



DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

**Estudio del mecanismo de bloqueo de la corriente de Ca^{2+} tipo T
por Acido Niflúmico y Celecoxibe
en células espermatoogénicas de ratón.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA:

BIOL. ENRIQUE BALDERAS ÁNGELES.

ASESOR: DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL.

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.



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.

Este trabajo fue apoyado por:

CONACyT, número de becario: 158366

Por la DGAPA.

Por la Universidad de Massachusetts.

**Por el programa de alimentación y hospedaje del Instituto de Biotecnología,
UNAM.**

Índice

Abreviaturas.

Resumen.

1. Antecedentes.

1.1 El papel del Ca^{2+} en la fisiología animal.

1.2 Los mecanismos de transporte de Ca^{2+} en las células animales.

1.3 La clasificación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV).

1.4 La participación del Ca^{2+} en la producción de gametos y en los procesos de fecundación.

1.5 Las propiedades biofísicas de los canales de Ca^{2+} tipo T que los hace buenos candidatos para funcionar en los procesos de fecundación en los espermatozoides maduros.

1.6 Los canales de Ca^{2+} tipo T en células espermátogénicas de ratón.

1.7 El efecto del Ácido Niflúmico en los canales iónicos.

1.8 El Celecoxibe es un antiinflamatorio de uso común que inhibe a los canales iónicos.

2. Justificación.

3. Hipótesis.

4. Objetivo General.

4.1 Objetivos particulares.

5. Materiales y Métodos.

5.1 Disociación de células espermátogénicas.

5.2 Registros electrofisiológicos utilizando la técnica de “patch-clamp” en la configuración de célula completa.

5.3 Determinación del bloqueo dependiente del estado de los canales.

5.3.1 El bloqueo en el estado cerrado de los canales.

5.3.2 El bloqueo en el estado inactivado de los canales.

5.3.3 El bloqueo de los canales en el estado abierto.

5.4 Los fármacos y las soluciones utilizadas.

5.5 La cinética de la activación y de la inactivación en el estado estable de los canales de Ca^{2+} tipo T.

6. Resultados.

6.1 El ácido niflúmico bloquea las corrientes de Ca^{2+} tipo-T en las células espermatozógenas de ratón.

6.2 El ácido niflúmico no cambió la dependencia de voltaje de la activación ni de la inactivación en el estado estable de la corriente de Ca^{2+} tipo T.

6.3 El ácido niflúmico aumenta la tau de activación y la tau de inactivación de las corrientes de Ca^{2+} tipo T.

6.4 El ácido niflúmico no cambió la cinética de desactivación de la corriente de Ca^{2+} tipo T.

6.5 El bloqueo por el ácido niflúmico ocurre en todos los estados de los canales de Ca^{2+} tipo T.

6.6 El ácido niflúmico aumenta la tau de recuperación de la inactivación de la corriente de Ca^{2+} tipo-T.

6.7 El bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo T por el ácido niflúmico es independiente de la frecuencia de estimulación de los canales.

6.8 El celecoxibe inhibe la corriente de Ca^{2+} tipo T en una forma dependiente de la dosis.

6.9 El celecoxibe no afecta la dependencia de voltaje de la activación ni la curva de inactivación de estado estable de los canales de Ca^{2+} tipo T.

6.10 El celecoxibe no cambia la tau de activación ni la tau de inactivación de la corriente de Ca^{2+} tipo T.

6.11 El celecoxibe no interfiere con el mecanismo de cierre de los canales de Ca^{2+} tipo T.

6.12 El bloqueo de la corriente de Ca^{2+} tipo T por el celecoxibe es poco reversible.

6.13 El celecoxibe aumenta la tau de recuperación de la inactivación de los canales de Ca^{2+} tipo T.

7. Discusión.

8. Perspectivas.

9. Anexos. Tabla comparativa de los parámetros biofísicos medidos en las tres isoformas de la familia Ca_v3 .

10. Literatura citada.

Abreviaturas.

[Ca²⁺]_i: concentración intracelular de Ca²⁺.

AINE: Antiinflamatorio No Esteroideo.

AN: Acido Niflúmico.

Ca_v: Canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje.

Cbx: Celecoxibe.

DMSO: Dimetihyl sulfóxido.

GABA: Acido gamma-Amino butírico.

HEK-293: Human Embryonic Kidney cells 293.

HP: potencial de mantenimiento (Holding Potential).

HS: solución de aislamiento sin Ca²⁺.

HVA: canales de alto umbral de activación (High Voltage Activated).

IC₅₀: Concentración media de inhibición.

LVA: canales de bajo umbral de activación (Low Voltage Activated).

RA: Reacción Acrosomal.

SEM: Error estándar de la Media

Tipo T: corriente transitoria de Ca²⁺ (T-type).

V_m: potencial de membrana.

ZP: Zona Pellucida.

Resumen:

El Ca^{2+} tiene un papel preponderante en los procesos de fecundación ya que participa desde la generación de los gametos hasta en la movilidad de las células y en la reacción acrosomal de los espermatozoides. Existen una gran cantidad de evidencias que indican que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje participan en los procesos que dependen del Ca^{2+} en la fecundación, sin embargo actualmente esto es un tema que de fuerte debate. Las tres isoformas de la familia de los Ca_v3 están presentes y son funcionales en las células espermatogénicas de ratón y se conservan durante la maduración de los espermatozoides. Sin embargo el ratón nulo en $\text{Ca}_v3.2^{-/-}$ no tiene corrientes de Ca^{2+} y es fértil. Esto no descarta que el apagamiento de este gen interrumpa la expresión y/o la función de los otros dos Ca_v s. La redundancia de función en etapas maduras de los espermatozoides por otros Ca_v s tampoco se puede descartar. La necesidad de un estudio biofísico detallado de la corriente total de Ca^{2+} en células espermatogénicas podría ayudar a aclarar si la corriente total de Ca^{2+} es una mezcla de la actividad de las distintas isoformas, lo que sugeriría la posible participación de estas en otros procesos que dependen del Ca^{2+} durante la fecundación. El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar con la técnica de "patch-clamp" las propiedades biofísicas de la corriente de Ca^{2+} tipo T en las células espermatogénicas de ratón que nos ayuden a diferenciar las isoformas que podrían conformar la corriente total de Ca^{2+} . El segundo objetivo de nuestro trabajo fue establecer el mecanismo de bloqueo de la corriente de Ca^{2+} tipo T por ácido niflúmico y por Celecoxibe para probar si estas drogas pueden ser utilizadas como herramientas químicas que nos ayuden a diferenciar la contribución de las distintas isoformas de los

Ca_v3 en la corriente total de Ca²⁺ en las células espermatogénicas y quizás en los espermatozoides maduros. Nuestros resultados sobre la biofísica de la corriente tipo T y en particular el tiempo de recuperación de la inactivación de los canales nos sugieren que la isoforma Ca_v3.1 contribuye en la corriente total de Ca²⁺ en las células espermatogénicas de ratón. Nuestros resultados con los bloqueadores químicos nos indicaron que el ácido niflúmico tiene una IC₅₀ de ~75 μM y que no cambia la dependencia de voltaje de los canales. El ácido niflúmico hace más lenta tanto la activación como la inactivación de los canales de Ca²⁺ tipo T pero no afecta el mecanismo de cierre de los canales. Esta droga puede inhibir a los canales desde el estado cerrado, pero tiene un efecto mayor cuando los canales están en el estado abierto y en el inactivado. Nuestros resultados con el celecoxibe nos indicaron que inhibe las corrientes de Ca²⁺ tipo T con una IC₅₀ ~27 μM y no cambia la dependencia del voltaje de los canales. Este fármaco no cambió la cinética de activación ni la cinética de inactivación en el estado estacionario de las corrientes de Ca²⁺ tipo T. Este compuesto a diferencia del ácido niflúmico no cambió la apertura ni la inactivación de los canales. El mecanismo de cierre también permaneció sin cambio. El celecoxibe aumentó la tau de recuperación de la inactivación de forma similar a lo observado con el ácido niflúmico, lo que nos indicó que posiblemente estabiliza el estado inactivado de los canales previniendo que se puedan activar nuevamente de forma rápida. Este resultado también nos indicó que posiblemente una de las isoformas de los Ca_v3 es más sensible al bloqueo por estas drogas.

En este estudio demostramos que la corriente de Ca²⁺ tipo T está conformada por más de una isoforma y que tanto el ácido niflúmico como el celecoxibe afectan estas

corrientes en las células espermatogénicas de ratón. El uso indiscriminado de este tipo de fármacos podría comprometer de manera general las funciones fisiológicas que dependen de la actividad de los canales de Ca^{2+} tipo T en diferentes tipos de células y de manera particular podrían afectar posiblemente el desarrollo de las células germinales.

