
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests																							
Error: Between MS = 6415.3, df = 100.00																							
Cell No	Agonista	pHs	Inhibidor	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)
1	P	pH 7.2	M	220.62	293.26	148.30	356.20	133.54	487.38	118.70	538.66	119.20	571.04	115.03	244.37	108.46	351.33	80.314	413.34	96.057	467.30	87.900	510.20
2	P	pH 7.2	sin M	0.996308	0.996308	0.996308	0.457166	0.972507	0.000295	0.888111	0.000165	0.893924	0.000164	0.856642	1.000000	0.784818	0.527263	0.392103	0.030633	0.602836	0.000631	0.488053	0.000179
3	P	pH 7.4	M	0.996500	0.332443		0.011660	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.931840	0.999999	0.016040	0.998407	0.000315	0.999948	0.000165	0.999678	0.000164
4	P	pH 7.4	sin M	0.457166	0.999433	0.011660	0.004273	0.520394	0.001521	0.056102	0.001574	0.007315	0.001187	0.788825	0.000778	1.000000	0.000218	0.999853	0.000370	0.797442	0.000280	0.232173	
5	P	pH 7.6	M	0.972507	0.180526	1.000000	0.004273		0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.800573	1.000000	0.005981	0.999948	0.000202	1.000000	0.000164	0.999995	0.000164
6	P	pH 7.6	sin M	0.000295	0.028126	0.000164	0.520394	0.000164		0.999970	0.000164	0.981716	0.000164	0.001052	0.000164	0.450524	0.000164	0.995359	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164
7	P	pH 7.8	M	0.889611	0.086599	1.000000	0.001521	1.000000	0.000164		0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.600953	1.000000	0.002128	1.000000	0.000173	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164
8	P	pH 7.8	sin M	0.000165	0.000901	0.000164	0.066102	0.000164	0.999970	0.000164		0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000174	0.000164	0.042298	0.000164	0.606117	0.000164	0.997039	0.000164
9	P	pH 8	M	0.893924	0.088925	1.000000	0.001574	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164		0.000164	1.000000	0.608239	1.000000	0.002203	1.000000	0.000174	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164
10	P	pH 8	sin M	0.000164	0.000209	0.000164	0.007315	0.000164	0.981716	0.000164	1.000000	0.000164		0.000164	1.000000	0.000164	0.000164	0.005237	0.000164	0.197738	0.000164	0.874023	0.000164
11	PGE	pH 7.2	M	0.856642	0.071023	1.000000	0.001187	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164		0.241745	1.000000	0.000202	0.999999	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164
12	PGE	pH 7.2	sin M	1.000000	0.999986	0.931840	0.788825	0.800573	0.001052	0.600953	0.000174	0.608239	0.000164	0.241745		0.171675	0.588069	0.028135	0.019565	0.077330	0.000331	0.048074	0.000165
13	PGE	pH 7.4	M	0.784818	0.049019	0.999999	0.000778	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.171675	0.000183	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000
14	PGE	pH 7.4	sin M	0.527263	0.999815	0.016040	1.000000	0.005981	0.450524	0.002128	0.042298	0.002203	0.005237	0.000202	0.588069	0.000183		0.000164	0.995830	0.000168	0.434215	0.000165	0.040713
15	PGE	pH 7.6	M	0.392103	0.006317	0.998407	0.000218	0.999948	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	0.999999	0.028135	1.000000	0.000164		0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164
16	PGE	pH 7.6	sin M	0.030633	0.681062	0.000315	0.999853	0.000202	0.995359	0.000173	0.606117	0.000174	0.197738	0.000164	0.019565	0.000164	0.995830	0.000164		0.000164	0.999313	0.000164	0.754550
17	PGE	pH 7.8	M	0.602836	0.021520	0.999948	0.000370	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.077330	1.000000	0.000168	1.000000	0.000164		0.000164	1.000000	0.000164
18	PGE	pH 7.8	sin M	0.000631	0.089019	0.000165	0.797442	0.000164	1.000000	0.000164	0.997039	0.000164	0.874023	0.000164	0.000331	0.000164	0.434215	0.000164		0.999313	0.000164		0.999975
19	PGE	pH 8	M	0.488053	0.013792	0.999678	0.000280	0.999995	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.048074	1.000000	0.000166	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164		0.000164
20	PGE	pH 8	sin M	0.000179	0.006343	0.000164	0.232173	0.000164	1.000000	0.000164	1.000000	0.000164	0.999644	0.000164	0.000165	0.000164	0.040713	0.000164	0.754550	0.000164	0.999975	0.000164	

Anexo C. Curva dosis-respuesta de PGE₁ en espermatozoides de humano incubados con fluo-3, AM.