Antecedentes

1.1 El papel del Ca^{2+} en la fisiología animal.

El Ca^{2+} es un elemento esencial del que dependen una gran diversidad de proteínas, enzimas y procesos de transducción de señales que se generan en las células en general en respuesta a estímulos externos. Dentro de los procesos dependientes de Ca^{2+} se encuentran la generación y propagación del impulso nervioso, las señales marcapaso de las células cardiacas, así como en los procesos de quimiotaxis, secreción hormonal y en la generación y maduración de los gametos, por mencionar solo algunos (Pérez-Reyes 2003). El estudio de los mecanismos de transporte de Ca^{2+} y del mantenimiento y regulación de la homeostasis de este ion en la célula ha sido por décadas uno de los temas de estudio más intrigantes en la fisiología celular. La pérdida del control en la regulación del Ca^{2+} puede disparar efectos dañinos tan graves como por ejemplo la muerte celular programada (Orrenius et al., 2003), y en el caso particular de los gametos puede comprometer la capacidad de los espermatozoides para fecundar al óvulo y en todo caso el desarrollo embrionario del nuevo individuo (Krausz et al., 1995; Baldi et al., 1999; Whitaker, 2008; Espino et al., 2009).

1.2 Los mecanismos de transporte de Ca^{2+} en las células animales.

En las células animales el gradiente de concentración de Ca^{2+} entre el medio extra e intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_o \sim 2 \text{ mM}$; $[\text{Ca}^{2+}]_i \sim 100 \text{ nM}$) favorece la entrada de este ion a través de los mecanismos de transporte pasivo o canales de Ca^{2+} . El incremento descontrolado de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podría ocasionar la pérdida de la regulación de enzimas, la expresión

genética y disparar procesos de apoptosis en las células (Orrenius et al., 2003). El Ca^{2+} se puede transportar a través de (bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP, así como de los sistemas de transporte secundario (intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$) que se encuentran en la membrana plasmática y en las membranas de los organelos internos que sirven como reservorios de Ca^{2+} . El gradiente de Ca^{2+} favorece la entrada de este catión a través de los canales iónicos presentes en la membrana plasmática lo que aumenta rápidamente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y desencadena cascadas de señalización vitales para la célula (Costello et al., 2009). El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede originarse también por la liberación de Ca^{2+} de las pozas internas como por ejemplo del retículo endoplásmico (RE) a través de mecanismos de liberación de Ca^{2+} inducidos por inositol 1-4-5 trifosfato (IP3, Mikoshiba 2007) o por la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR; Bootman et al., 2001; Whitaker, 2008). El mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} resulta del adecuado funcionamiento y la comunicación entre los diversos sistemas de transporte de la membrana plasmática y los reservorios intracelulares de Ca^{2+} (RE, núcleo, mitocondrias). Actualmente existe un gran interés entre la comunidad científica por establecer cuáles son los elementos genéticos y moleculares que participan en el transporte, la regulación y el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} en las células germinales.

1.3 La clasificación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV).

Los primeros registros de corrientes de Ca^{2+} realizados en miocitos cardiacos y en fibras de Purkinje (Reuter 1967; 1979) revelaron la existencia de canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje (CCDV). Estudios posteriores revelaron que los CCDV

participan activamente en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} y que sus propiedades eléctricas están relacionadas con el tipo de tejido en el que se expresan. En el músculo cardíaco y en el esquelético las corrientes de Ca^{2+} se caracterizan por tener un umbral de activación por voltajes despolarizados (High Voltage Activated; > -20 mV), son de alta conductancia y tienen una inactivación lenta ($\tau \sim 2000$ ms) y dependiente de voltaje (Pérez-Reyes 2003). Además de estas propiedades se sabe que los canales tipo HVA son regulados por fosforilación a través de proteínas cinasas dependientes de AMPc, y que se bloquean de manera específica por las dihidropiridinas, las fenilalquilaminas, y las benzodiazepinas (Reuter 1983), que son características particulares de los canales de Ca^{2+} tipo Long lasting (Nowycky et al., 1985).

En contraste, los estudios realizados por Hagiwara y colaboradores en ovocitos de estrella de mar (Hagiwara et al., 1975), y por Llinas y Yaron en neuronas de Purkinje (Llinás y Yarom, 1981), revelaron la existencia de canales de Ca^{2+} que se activan con potenciales cercanos a -60 mV, con una actividad máxima a potenciales de entre -30 y -20 mV, y con actividad transitoria (Transient) ya que se inactivan en pocos milisegundos ($\tau_{\text{inact}} < 50$ ms). La conductancia unitaria de los canales tipo T es de ~ 8 pS, y se bloquean por mibefradil ($\text{IC}_{50} \sim 1 - 10$ μM) (Pérez-Reyes 2003). Este conjunto de propiedades nos permite separar a los CCDV en dos grupos principales los HVA o tipo L, y los LVA o tipo T.

Los CCDVs están formados principalmente por la subunidad alfa (α) que se compone de cuatro dominios proteicos cada uno conformado por seis segmentos

transmembranales (**S1-S6**). Los segmentos **S1-S3** son estructurales mientras que el **S4** contiene aminoácidos cargados principalmente argininas, que le permiten sentir los cambios en el potencial de membrana celular, por lo que se le conoce comúnmente como el sensor de voltaje. El **S5** está unido al **S6** por un asa externa que forma el poro de conducción iónica. Diversos tipos de canales de Ca^{2+} pueden o no presentar subunidades accesorias a la α que contribuyen con el adecuado ensamblaje, funcionamiento y la regulación de la actividad de los CCDVs (Caterall 2000; Pérez-Reyes 2003).

Los CCDVs se pueden caracterizar y diferenciar por sus propiedades biofísicas como son la respuesta al voltaje, la selectividad al Ca^{2+} y al Ba^{2+} , la cinética de inactivación y la de cierre, así como por la tau de recuperación de la inactivación. También es posible diferenciarlos de acuerdo a su sensibilidad al bloqueo por agentes químicos como el Ni^{2+} y el Zn^{2+} , y por fármacos y toxinas de origen natural (Caterall 2000; Pérez-Reyes 2003). Esta caracterización ha permitido separar las 10 isoformas de los CCDVs y agruparlas en 3 familias principales: Ca_v1 , y Ca_v2 para los HVA y Ca_v3 para los LVA. La familia de canales Ca_v1 se compone de 4 isoformas la $\alpha1S$; 1C; 1D; y 1F. Las cuatro isoformas presentan una corriente de Ca^{2+} tipo L. Dentro de la familia Ca_v2 , se agrupan las subunidades: $\alpha1A$; 1B; y 1E cuyas corrientes son de tipo P/Q; N y R, respectivamente. Mientras que la familia Ca_v3 se compone de tres isoformas la $\text{Ca}_v3.1$ ($\alpha1G$); la $\text{Ca}_v3.2$ ($\alpha1H$) y la $\text{Ca}_v3.3$ ($\alpha1I$). Los canales de la familia Ca_v3 se diferencian de las otras dos familias porque carecen principalmente de subunidades accesorias a la subunidad α . Esta última característica ha facilitado la expresión de los genes recombinantes de la familia Ca_v3 en sistemas heterólogos, donde sus propiedades

biofísicas son muy parecidas a las de los canales que se expresan en sistemas nativos. Las propiedades de las corrientes de Ca^{2+} de la familia Ca_v3 son muy similares entre sí debido a que comparten una alta homología a nivel de secuencia (Pérez-Reyes 2003). Sin embargo, es posible separarlas gracias a sus propiedades finas como la tau de inactivación y por el tiempo que les toma salir de esta inactivación, así como por su selectividad al Ba^{2+} , y por su sensibilidad al Ni^{2+} y a diversos compuestos químicos como los anti-hipertensivos y los anti-arrítmicos (Pérez-Reyes, et al., 2009).

1.4 La participación del Ca^{2+} en la producción de gametos y en los procesos de fecundación.

La regulación del Ca^{2+} es fundamental en todos los organismos animales. En los organismos de fecundación externa como en el erizo de mar la señalización a través del Ca^{2+} le ayuda al espermatozoide a cambiar su trayectoria y redirigirse hacia el óvulo para fecundarlo (Wood et al., 2007; Guerrero et al., 2010). En el caso de los organismos de fecundación interna como en los mamíferos el Ca^{2+} es necesario para la producción de gametos, así como para que estos viajen, encuentren al óvulo y se fusionen para dar origen a un nuevo organismo. El proceso de generación de gametos involucra la participación de mecanismos de generación, diferenciación y de aporte constante de gametos de alta calidad en el macho. Actualmente se ha generado un gran interés en estudiar los mecanismos moleculares que participan en la espermatogénesis, debido a que los agentes químicos como los pesticidas, los desechos industriales y los agentes químicos sintéticos de los alimentos, por mencionar solo algunos afectan la fertilidad en humanos (Akingbemi and Hardy, 2001). Los

canales de Ca^{2+} tipo T son los más abundantes en las células espermatogénicas en los roedores (Benoff 2007; Santi et al., 1996), y podrían ser la entrada principal de Ca^{2+} que desencadena la expresión de genes que conllevan a las células espermatogénicas a entrar en muerte celular programada (Mishra et al., 2001). Debido a esto estudiar y conocer la regulación de la actividad de los canales tipo T en células espermatogénicas es un requisito indispensable para entender su participación en la generación de nuevos espermatozoides.