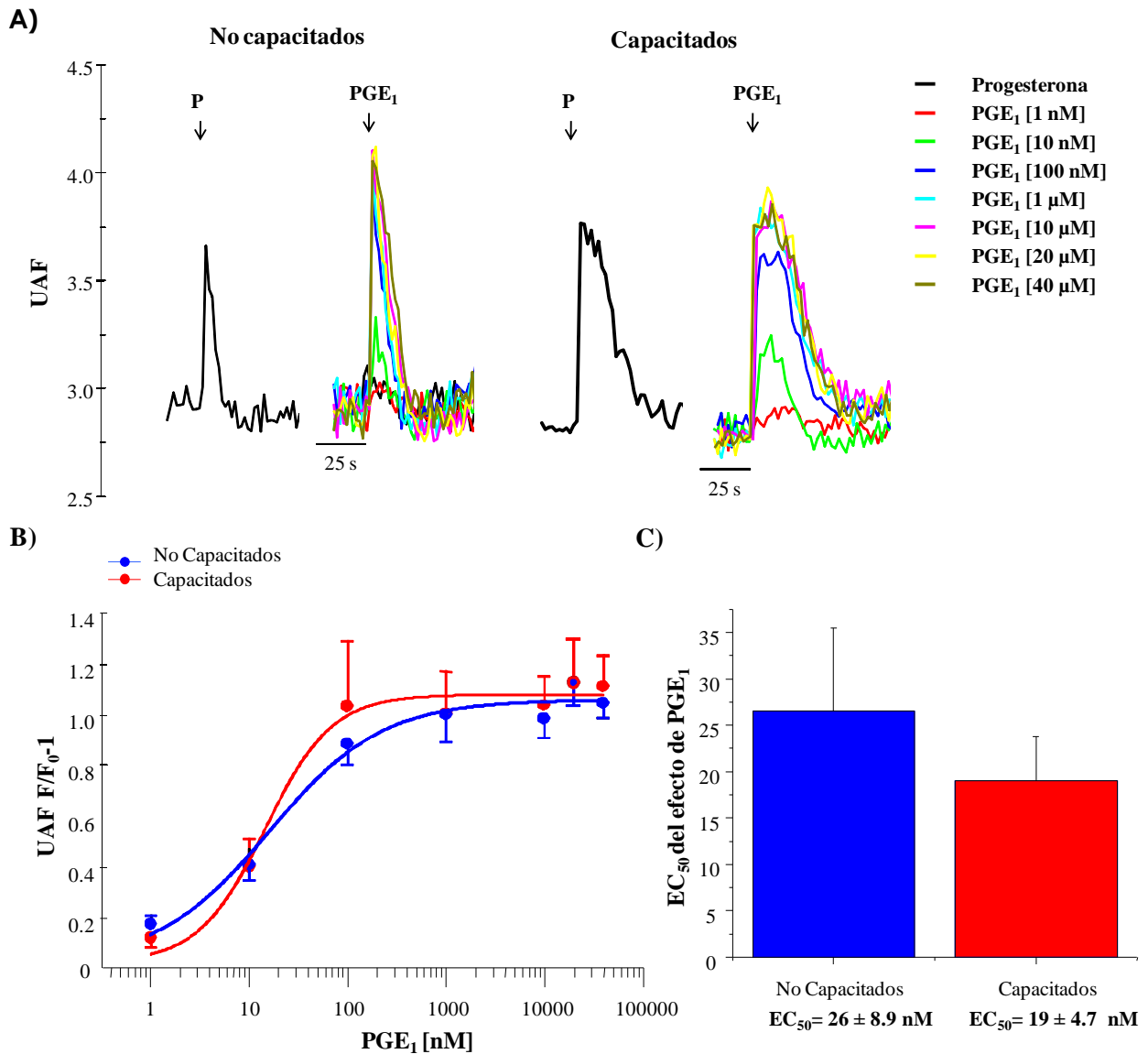


Figura 20. Curva dosis-respuesta de Prostaglandinas tipo E₁ en espermatozoides de humano. A) Trazos representativos de la aplicación de diferentes [PGE₁]: 1 nM (trazo rojo), 10 nM (trazo verde), 100 nM (trazo azul), 1 μM (trazo verde claro), 10 μM (trazo rosa), 20 μM (trazo azul claro) y 40 μM (trazo verde soldado). El trazo negro es la aplicación de 4 μM de progesterona (control positivo) en espermatozoides de humano no capacitados y capacitados. B) Curva Dosis-Respuesta de PGE₁. La EC₅₀ obtenida fue de 26 nM para los espermatozoides no capacitados y de 19 nM para Capacitados. C) Gráfica que muestra la media ± ES de las diferentes EC₅₀ dadas para cada uno de los donadores trabajados. Los valores obtenidos se expresaron de una n = 6 y n = 5 respectivamente; en relación a la media ± ES.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Abou-haila A y Tulsiani DR. (2009). Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys.* 485: 7281.
- Aitken RJ, Buckingham DW y Irvine, DS. (1996). The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa: evidence for a ubiquitous response that is rapidly down-regulated. *Endocrinology.* 137, 3999-4009.
- Álvarez LC. Tesis Doctoral. (2003). Análisis Integrado de Morfología y movilidad espermática humana con el uso del Sperm Class Analyzer. Departamento de Biología Funcional y Antropología Física. Universidad de Valencia. 170 pp.
- Bajpai M y Doncel G. (2003). Involment of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reproduction.* 126:183-195.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M y Forti G. (2000). Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity y acrosome reaction. *Front In Biosc* 5. Pp: 110-123.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C y Forti G. (1996). Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation y lipid remodeling pathways. *Front In Biosc* 1. Pp: 189-205.
- Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M y Forti G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl.* 12: 323 –330.
- Bedford JM. (1975). Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis. En: Greep R, Hamilton DW, Eds. *Handbook of Physiology. Endocrinology V, section 7.* Waverley Press Inc, Baltimore, 303-317 pp.
- Bedu-Addo K, Costello S, Harper C, Machado-Oliveira G, Lefièvre L, Ford C, Barratt C y Publicover S. (2008). Mobilisation of stored Ca^{2+} in the neck region of human sperm - a mechanism for regulation of flagellar activity. *Int. J. Dev. Biol.* 52 (5-6):615-26.