En los mamíferos los espermatozoides maduros no pueden fecundar al óvulo sin antes experimentar cambios bioquímicos y moleculares importantes. Cuando los espermatozoides entran en contacto con el tracto reproductor femenino la membrana plasmática pierde colesterol y se reorganiza, la actividad de canales de Cl^- y de bicarbonato, así como de los intercambiadores de protones hace que se modifique el pH intracelular (pH_i). La entrada de Ca^{2+} y de Na^+ del medio externo despolariza el potencial de membrana (E_m). En conjunto esta serie de cambios se conoce como capacitación de los espermatozoides (Darszon et al., 2006). Cuando los espermatozoides pasan de los testículos al epidídimo adquieren la capacidad de moverse. Un paso posterior a la capacitación es la hiperactivación de la movilidad, lo que les permitirá a los espermatozoides abrirse paso entre los epitelios y ascender en el tracto reproductor femenino para alcanzar y fecundar localizar al óvulo. Una de las etapas finales de la fecundación es un proceso que se conoce como Reacción Acrosomal (RA), que se caracteriza por la pérdida de membrana plasmática y la exposición de la membrana acrosomal interna así como la liberación de enzimas hidrolíticas que ayudan al espermatozoide a abrirse paso entre las distintas capas de

células y las glicoproteínas que conforman a la Zona Pelucida (ZP) que rodea al óvulo. Este proceso es altamente dependiente del Ca^{2+} extracelular (Darszon et al., 2006) y es sensible a las dihidropiridinas (bloqueadores específicos de los CCDVs) (Florman et al., 1992; 1994; Pérez-Reyes 2003).

Las evidencias acumuladas hasta la fecha indican que en la mayoría de especies de organismos de reproducción sexual la búsqueda y localización del óvulo depende de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Publicover et al., 2007; Darszon et al., 2011). Un ejemplo de esto ocurre en la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar de la especie *Strongylocentrotus purpuratus* en donde los cambios en el batido del flagelo están sincronizados con cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Wood et al., 2007). Esta estrategia le permite al espermatozoide del erizo reorientarse en el espacio y encontrar el centro del gradiente del atrayente químico que rodea al óvulo (Guerrero et al., 2010). Resulta interesante que los canales de Ca^{2+} de la familia Ca_v3 se encuentran distribuidos tanto en espermatozoides de erizo de mar como en mamíferos, incluido el humano lo que sugiere un papel común en las vías de señalización que ocurren durante el proceso de fecundación, y posiblemente desde la formación de los gametos. Una de las evidencias más sólidas que apoyan estas hipótesis es que las tres isoformas de la familia de canales de Ca^{2+} Ca_v3 se localizan a nivel de proteína en células espermatogénicas de ratón (Treviño et al., 2004), y en distintas secciones de los espermatozoides maduros de ratón y de humano (Darszon et al., 2011). La amplia distribución de los Ca_v3 en organismos de fecundación externa permite suponer su participación en los procesos dependientes de Ca^{2+} durante la fecundación, sin embargo hasta la fecha solo se ha registrado la corriente tipo T en células espermatogénicas de ratón. La falta de registros

eletrofisiológicos de los Ca_v3 en los espermatozoides maduros puede deberse a que su conductancia es tan baja que no se puede resolver con la técnica de “patch-clamp”. Otra posibilidad es que durante la maduración de los espermatozoides los Ca_v3 entran en un estado de regulación negativa que los mantiene inactivados. Diversos estudios farmacológicos apoyan la hipótesis de la participación de los canales tipo T en los procesos de fecundación dependientes de Ca^{2+} , por ejemplo en el espermatozoide del erizo de mar de el agonista natural dispara un aumento transitorio de Ca^{2+} que es sensible al verapamil y a las dihidropiridinas (Darszon et al., 2006), bloqueadores específicos de los Ca_v s (Pérez-Reyes et al., 2003). La ausencia de mediciones directas de la actividad de los Ca_v3 en espermatozoides maduros no descarta su participación en los procesos de fecundación. Sin embargo, el hecho de que las corrientes de los Ca_v3 sea tan dominante en las células espermátogénicas sugiere su participación en los procesos de formación y posiblemente en la maduración de los espermatozoides (Mishra et al., 2006; Darszon et al., 2011).

1.5 Las propiedades biofísicas de los canales de Ca^{2+} tipo T que los hace buenos candidatos para participar en los procesos de fecundación en los espermatozoides maduros.

La actividad de los canales de Ca^{2+} tipo T depende de sus propiedades biofísicas y de las condiciones fisiológicas del tipo celular en donde se expresan. Las propiedades biofísicas de los canales tipo T se pueden resumir de la siguiente manera:

- 1) Requieren de un potencial hiperpolarizante (≤ -90 mV) para remover su inactivación, y de potenciales despolarizantes para abrirlos.

- 2) Tienen un umbral de activación entre -60 y -50 mV, y una corriente al pico en ~ -20 mV.
- 3) Las corrientes son transitorias y poco selectivas para el Ba^{2+} y el Ca^{2+} .
- 4) Se activan e inactivan rápidamente (≤ 50 ms) y presentan corrientes de ventana.
- 5) La recuperación de la inactivación (τ_h), es decir el tiempo que se necesita para volver a activar a los canales después de un ciclo de apertura-inactivación y cierre es diferente para cada isoforma (τ_h de $Ca_v3.1 < 100$; $Ca_v3.2 > 400$, y $Ca_v3.3 \sim 250-300$ ms), por lo que es un parámetro que nos ayuda a diferenciar la contribución de cada isoforma en la corriente total de Ca^{2+} .

Estas propiedades correlacionan con algunos de los cambios que ocurren en los espermatozoides maduros durante el proceso de fecundación. En primer lugar, uno de los resultados de la capacitación de los espermatozoides de mamífero es la hiperpolarización del potencial de membrana que pasa de ~ -50 mV a ~ -70 mV, teóricamente es un potencial que ayudaría a remover la inactivación de los canales de Ca^{2+} tipo T en estas células. En segundo lugar, la apertura de los canales tipo T es transitoria, esto ayudaría a regular de manera muy fina la entrada de Ca^{2+} a la célula. En tercer lugar, la presencia de corrientes de ventana que se presentan a potenciales entre -50 y -40 mV permitiría mantener un nivel basal de Ca^{2+} en el citoplasma que quizá le permita responder con mayor rapidez por ejemplo en la movilidad hiperactivada. Esta correlación no descarta la presencia y participación de otro tipo de

transportadores de Ca^{2+} como los CatSper cuya actividad está regulada por incrementos en el pH_i (Kirichok et al., 2006), lo que también correlaciona con la capacitación de los espermatozoides (Darszon et al., 2006). La importancia de los CatSper ha aumentado en el campo de la fecundación debido a que su actividad se regula positivamente por la progesterona en espermatozoides de humano (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011) y a que los ratones nulos de *CatSper* son infértiles (Xia and Ren 2009). De manera interesante los espermatozoides nulos en *CatSper* sí son capaces de desarrollar la RA y fecundan óvulos a los que se ha quitado artificialmente la zona pelúcida, evidencias que apoyan la hipótesis de que otras conductancias de Ca^{2+} podrían participar en estos procesos (Publicover y Barratt, 1999; Darszon et al., 2011). Existen evidencias de que los canales tipo T son regulados por factores intracelulares como por ejemplo por proteínas cinasas en neuronas, por GMPc en células del receptor olfatorio y por receptores acoplados a proteínas G en canales recombinantes (Iftinca et al., 2007; Kawai y Miyachi, 2001; Rangel et al., 2010). Actualmente no existen evidencias directas que indiquen la regulación de los Ca_v3 por factores intracelulares en células espermatogénicas, sin embargo esta posibilidad no se puede descartar.

1.6 Las corrientes de Ca^{2+} tipo T en las células espermatogénicas de ratón.

Las evidencias funcionales de los canales tipo T en células espermatogénicas de ratón están ampliamente documentadas (Hagiwara y Kawa, 1984; Arnoult et al., 1996; Lievano et al., 1996; Espinosa et al., 1999; Sakata et al., 2001; Jagannathan et al., 2002; Stamboulian et al., 2004; Darszon et al., 2006 y 2011). En 1996 Santi y

colaboradores caracterizaron la corriente de Ca^{2+} tipo T en las células espermatogénicas de ratón y reportaron que éstas presentan una recuperación de la inactivación de ~ 117 ms a -100 mV (Santi et al., 1996). Este parámetro es similar al de la isoforma $\text{Ca}_v3.1$, pero es 4 veces menor el de la $\text{Ca}_v3.2$ y 3 veces menor que el de la $\text{Ca}_v3.3$ recombinantes (Pérez-Reyes 2003). En las células espermatogénicas del ratón con fondo genético $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ se registraron corrientes de Ca^{2+} tipo T que presumiblemente pertenecen a la isoforma $\text{Ca}_v3.2$ (Stambouljian et al., 2004). En contraste las células espermatogénicas del ratón nulo en la isoforma $\text{Ca}_v3.2$ ($\text{Ca}_v3.2^{-/-}$) no tienen corrientes de Ca^{2+} de tipo T (Escoffier et al., 2007). Estas evidencias sugieren que la corriente de Ca^{2+} tipo T representa la actividad de la isoforma $\text{Ca}_v3.2$ principalmente. En el caso de los ratones mutantes en el $\text{Ca}_v3.2^{-/-}$ se debe comprobar la presencia del mensajero del $\text{Ca}_v3.1$ para descartar que la expresión de este gen no haya sido afectada al realizar el apagamiento del gen homólogo $\text{Ca}_v3.2$. El hecho de que los ratones mutantes $\text{Ca}_v3.2^{-/-}$ sean fértiles apoya la hipótesis de que otros transportadores de Ca^{2+} como los transportadores tipo CatSper (Kirichov et al., 2006) podrían contribuir en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Xia y Ren, 2009), la presencia de otros CCVD como los tipo L tampoco se puede descartar (José O et al., 2010). Sin embargo, debido a que no se ha generado la doble mutante en los Ca_v3 no se puede descartar la posible redundancia de estos canales en etapas maduras de los espermatozoides. Las diferencias encontradas entre las corrientes de Ca^{2+} tipo T abre la posibilidad de que la corriente tipo T sea el resultado de la actividad combinada de más de una isoforma de los Ca_v3 . Para aclarar esto es necesario realizar una caracterización profunda de la biofísica de los canales tipo T que se presentan en los ratones silvestres y e los ratones

mutantes $Ca_v3.1^{-/-}$ que permita conocer que isoforma o isoformas generan esta corriente.

Como lo mencionamos anteriormente las tres isoformas de los canales de Ca^{2+} tipo T se han inmunolocalizado tanto en espermatozoides maduros de ratón, como de humano (Treviño et al., 2004; Darszon et al., 2006; Park et al., 2003). Los canales tipo T registrados en las células espermátogénicas tienen distinta sensibilidad a las dihidropiridinas, al mibefradil, la pimozida y la amilorida que los que se expresan en las células somáticas (Arnoult et al., 1998), lo que sugiere la diversidad molecular de este tipo de canales. El uso de fármacos que ayuden a diferenciar las propiedades de los canales tipo T nos permitirá en establecer su participación en los procesos de fecundación. Un trabajo previo hecho por nuestro grupo de investigación reveló que el ácido niflúmico (un bloqueador típico de canales aniónicos; White y Aylwin, 1990; Scott-Ward et al., 2004), bloquea las corrientes de Ca^{2+} tipo T en células espermátogénicas con una IC_{50} menor a 50 μM (Espinosa et al., 1999). Adicionalmente este fármaco evitó que ocurriera la reacción acrosomal en ensayos donde se uso la progesterona como inductor natural en espermatozoides maduros de ratón, de donde se calculó una IC_{50} de $\sim 84 \mu M$ para el AN (Espinosa et al., 1998). Aunque los valores de IC_{50} son relativamente altos con respecto a otros inhibidores más potentes de canales de Ca^{2+} tipo T, la importancia de estos resultados proviene del hecho de que fármacos con la misma estructura química que el AN son utilizados indiscriminadamente por los humanos, para el tratamiento de malestares tan comunes como el dolor de cabeza y las reacciones inflamatorias leves.

1.7 El efecto del Ácido Niflúmico en los canales iónicos.

El AN pertenece a un grupo de drogas conocidas como antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o fenamatos. Los blancos principales de estos fármacos incluyen a las ciclooxigenasas tipo 1 y 2. La isoforma COX-1 se expresa constitutivamente en varios tejidos y tipos celulares en mamíferos, mientras que la expresión de COX-2 es inducible solo en los sitios o zonas de inflamación y en ciertos carcinomas (Subbaramaiah et al., 1996; Sun et al., 2000; Sun et al., 2005). La actividad de la COX-1 es de suma importancia en el tracto digestivo, debido a que media la síntesis de prostaglandina E₂, un potente gastroprotector (Singh y Triadafilopoulos, 1999). Ciertas lesiones a nivel del estómago se consideran como efectos colaterales por el consumo prolongado de antiinflamatorios poco específicos. Un ejemplo es la aspirina común, que como este tipo de drogas, inhibe de manera irreversible a ambas isoformas de la COX. Los fenamatos se utilizan principalmente como antiinflamatorios, aunque también alivian el dolor en padecimientos como la artritis reumatoide. A pesar de su eficacia en el tratamiento de estos padecimientos, sus efectos a nivel de tejido son variables debido a su baja especificidad, por ejemplo dependiendo de su concentración los fenamatos pueden activar o inhibir canales de Cl⁻ (Liantonio et al., 2006). Por otro lado, se ha reportado que el AN puede: a) bloquear o activar a los receptores tipo GABA_A dependiendo de las isoformas de sus subunidades (Sinkkonen et al., 2003), bloquear a los canales K_v2.1 (Lee y Wang, 1999), c) activar conductancias de gran amplitud dependientes de Ca²⁺ (Ottolia y Toro, 1994), d) alterar la voltaje dependencia del “gating” de canales: K_v4.2 y K_v4.3 (Wang et al., 1997), KCNQ1/minK (Busch et al., 1994), KCNQ2/3 (Peretz et al., 2005), y del tipo marcapaso HCN (Accili y DiFrancesco,

1996; Satoh y Yamada, 2001). Recientemente se ha reportado que el AN altera el “gating” de los HCN2 ya que interactúa con algunos residuos en el sensor de voltaje S4 (Cheng y Sanguinetti 2009).

Nuestros resultados con el AN adquieren una gran importancia médica en el contexto de que los canales de Ca^{2+} tipo T se pueden bloquear por un antiinflamatorio de uso común, y con ello afectar múltiples procesos fisiológicos en los que participan incluida la generación de gametos y la fecundación.

1.8 El celecoxibe es un compuesto antiinflamatorio de uso común que inhibe a los canales iónicos.

El Cbx al igual que el AN forma parte del grupo de drogas AINEs que inhiben a la COX-1 y 2 (Vane et al., 1994; Subbaramaiah et al., 1996). Se utilizan para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades. Con el objetivo de evitar lesiones gástricas por la inhibición de la COX-1 se han desarrollado AINEs para inhibir específicamente la COX-2 (DeWitt, 1999). Estas drogas incluyen al Cbx, rofecoxibe y el valdecoxibe. Durante los primeros años en el mercado a estas drogas fueron consideradas como “la aspirina perfecta”. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que al menos el rofecoxibe y el valdecoxibe tienen efectos colaterales a nivel cardiovascular, por lo que fueron retirados del mercado en América del Norte. Para el 2007 la única AINE prescrita legalmente en los Estados Unidos era el Celebrex (Brownstein et al., 2007). En el resto de América aún es posible adquirir estos fármacos sin prescripción médica. Actualmente se ha documentado que los inhibidores de la COX-2 son agentes químicos que impiden la formación de tumores (Sheng et al., 1999; Prescott et al.,