- Bedu-Addo K, Barratt CL, Kirkman-Brown JC y Publicover SJ. (2007). Patterns of $[Ca^{2+}]_i$ mobilization and cell response in human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev. Biol.* 302: 324-332.
- Berridge MJ, Bootman MD y Roderick HL. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jul; 4(7):517-29.

- Blackmore PF. (1993). Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca^{2+} influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell Signal* 5, 531-8.
- Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F y Beebe SJ. (1991). Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem* 266: 18655-18659.
- Breitbart H. (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular y Cellular Endocrinology*. 187: 139-144.
- Buecher B, Heymann MF y Blotière HM. (2001). Rationnel et perspectives d'utilisation des inhibiteurs de cyclooxygenase-2 (COX-2) dans les cancers colorectaux. *Gastroenterol Clin Biol*;25:967-978.
- Buffone MG, Calamera JC, Vestraeten SV y Doncel GF. (2005). Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation y membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. *Reproduction*. 129. 697-705.
- Breyer RM. (2001). Prostaglandin EP1 Receptor Subtype Selectivity Takes Shape. *Mol. Pharmacol*. 1357-1359.
- Brokaw CJ. (1979). Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella. *J Cell Biol* 82: 401-411.
- Chung JJ, Navarro B, Krapivinsky G, Krapivinsky L y Clapham DE. (2011). A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun*. 2:153.
- Clapham DE. (2007). Calcium signaling. *Cell*. Dec 14; 131(6):1047-58.
- Cook SP, Brokaw CJ, Muller CH y Babcock DF. (1994). Sperm chemotaxis: Egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev Biol* 165:10-19.
- Cooper TG. (2007). Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl*. Pp: 533-539.
- Curtis H y Barnes NS. (2001). *Biología. Medica Panamericana*. 6° ed. Pp.: 1314-1339.
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C y Treviño CL. (2011). Calcium channels in the development, maturation and function of spermatozoa (en revision).
- 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, Nishigaki T, Wood C, Trevino CL, Felix R, y Beltran C. (2005). Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology. *Int. Rev. Cytol*. 243, 79-172.