2000). Los estudios sugieren que el Cbx podría tener blancos distintos a las COX-2 (Grosch et al., 2001; Tegeder et al., 2001). Un ejemplo de una vía independiente de la COX-2 es que el Cbx provoca que se detenga el ciclo celular y decrece la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de colon que no expresan la COX-2 (Grosch et al., 2001). El Cbx es capaz de inhibir el crecimiento celular en líneas de próstata de humano, donde el efecto anti tumoral de esta droga puede ser totalmente independiente de la inhibición de la COX-2 (Patel et al., 2005). Una de las vías alternas que se conocen sobre la cual el Cbx actúa como un agente anti tumoral que no involucra a la COX-2 es a través de la vía Akt en cáncer de próstata (Kulp et al., 2004). En presencia de Cbx la vía de señalización mediada por Akt se detiene probablemente a través de la inhibición de la PDK-1 una proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos que activa a la Akt, que interrumpe el ciclo celular (Vivanco et al., 2002). El Cbx es capaz de inhibir la anhidrasa carbónica (Weber et al., 2004) y bloquea canales de Na⁺ activados por voltaje en neuronas del ganglio de la raíz dorsal en rata (Park et al., 2007). El Cbx inhibe canales de K⁺ y Na⁺ activados por voltaje en neuronas aisladas de retina de rata (Frolov et al., 2008a) e induce arritmia en corazón de *Drosophila* (Frolov et al., 2008b), inhibiendo a los canales de K⁺ tipo Shab (Kv2) (Hedge et al., 1999; Singh and Singh 1999; Chopra et al., 2000). Recientemente se demostró que el Cbx es capaz de bloquear a los canales tipo Kv2.1 en el estado cerrado y en el estado abierto con una IC₅₀ de 9.1 μM (Frolov et al., 2010) y que modifica el “gating” acelerando la inactivación de los canales de K⁺ tipo Shab (Arias-Olguín et al, 2011). En el caso particular de los canales de Ca²⁺ hasta ahora el único reporte que se conoce es un estudio de Zhang y colaboradores (2007) en células inmaduras PC12, donde

describe que el Cbx es capaz de bloquear las corrientes tipo L de manera reversible y con una IC_{50} de 0.45 μ M. El Cbx inhibe la adenilato ciclasa responsable de la producción de AMPc que regula diversos procesos celulares incluyendo la entrada de Ca^{2+} y el estado de fosforilación de los CCDV (Saini et al., 2003; Catterall 2000), por lo que este tipo de inhibición indirecta de los canales de Ca^{2+} no se puede descartar. Se ha documentado que los bloqueadores de los CCDV son efectivos para inhibir el crecimiento de tumores (Catterall 2000), posiblemente a través del bloqueo de los canales de Ca^{2+} . Como ya lo hemos mencionado en párrafos anteriores los CCDV están ampliamente distribuidos en células y tejidos, incluyendo las células espermatogénicas y el espermatozoide mismo. Ambos tipos de canales, los tipo L y los tipo T se cree que participan en la regulación del Ca^{2+} intracelular durante los procesos previos a la fecundación en mamífero (Treviño et al., 2004; Darszon et al 2006). Es probable que el Cbx tenga como blanco las corrientes de Ca^{2+} tipo T que se expresan en este tipo de células. De ser así este fármaco podría ser una buena herramienta farmacológica para determinar la contribución de los Ca_v3 en los procesos fisiológicos que ocurren en el espermatozoide.

2. Justificación.

Con base en estos antecedentes decidimos caracterizar las propiedades biofísicas que nos ayuden a diferenciar la participación de las distintas isoformas de los Ca_v3 en la corriente de Ca^{2+} en las células espermatoogénicas de ratón. Adicionalmente decidimos caracterizar el mecanismo de bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo T por AN y por Cbx en células espermatoogénicas para determinar su utilidad en la separación de las distintas isoformas que conforman la corriente tipo T. Este estudio nos ayudará a determinar indirectamente si el uso indiscriminado de este tipo de fármacos puede afectar la producción y el adecuado funcionamiento de los gametos.

3. Hipótesis.

Si la corriente de Ca^{2+} tipo T es el resultado de la actividad de otra isoforma adicional a la de los $\text{Ca}_v3.2$, las propiedades biofísicas de esta corriente serán similares a las reportadas para las isoformas $\text{Ca}_v3.1$ y/o 3.3 recombinantes.

Si el AN es un bloqueador de los canales tipo T en células espermatogénicas, podría tener un efecto diferencial en cada una de las isoformas de los Ca_v3 .

Si el Cbx bloquea las corrientes de Ca^{2+} tipo T en células espermatogénicas, podría utilizarse como herramienta farmacológica para determinar la participación de los canales Ca_v3 en los procesos de fecundación.

4. Objetivo general:

Determinar la contribución de las distintas isoformas de los Ca_v3 en las corrientes de Ca^{2+} tipo T en células espermatoogénicas de ratón y establecer el mecanismo de bloqueo por el AN y por el Cbx.

4.1 Objetivos particulares:

1.- Caracterizar las propiedades biofísicas de la corriente de Ca^{2+} tipo T en células espermatoogénicas de ratón para establecer los parámetros que nos permitan separar las distintas isoformas de los Ca_v3 .

a) Dependencia de Voltaje de la activación y la inactivación (V_{50} y k).

b) Tau de activación y de inactivación.

c) La Tau de recuperación de la inactivación.

2.- Establecer el mecanismo de bloqueo por el AN y por el Cbx sobre la corriente de Ca^{2+} tipo T:

a) Determinar el efecto de estos bloqueadores sobre la dependencia al voltaje.

b) Medir la IC_{50} de bloqueo para cada uno de los fármacos.

c) Caracterizar el efecto del AN y del Cbx sobre los parámetros V_{50} y k de la corriente tipo T.

- d) Determinar el efecto del AN y Cbx sobre la Tau de activación, de inactivación y de desactivación de la corriente tipo T.
- e) Determinar si el bloqueo ocasionado por estas drogas es reversible.
- f) Estudiar si el bloqueo por estos fármacos depende de la frecuencia de estimulación de los canales.
- g) Determinar si el bloqueo por estas drogas se favorece en alguno de los estados de los canales (cerrado, abierto, ó inactivado).
- h) Determinar el efecto del AN y del Cbx sobre la Tau de recuperación de la inactivación.

5. Materiales y métodos.

5.1 Disociación de células espermatoogénicas. Las células espermatoogénicas fueron extraídas de ratones machos adultos (2–3 meses), de la cepa CD-1 criados y mantenidos en condiciones de laboratorio (Bioterio UNAM). Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical, ambos testículos fueron extraídos y los túbulos seminíferos fueron disociados en medio HS libre de Ca^{2+} con ayuda de pinzas de punta fina y bajo la luz de un microscopio estereoscópico. Se lavó exhaustivamente los túbulos seminíferos y se pasaron a través de una pipeta de transferencia, esto para expulsar las células por los extremos cortados de los túbulos. Una vez extraídas, las células espermatoogénicas se mantuvieron a 4°C en medio HS suplementado con 2 mM de Ca^{2+} hasta su uso. Una muestra de células aisladas fue colocada en una cámara de plexiglás montada sobre la platina de un microscopio invertido (Eclipse 2000, Nikon Co. Japón), para observar su morfología. Para los registros, las células se fijaron en el fondo de la cámara de plexiglás, y fueron continuamente bañadas con la solución de registro (BS), a una velocidad de perfusión de 2 ml/min.

5.2 Registros electrofisiológicos utilizando la técnica de “patch-clamp” en la configuración de célula completa. Para registrar las corrientes de Ca^{2+} en células espermatoogénicas, utilizamos la técnica de “patch-clamp” en la configuración de célula completa. Brevemente, la pipeta del electrodo de registro de Ag-AgCl con una resistencia de entrada de 8–10 mega Ohms ($\text{M}\Omega$), se acercó a la célula con ayuda de un micromanipulador hidráulico (Narishige, Tokyo Japón), mientras se monitoreaba la resistencia de la pipeta con el osciloscopio. La resistencia del electrodo es un indicador

de la cercanía de la pipeta con la membrana plasmática. Cuando la pipeta entró en contacto con la membrana, la resistencia del electrodo aumentó varios órdenes de magnitud, hasta que se estableció lo que se conoce como un giga sello (1–10 GΩ). Bajo estas condiciones de alta resistencia eléctrica, se aplicó un pulso de presión negativa a la membrana con el objetivo de romper el sello y establecer continuidad química y eléctrica entre el micro electrodo y el interior celular. La composición de la solución de la pipeta fue (en mM): CsMeSO₃ 120; CsF 10; CsCl 15; EGTA 5; Cs-HEPES 5; ATP-Mg²⁺ 4; fosfocreatina 10 (pH 7.3). La concentración interna de Cs⁺ por sí misma bloqueó efectivamente las corrientes asociadas a los canales de K⁺ endógenos. La composición de la solución del baño fue (en mM): CaCl₂ 2; NaCl 130; KCl 3; MgCl₂ 2; NaHCO₃ 1; NaH₂PO₄ 0.5; HEPES 5; glucosa 10 (pH 7.3). El baño fue aterrizado mediante un electrodo de Ag-AgCl conectado al cabezal del amplificador. Las corrientes iónicas se filtraron a 10 KHz (filtro Bessel de 4 polos), y se adquirieron a 2 KHz con un amplificador de patch-clamp (Axopatch 200A; Molecular Devices, Union City CA.), conectado a una PC mediante una interfase Análoga/Digital (Digidata 1200A; Molecular Devices, Union City CA). La generación de pulsos, el registro y análisis de los datos se hizo con ayuda de un software de computación (pCLAMP 9.0; Molecular Devices, Union City, CA.) Los transitorios capacitivos generados por el cierre del circuito eléctrico entre la pipeta y la membrana de la célula se compensaron electrónicamente. Todas las conductancias lineales (corriente de fuga, capacitivas residuales y canales no dependientes de voltaje), se compensaron en línea antes de cada registro mediante la aplicación de un protocolo de 4 pre-pulsos (P/4). Todos los experimentos se hicieron a temperaturas entre 25 y 28 °C. Las curvas corriente voltaje