- De Jonge C y Barratt CLR. (2006). The sperm cell. Reproduction. Maturation. Fertilization. Regeneration. Cambridge. University Press. 372 pp.
- De Jonge C. (2005). Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update*. 11(3):205-214.
- du Plessis SS, AH Kashou, Benjamin DJ, Yadav SP y Agarwal A. (2011). "Proteomics: a subcellular look at spermatozoa." *Reprod Biol Endocrinol* 9: 36.
- Eckert R. (1990). *Fisiología Animal. Mecanismos y adaptaciones*. Interamericana McGraw-Hill. 3ª ed. Pp.:368-386.
- Eisenbach M y Giojalas LC. (2006). Sperm guidance in mammals: an unpaved road to the egg. *Nature*. Pp: 276-285.
- Ellis-Davies GC. (2007). Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat. Methods* 4, 619-28.
- Espey LL y Lipner H. (1994) in *The Physiology of Reproduction* eds. Knobil E y Neill JD. (Raven New York) Pp.: 725-780.
- Espino J, Mediero M, Lozano GM, Bejarano I, Ortiz A, García JF, Pariente JA y Rodríguez AB. (2009). Reduced levels of intracellular calcium releasing in spermatozoa from asthenozoospermic patients. *Reprod Biol and End* 7 11.
- Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, van Duin M, Conti M y Gossen JA. (2004). Mice deficient for soluble Adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 2993-2998.
- Falsetti C, Baldi E, Krausz C, Casono R, Failli P y Forti G. (1993). Decreased responsiveness to progesterone of spermatozoa in oligozoospermic patients. *J Androl*. 14:17-22.
- Fukami K, Yoshida M, Inoue T, Kurokawa M, Fissore RA, Yoshida N, Mikoshiba K, y Takenawa T. (2003). Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol* 161: 79-88.
- Fraire-Zamora JJ, González-Martínez M. (2004). Effect of Intracellular pH on Depolarization-Evoked Calcium Influx in Human Sperm. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287: C1688-C1696.
- Gadella BM. (2008). Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science* 107.229–236
- Gartner PL y Hiatt LJ. (2002). *Texto Atlas de Histología*. McGraw-Hill. 2a ed. Pp.: 463-483.
- Gilbert S. (2003). *Developmental Biology*. 6º ed. Sinauer Associater, Inc.