(I-V) de los canales tipo T se construyeron mediante la aplicación de pulsos de voltaje de 350 ms de duración, partiendo de un potencial de mantenimiento (Holding Potential, HP) de -90 mV a pulsos de prueba (V_m) de -80 a +70 mV con incrementos de +10 mV. El intervalo de tiempo entre cada pulso fue de 3 s para evitar la acumulación de la inactivación de los canales tipo T. Los protocolos de voltaje se aplicaron antes (Control) y después de agregar la droga. El porcentaje de bloqueo del fármaco se estimó de la diferencia de corriente medida al pico generada por un pulso depolarizante de -20 mV en condiciones control (0 % de bloqueo). Para obtener la curva dosis respuesta se probó el efecto del AN en un rango de concentraciones de 0.5 a 1000 μ M. Los datos, se ajustaron con la ecuación de Hill:

$$Y = a / [1 + (X / X_0)^b]$$

Donde **a**, **b** y **X₀** representan el intercepto en y, la pendiente, y el valor de IC₅₀, respectivamente.

Tanto la cinética de activación como la de inactivación se ajustaron con una función exponencial estándar:

$$f(t) = \sum A_i e^{-t/\tau_i} + C$$

Donde, **τ_a** y **τ_i** representan la constante de tiempo de activación e inactivación, respectivamente. El ajuste de las corrientes tipo T se hizo para comparar la cinética del bloqueo parcial ocasionado por 100 μ M de AN con las corrientes registradas en condiciones control.

5.3 Determinación del bloqueo dependiente del estado de los canales.

5.3.1 El bloqueo en el estado cerrado de los canales. Para estudiar el efecto del AN sobre el estado cerrado de los canales, mantuvimos a las células a un HP= -90 mV y depolarizamos a -20 mV cada 120 s, asegurándonos con esto que los canales se mantuvieron la mayor parte del tiempo en estado cerrado. La adición de la droga se hizo mediante perfusión continua a una velocidad de 2 ml/min. La corriente registrada antes y después de la aplicación de la droga se tomó como Control y bloqueo, respectivamente.

5.3.2 El bloqueo en el estado inactivado de los canales. Para estudiar el efecto de la droga en estado inactivado, mantuvimos a las células a un HP= -20 mV durante la mayor parte del experimento. Con este protocolo la mayoría de los canales se mantuvieron en estado inactivado al momento de aplicar la droga. Posteriormente, para quitar la inactivación de los canales, aplicamos un pulso hiperpolarizante de -90 mV de 400 ms de duración y despolarizamos con un segundo pulso a -20 mV para abrir los canales y registrar el efecto del fármaco.

5.3.3 El bloqueo en el estado abierto de los canales. Debido a que los canales tipo T se mantienen abiertos unos pocos milisegundos (<50 ms), mantuvimos a las células a un HP= -90 mV y aplicamos un pulso despolarizante a -20 mV cada 5 s para abrir los canales. Esta frecuencia de estimulación nos permitió transitar por el estado abierto del canal y medir su interacción con la droga durante todo el experimento. La droga se adicionó mediante perfusión continua a una velocidad de 2 ml/min.

5.4 Los fármacos y las soluciones utilizadas.

El AN (2-[[3-(trifluoromethyl) phenyl] amino]- pyridine-3-carboxylic acid) se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se preparó una solución madre de 50 mM en dimetil sulfoxido (DMSO, de Sigma-Aldrich). Una muestra de la solución madre se disolvió en la solución de registro (SB) para obtener las concentraciones deseadas de la droga. A manera de control, y para evitar un efecto secundario de DMSO sobre las corrientes de Ca^{2+} , su concentración en las soluciones de AN se mantuvo constante a 0.1%.

El fármaco Cbx (4-[5-(methyl-phenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamida, lo obtuvimos desintegrando capsulas de 200 mg de Celebrex adquiridas en una farmacia local. Disolvimos unos cuantos miligramos de Cbx en DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), para preparar una solución madre de 50 mM. Una alícuota de esta solución concentrada se descongeló y disolvió en la solución de registro inmediatamente antes de cada experimento. El porcentaje máximo de DMSO que utilizamos fue de 0.1%.

5.5 La cinética de activación y de la inactivación en el estado estable de los canales de Ca^{2+} tipo T. Las curvas corriente voltaje (*I-V*) se construyeron graficando la corriente al pico como función del potencial del pre-pulso despolarizante (de -110 a -40 mV con incrementos de +5 mV), partiendo de un HP= -90 mV. Los valores de corriente se normalizaron a la corriente máxima obtenida con los prepulsos (I/I_{max}) en condiciones control. El valor de IC_{50} se calculó con la ecuación de Hill. Para las curvas de activación fue necesario convertir los valores de la corriente al pico de la curva *I-V* a valores de conductancia (*g*), utilizando la ecuación:

$$g_{Ca} = I_{Cap} / (V_m - E_{Ca})$$

Donde I_{Cap} es la corriente de Ca^{2+} al pico, V_m es el pulso de prueba, y la E_{Ca} es el potencial de inversión de la corriente de Ca^{2+} obtenido por extrapolación lineal de los valores de corriente en el segmento ascendente de la curva $I-V$.

Los valores de conductancia se normalizaron y ajustaron con la ecuación de Boltzmann para la conductancia:

$$G/g_{max} = \{1 + \exp [-(V - V_{50})/ k]\}^{-1}$$

Donde G es la conductancia al pico, g_{max} es la máxima conductancia de Ca^{2+} al pico, V_{50} es el punto medio de la curva de activación y k es el valor de la pendiente.

Los valores de la curva de inactivación en estado estable en condiciones control y con AN, se obtuvieron normalizando los valores de corriente a la corriente máxima (I/I_{max}) registrada. Los parámetros se obtuvieron ajustando los datos con la ecuación de Boltzmann para la corriente:

$$I/I_{max} = \{1 + \exp [(V - V_{50})/ k]\}^{-1}$$

Donde I es la corriente al pico, I_{max} es la corriente al pico cuando el pre-pulso fue de -110 mV, V es el potencial de pre-pulso, V_{50} es el valor de inactivación medio y k es el valor de la pendiente.

6. Resultados

Las células espermatoogénicas han sido un modelo celular ampliamente utilizado para identificar y caracterizar las corrientes iónicas que podrían participar en el proceso de fecundación del espermatozoide maduro (Darszon et al., 2011). Los canales tipo HVA y LVA están presentes a nivel de proteína tanto en las células espermatoogénicas como en los espermatozoides maduros (Treviño et al., 2004; Darszon et al., 2006). Los registros electrofisiológicos están sin embargo limitados a los canales de Ca^{2+} tipo T en las células espermatoogénicas de roedores, principalmente (Lievano et al., 1996; Arnoult et al., 1996; Santi et al., 1996; Espinosa et al., 1999; Stambouljian et al., 2004; Darszon et al., 2006; Escoffier et al., 2007). De las tres isoformas de los canales tipo T inmunolocalizadas en las células espermatoogénicas, la corriente preponderante parece corresponder a la isoforma $Ca_v3.2$ o $\alpha 1H$ (Treviño et al., 2004; Escoffier et al., 2007). No obstante no se puede descartar la contribución de las otras dos isoformas en la corriente total de Ca^{2+} que tienen características diferentes a las del $Ca_v3.2$ (Santi et al., 1996; Balderas et al., 2011) Estudios previos revelaron que el AN inhibe las corrientes tipo T en células espermatoogénicas (Espinosa et al., 1999) y la RA en espermatozoides maduros de ratón (Espinosa et al., 1998). En este trabajo nos propusimos, en primer lugar hacer un estudio biofísico detallado de la corriente de Ca^{2+} tipo T en células espermatoogénicas de ratón, con el fin de conocer los parámetros biofísicos que nos permitieran separar la contribución de cada isoforma en la corriente global de Ca^{2+} . Adicionalmente nos propusimos establecer el mecanismo de bloqueo por el AN y el Cbx, drogas antiinflamatorias de uso común que nos permitan conocer sus posibles efectos colaterales en la fertilidad de los humanos. Para caracterizar el

mecanismo de bloqueo del AN determinamos en primera instancia la sensibilidad de la corriente tipo T a este fármaco.

6.1 El ácido niflúmico bloquea las corrientes de Ca^{2+} tipo-T en las células espermatozógenas de ratón.

Para estudiar la corriente de Ca^{2+} tipo T en células espermatozógenas de ratón tipo paquiteno aplicamos el protocolo de pulsos de voltaje cuyo diagrama puede observarse en la figura 1. Brevemente, el potencial de las células se mantuvo a -90 mV y se aplicaron pulsos despolarizantes en un rango de -80 a +40 mV de 300 ms de duración. Con este protocolo pudimos registrar una corriente con un umbral de activación de ~-60 mV, con un pico máximo de corriente con pulsos de ~-20 mV (Fig. 1A). La inactivación de esta corriente se aceleró con pulsos despolarizantes ocasionando el característico entrecruzamiento de los trazos de las corrientes de Ca^{2+} tipo T, que se han registrado tanto en sistemas nativos como en los canales recombinantes (Pérez-Reyes 2003). Para determinar el efecto del AN sobre esta corriente aplicamos dosis crecientes de la droga (1 a 1000 μM) a lotes distintos de células, utilizando el protocolo de pulsos descrito para la figura 1A. El bloqueo máximo de la corriente de Ca^{2+} tipo T fue de ~85 % con 1 mM de AN, por lo que normalizamos la fracción de la corriente bloqueada a este valor. Es importante mencionar que con concentraciones de AN mayores a 1 mM no observamos un 100% de bloqueo de la corriente de Ca^{2+} . Con los datos de la fracción bloqueada construimos la curva dosis-respuesta y del ajuste con la ecuación de Hill obtuvimos una IC_{50} de ~74 μM (Fig. 1B). Con base en este valor, decidimos utilizar una concentración de 100 μM de AN para caracterizar su efecto en la corriente

residual. En estas condiciones observamos una reducción de ~50 % de la corriente entrante a todos los voltajes probados (Fig. 1C). Con estos datos construimos la curva $I-V$ y obtuvimos un V_{rev} de ~+40 mV (Fig. 1D y Tabla 1), similar al calculado en condiciones control (Fig. 1D símbolos negros). La curva $I-V$ nos indicó además que el

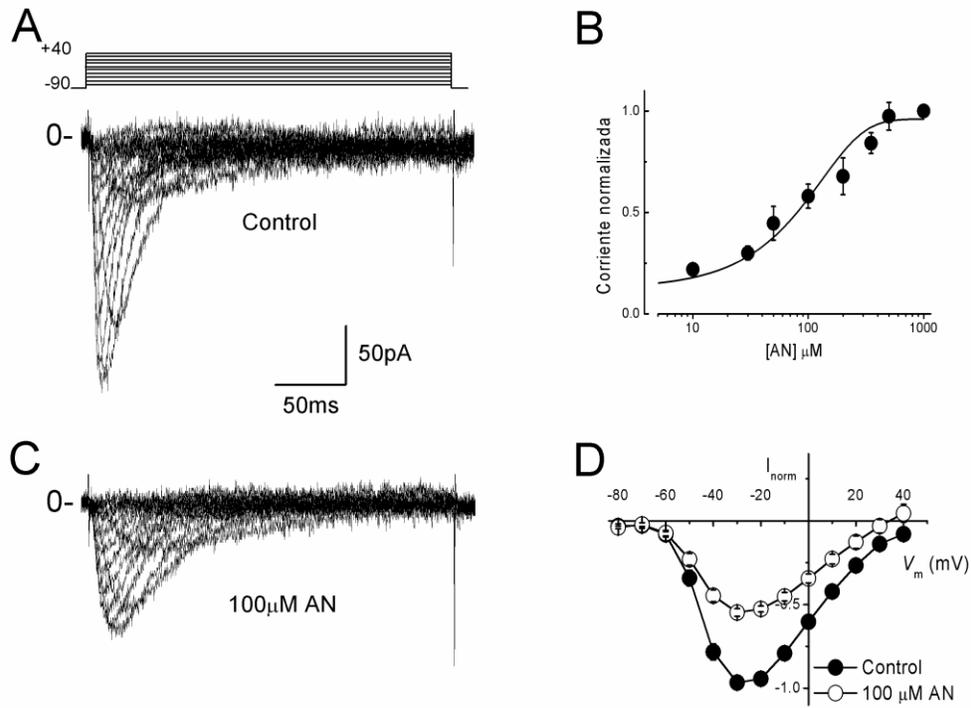


Figura 1. Bloqueo de las corrientes tipo T por el AN en células espermatogénicas de ratón. A) Familia de corrientes registradas en la configuración de célula completa en condiciones Control, en respuesta a pulsos despolarizantes de -80 a +70 mV en pasos de +10 mV, de un HP de -90 mV (se muestran los trazos de -80 a +30 mV por claridad). B) Curva dosis-respuesta. Los puntos en la gráfica (media \pm SEM) representan la fracción bloqueada de la corriente registrada a -20 mV para cada concentración de AN probada. La línea sólida representa el ajuste de los datos experimentales con la ecuación de Hill, de donde calculamos una IC_{50} de 73.5 μM para el AN. C) Corrientes registradas como en (A) pero en presencia de 100 μM AN. D) Curva corriente-voltaje ($I-V$), construida con la corriente al pico normalizada y promediada de 12 células individuales en condiciones Control (círculos llenos) y en presencia de 100 μM AN (círculos abiertos). En ambas condiciones, el umbral de activación de las corrientes se observó alrededor de -60 mV.

AN no alteró la dependencia de voltaje de la activación de las corrientes tipo T (Fig. 1D).

6.2 El ácido niflúmico no cambió la dependencia de voltaje de la activación ni de la inactivación en el estado estable de la corriente de Ca^{2+} tipo T.

Para determinar el efecto del AN sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales aplicamos los prepulsos de voltaje en un rango de -110 a -40 mV con incrementos de +5 mV, a un pulso de prueba de -20 mV partiendo de un HP de -90 mV en condiciones Control (Fig. 2A), y en presencia de 100 μM de AN (Fig. 2B). En condiciones Control, graficamos la conductancia normalizada al valor máximo de \mathbf{G} (\mathbf{g}_{max}) contra el valor de los pre pulsos (Fig. 2C), la activación de la corriente de Ca^{2+} tipo T ocurrió en el rango de -60 a -20 mV con un V_{50} de -43 mV (Fig. 2C, círculos negros, línea continua) y de -42 mV en presencia de AN (Fig. 2C, círculos blancos línea continua) (Tabla I). Estos resultados nos indicaron que la dependencia de voltaje de la activación de los canales de Ca^{2+} tipo T no cambió con AN. Para caracterizar el efecto del AN sobre la inactivación de los canales de Ca^{2+} tipo T en estado estacionario construimos la curva de inactivación tanto en condiciones control como en presencia de 100 μM de AN (Fig. 2C). En condiciones control la inactivación de los canales ocurrió en un rango de -80 a -50 mV, con un $V_{50} = -63 \pm 0.3$ mV (Fig. 2C símbolos negros, línea punteada) y de -64 ± 0.5 mV en presencia de 100 μM de AN (Fig. 2C símbolos blancos, línea punteada). Debido a que ambos parámetros no cambiaron significativamente por el AN estos resultados nos sugieren que la unión del AN al canal no cambia su sensibilidad al voltaje. Sin embargo, la reducción de la corriente ocasionada por el AN