- Gomora JC, Xu L, Enyeart JA y Enyeart JJ. (2000). Effect of mibefradil on voltage-dependent gating and kinetics of T-type Ca^{2+} channels in cortisol-secreting cells. *Journal Pharmacology*. 292(1):96-103.
- González-Martínez MT, Bonilla-Hernández MA y Guzman-Grenfell AM. (2002). Stimulation of voltage-dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm. *Archives in Biochemistry y Biophysics*. 408: 205-210.
- Grynkiewicz G, Poenie M y Tiesen Y. (1985). A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem*. 260:3440-3450.
- Guzman-Grenfell AM y Gonzalez-Martinez MT. (2004). Lack of voltage-dependent calcium channel opening during the calcium influx induced by progesterone in human sperm. Effect of calcium channel deactivation and inactivation. *Journal of Andrology* 25, 117-122.
- Harper CV y Publicover SJ. (2005). Reassessing the role of progesterone in fertilization-compartmentalized calcium signaling in human spermatozoa? *Hum Reprod*. Vol. 20 No. 10 pp. 776-786.
- Harper MJK. (1994) in *The Physiology of Reproduction* eds. Knobil, E. y Neill, J. D. (Raven New York), pp.123-188.
- Hickman CP Jr, Roberts LS y Parson A. (2000). *Principios integrales de Zoología*. McGraw-Hill. Interamericana. 10° ed. Pp.: 80-102.
- Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, Serres C, Kahrizi K, Najmabadi H, Beckmann JS y Smith RJ.(2010). Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet*. 18(11):1178-84.
- Hildebrand MS, Avenarius MR y Smith RJH. (2009). CATSPER-Related Male Infertility. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2009. Dec 3.
- Ho HC y 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: 1606-1615.
- Hoskins DD y Vijayaraghavan S. (1990). A new theory on the acquisition of sperm motility during epididymal transit. En Gagnon C, PH. D. (ed). *Controls of Sperm Motility Biological y Clinical Aspects*. CRC Press. 53-62 pp.

- Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CL y Publicover SJ. (2006). Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Human Reproduction Update* 12 253–267.
- Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM y Yan W. (2007). Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *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.
- Kaupp UB, Kashikar ND y Weyand I. (2008). Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu Rev Physiol* 70: 93-117.
- Kelly RW. (1981). Prostaglandin synthesis in the male and female reproductive tract. *J. Reprod. Fert.* 62, 293-304.
- Kilic F, Kashikar ND, Schmidt R, Alvarez L, Dai L, Weyand I, Wiesner B, Goodwin N, Hagen V y Kaupp UB. (2009). Caged progesterone: a new tool for studying rapid nongenomic actions of progesterone. *J Am Chem Soc* 131, 4027-30.
- Kirichok Y y Lishko P. (2011). Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol. Hum. Reprod.*
- Kirichok Y, Navarro B y Clapham DE. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature.* 439:737-40.
- Kirkman-Brown JC, Barratt CL y Publicover SJ. (2003). Nifedipine reveals the existence of two discrete components of the progesterone-induced $[Ca^{2+}]_i$ transient in human spermatozoa. *Dev Biol* 259, 71-82.
- Kirkman-Brown JC, Bray C, Stewart PM, Barratt CL y Publicover SJ. (2000). Biphasic elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol* 222, 326-35.
- Kobori H, Miyazaki S y Kuwabara Y. (2000). Characterization of intracellular Ca^{2+} increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 63: 113-120.
- Kodithuwakku SP, Miyamoto A y Wijayagunawardane MP. (2007). Spermatozoa stimulate prostaglandin synthesis and secretion in bovine oviductal epithelial cells. *Reproduction* 133, 1087-94.

- Kopf GS. (2002). Signal transduction mechanisms regulating sperm acrosomal exocytosis. In *Fertilization*. D.M. Hardy, editor. Academic Press Inc. San Diego, California, USA. 181–223.
- Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV, Sanjay A, Pilder SH, Salicioni AM y 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.
- Krausz C, Bonaccorsi L, Maggio P, Luconi M, Fuzzi B, Criscuoli L, Pellegrini S, Forti G y Baldi E. (1996). Intracellular calcium increase and acrosome reaction in response to progesterone in human spermatozoa is correlated with in vitro fertilization. *Hum Reprod*. 11:1161–7.
- Lefièvre L, Machado-Oliveira G, Ford C, Kirkman-Brown J, Barratt C y Publicover S. (2009) Communication between female tract and sperm. *Communicative & Integrative Biology* 2:2, 82-85.
- Linares-Hernández L, Guzman-Grenfell AM, Hicks-Gómez JJ y 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.
- Lishko PV, Botchkina IL y Kirichok Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature*. 471: 387-392.
- Lishko PV y Kirichok Y. (2010). The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol*. 588:4667-72.
- Liu J, Xia J, Cho KH, Clapham DE y Ren D. (2007). CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *J Biol Chem* 282: 18945-18952.
- Lobley A, Pierron V, Reynolds L, Allen L y Michalovich D. (2003). Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: Characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 53.
- Losel R, Breiter S, Seyfert M, Wehling M y Falkenstein E. (2005). Classic and non-classic progesterone receptors are both expressed in human spermatozoa. *Horm Metab Res* 37, 10-4.
- Machado-Oliveira G, Lefievre L, Ford C, Herrero MB, Barratt C, Connolly TJ, Nash K, Morales-Garcia A, Kirkman-Brown J y Publicover S (2008). Mobilisation of Ca^{2+} stores and flagellar regulation in human sperm by S-nitrosylation: a role for NO synthesised in the female reproductive tract. *Development* 135 3677–3686.
- Mayer G y Heckel A. (2006). Biologically active molecules with a “light switch”. *Angew Chem int Ed Engl* 45, 4900-21.

- Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM y O'Brien DA. (2004). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16501-16506.
- Miki K, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Fulcher KD y Eddy EM. (2002). Targeted disruption of the *Akap4* gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev Biol*. Aug 15; 248(2):331-42.
- Meizel S, Turner KO y Nuccitelli R. (1997). Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev Biol* 182: 67-75.
- Mendoza C y Tesarik J. (1993). A plasma-membrane progesterone receptor in human sperm is switched on by increasing intracellular free calcium. *FEBS Lett*. 330:57-60.
- Mortimer ST. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update* 1997, Vol. 3, No. 5 pp. 403–439.
- Narisawa S, Hecht NB, Goldberg E, Boatright KM, Reed JC y Millán JL. (2002). Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Mol Cell Biol*. Aug; 22(15):5554-62.
- Narumiya S, Sugimoto Y y Ushikubi F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79, 1193-226.
- Navarro B, Kirichok Y, Chung JJ y Clapham DE. (2008) Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *International Journal of Developmental Biology* 52 607–613.
- Neri-Vidaurri PC. Tesis de Maestría. (2007). Sensibilidad de los canales de calcio dependientes del voltaje al pH_i en el espermatozoide humano capacitado. Efecto modulador del AMPc. Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina. UNAM. 58 pp.
- Neri-Vidaurri P, Torres-Flores V y 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.
- Nishigaki T, Wood CD, Tatsu Y, Yumoto N, Futura T, Elias D, Shiba K, Baba SA y Darszon A. (2004). A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca^{2+} before its increase. *Dev Biol*. 272:376–388.
- Oehninger S, Sueldo C, Lanzendorf S, Mahoney M, Burkman LJ, Alexander NJ y Hodgen GD. (1994). A sequential analysis of the effect of progesterone on specific sperm functions crucial to fertilization in vitro in infertile patients. *Hum Reprod* 9:1322–1327

- Oko R y Clermont Y. (1990). Mammalian spermatozoa: structure and assembly of the tail. En Gagnon C, PH. D. (ed). Controls of Sperm Motility Biological y Clinical Aspects. CRC Press. 3-28.
- Podlaha O y Zhang J. (2003). Positive selection on protein-length in the evolution of a primate sperm ion channel. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 12241-12246.
- Publicover S, Harper CV y Barratt C. (2007). $[Ca^{2+}]_i$ signaling in sperm-making the most of what you've got. Nature Cell Biology.9.3: 235-242.
- 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. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 1219-1223.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE y Garbers DL. (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 14869-14874.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, y Clapham DE. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature 413: 603-609.
- Ren D, y Xia J. (2010). Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. Physiology (Bethesda) Md 25: 165-175.
- Robaire B y L Hermo (1998). Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions, and their regulation. En: knobil E, Neil JD, eds. The Physiology of Reproduction. 2a. Ed. Raven Press Ltd, New York, 999-1080 pp.
- Robertson AS. (2005). Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. Cell Tissue Res 322: 43-52.
- Roldan ER, Murase T y Shi QX. (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. Science. 266:1578-1581.
- Roy AC y Ratnam SS (1992). Biosynthesis of prostaglandins by human spermatozoa in vitro and their role in acrosome reaction and fertilization. Mol Reprod Dev. 33, 303-306.
- Ruiz DF. (1988). Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción. UNAM. Pp: 25-43.
- Schaefer M, Hofmann T, Schultz G. y Gudermann T. (1998). A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. Proc Natl Acad Sci. 95: 3008-3013.

- Serrano H y García-Suarez D. (2001). Molecular aspects of mammalian fertilization. *Asian J. Androl.* Dec; 3: 243-249.
- Servin-Vences RM, Tatsu Y, Ando H, Guerrero A, Yumoto N, Darszon A y Nishigaki T. (2011). Photoactivation of a caged progesterone analog induces changes in intracellular free Ca^{2+} and sperm flagellar beating. (en revision).
- Shiba K, Baba SA, Inoue T y Yoshida M. (2008). Ca^{2+} bursts occur around a local minimal concentration of attractant and trigger sperm chemotactic response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19312-19317.
- Shimizu Y, Yorimitsu A, Maruyama Y, Kubota T, Aso T y Bronson R. (1998) Prostaglandins induce calcium influx in human spermatozoa. *Mol Hum Rep.*14: 6. pp 555-561.
- Shimizu, Y., Nord, E.P. and Bronson, R.A. (1993). Progesterone-evoked increases in sperm $[Ca^{2+}]_i$ correlate with the egg penetrating ability of sperm from fertile but not infertile men. *Fertil. Steril.* 60, 526–532.
- Strunker T, Goodwin N, Breker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R y Kaupp. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature-Lett.* 471:382-6.
- Suarez SS. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 52: 455-462.
- Suarez SS y Pacey AA. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update.* 12 (1). 23-37.
- Suarez SS. (1996). Hyperactivated Motility in Sperm. *J Androl.* 17 (4). 331-335.
- Sugimoto Y y Narumiya S. (2007). Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* 282 11613–11617
- Sullivan R, Frenette G y Girouard J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl.* 9: 483-491.
- Tesarik J, Moos J y Mendoza C. (1993). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* 133, 328-35.
- Teves ME, Barbano F, Guidobaldi HA, Sanchez R, Miska W y Giojalas LC. (2006). Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil Steril* 86, 745-9.
- Thomas P, Tubbs C y Garry VF. (2008). Progestin functions in vertebrate gametes mediated by membrane progestin receptors (mPRs): Identification of mPRalpha on human sperm and its association with sperm motility. *Steroids.*

- Thomas P y Meizel S. (1989). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. *Biochem J* 264, 539-46.
- Torres-Flores V, Picazo-Juárez G, Darszon A, Hernández-Rueda YL y González-Martínez, MT (2011). Sodium influx induced by external calcium chelating lead to human sperm motility decrease. *Human Reproduction* 26 (10): 2626-35.
- Torres-Flores V, Hernández-Rueda YL, Neri-Vidaurre Pdel C, Jimenez-Trejo F, Calderon-Salinas V, Molina-Guarneros JA y González-Martínez MT. (2008). Activation of protein kinase A stimulates the progesterone-induced calcium influx in human sperm exposed to the phosphodiesterase inhibitor papaverine. *J Androl* 29: 549-557.
- Turner RM. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*. 18:25-38.
- Uhler ML, Leung A, Chan SY y Wang C. (1992). Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil Steril*. 1992; 58: 1191 –1198.
- Visconti P y Kopf G (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod*. 59: 1-6.
- Wang H, Liu J, Cho KH y Ren D. (2009). A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol Reprod* 81: 539-544.
- Wassarman PM, Jovine L y Litscher ES. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* 3: E59-E64.
- Wassarman PM. (1999). Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*. 96:175–183.
- Wathes DC, Abayasekara DR y Aitken RJ. (2007). Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod*. 77:190–201.
- WHO. (2010). WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. New York: Cambridge University Press.
- Wood CD, Nishigaki T, Tatsu T, Yumoto N, Baba SA, Whitaker M y Darszon A. (2007). Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca^{2+} spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Dev Biol*. 2007. 306:525–537.
- Xia J, Reigada D, Mitchell CH y Ren D. (2007). CATSPER channel-mediated Ca^{2+} entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biol Reprod* 77: 551-559.

- Zhu Y, Bond J y Thomas P. (2003a). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 2237-42.
- Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M y Thomas P. (2003b). Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 2231-6.