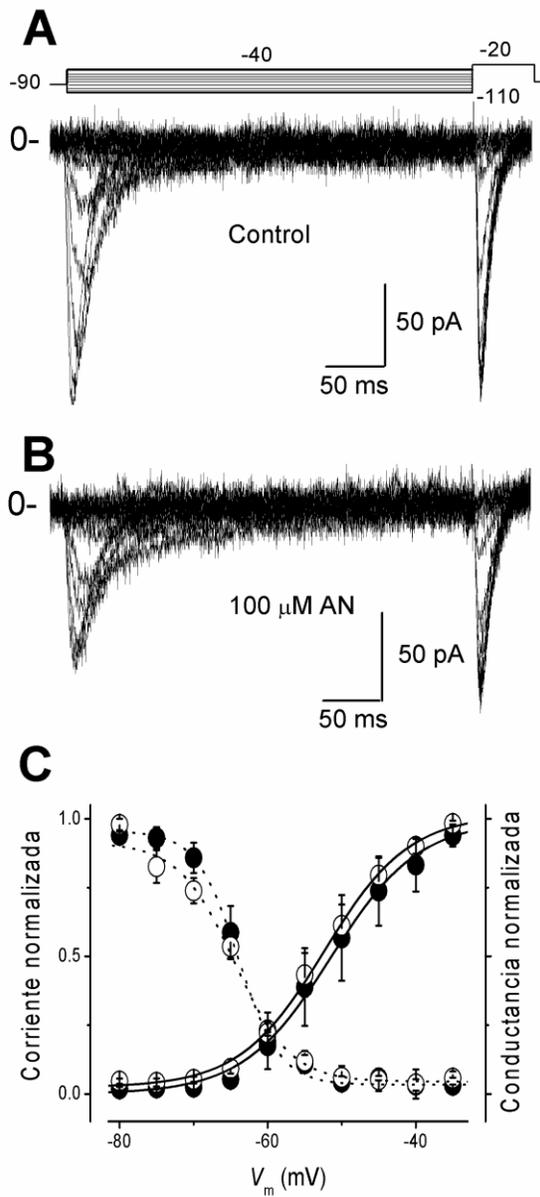


Figura 2. El AN no afecta la activación ni la inactivación en el estado estacionario de las corrientes de Ca^{2+} tipo T. A) Registro original obtenido con el protocolo de pulsos de voltaje dibujado en la parte superior en la condición control. En B se observa la reducción de la corriente en presencia de $100 \mu\text{M}$ de AN. C) La curva de activación se construyó con los valores de conductancia en función del potencial de los prepulsos, los círculos negros para el control y los blancos para el AN. Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación de Boltzmann a los datos. La inactivación en estado estacionario se midió aplicando pulsos de -20 mV al final de los prepulsos (-110 y -40 mV) para recuperar la corriente. Los círculos negros representan el control y los blancos el AN. Las líneas punteadas representan el ajuste de la ecuación de Boltzmann a los datos. Los valores de V_{50} y k se resumen en la Tabla 1. Las barras representan el SEM ($n=9$).

podría deberse a que esta droga interrumpe el libre movimiento de las subunidades que participan en la transición de los canales entre los distintos estados.

6.3 El ácido niflúmico aumenta la tau de activación y la tau de inactivación de las corrientes de Ca^{2+} tipo T.

La activación y la inactivación son eventos acoplados en los canales de Ca^{2+} tipo T. Estos canales se mantienen abiertos por un momento breve (<20 ms) y entonces se inactivan en pocos milisegundos (<50 ms). Tanto la activación como la inactivación dependen del voltaje y son más rápidas a potenciales despolarizantes. Esto genera un patrón de “entre-cruzamiento” de las corrientes (cris-cross) característico de este tipo de canales iónicos. El mecanismo de activación de los canales de Ca^{2+} tipo T es el resultado del movimiento de la **S4** de cada uno de los dominios que conforman al canal, que lo conducen a un estado Cerrado (**C₄**) no conductor pero con disponibilidad de pasar al estado abierto (**A**; conductor) (ver esquema 1 en la discusión) (Catterall 2000; Pérez-Reyes et al., 2003). La modificación de la tau de activación de los canales de Ca^{2+} tipo T por AN sería un indicativo de que la interacción de esta droga con el canal afecta el mecanismo de apertura. Para determinar el efecto del AN sobre la cinética de activación e inactivación de los canales de Ca^{2+} , calculamos la tau de activación (τ_{act}) y la tau de inactivación (τ_{inact}) mediante el ajuste de una exponencial simple para cada constante a los trazos de corriente en condiciones control (Fig. 3A), y en presencia de 100 μM de AN (Fig. 3B). En condiciones control la τ_{act} se aceleró monótonicamente con el voltaje en el rango de -50 a +20 mV haciéndose prácticamente

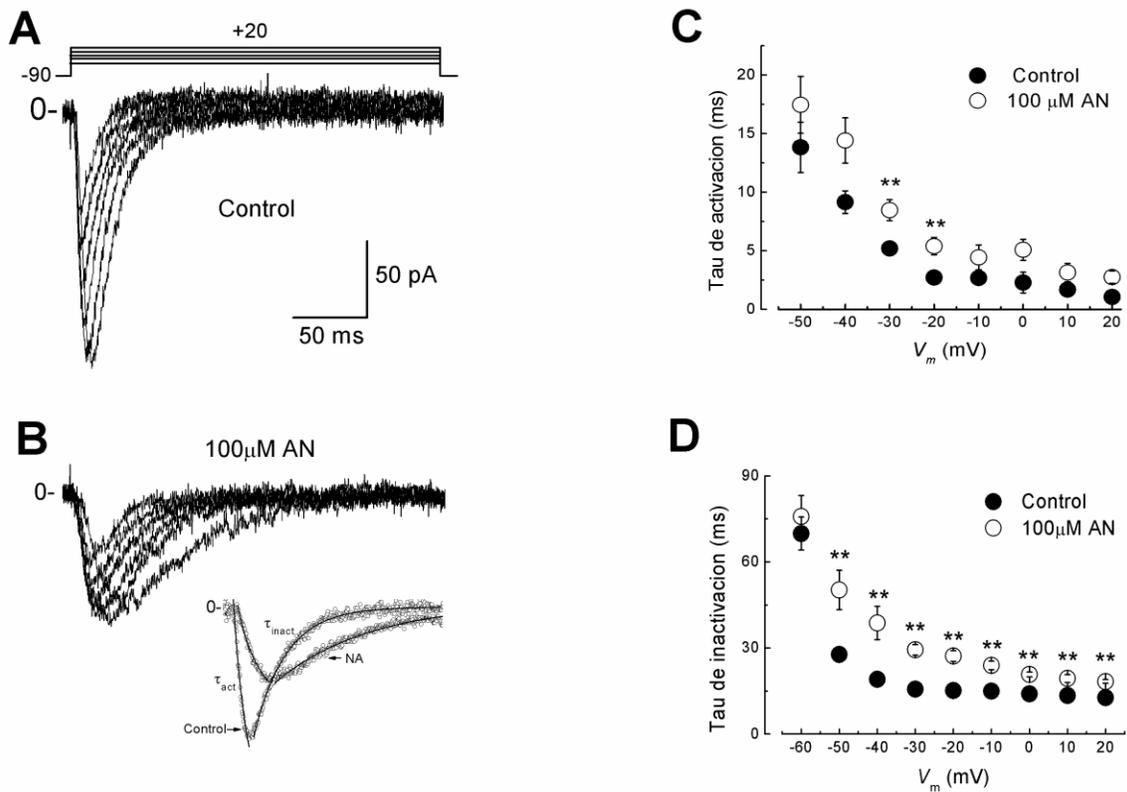


Figura 3. El AN aumenta la cinética de activación e inactivación de las corrientes tipo T. A) Corrientes de Ca^{+2} registradas en condiciones control con la aplicación del protocolo de pulsos mostrado en la figura. B) Corrientes registradas como en A, pero en presencia de 100 μ M AN. Tanto la tau de activación (τ_{act}) como la tau de inactivación (τ_{inact}) se obtuvieron mediante el ajuste de una exponencial simple a los trazos de corriente, como se muestra en la parte inferior de la figura. C) Gráfica de los valores promedio de τ_{act} contra el comando de voltaje ($n=6$). La condición control está representada por los círculos negros, y los blancos representan AN. D) Gráfica de los valores promedio de τ_{inact} en condiciones control (círculos negros) y AN (círculos blancos) contra el potencial de prueba ($n=6$). AN indujo un enlentecimiento sobre la cinética de inactivación a todos los potenciales más positivos que -50 mV. Las barras representan SEM.

independiente del voltaje a partir de -20 mV (Fig. 3C símbolos negros). El AN aumentó la τ_{act} en el rango entre -30 y -20 mV (Fig. 3B y C símbolos blancos), lo que sugiere que el AN retrasa la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo T, siendo más evidente este efecto

a potenciales donde la mayoría de los canales están abiertos (-30 y -20 mV). El modelo actual del mecanismo de inactivación de los canales de Ca^{2+} tipo postula que los canales pueden pasar de cada uno de los estados al estado *I* de manera reversible (ver esquema 1) (Pérez-Reyes et al., 2003). El AN aumentó la τ_{inact} en el rango de -50 a -20 mV con respecto a la condición control (Fig. 3D). Estos resultados en conjunto nos indican que el AN interfiere con la transición de los canales entre los distintos estados, posiblemente mediante la interacción de esta droga con las subunidades que conforman al canal y/o con sitios que se exponen durante el movimiento de las subunidades (ver discusión).

6.4 El ácido niflúmico no cambió la cinética de desactivación de la corriente de Ca^{2+} tipo T.

El AN aumentó tanto la cinética de apertura como la de inactivación de los canales tipo T, sin cambiar su sensibilidad al voltaje. Los canales pueden pasar del estado *A* al estado *C* directamente sin pasar por el estado *I* en respuesta a cambios súbitos de voltaje, lo que se conoce como desactivación o cierre de los canales (Esquema 1). La desactivación implica el regreso de las subunidades del canal a un estado no conductor, esta transición es lenta y se traduce en la generación de las corrientes de cola que se presentan al final del pulso despolarizante (Fig. 4). Para determinar el efecto del AN sobre el cierre de los canales de Ca^{2+} tipo-T medimos la tasa de decaimiento de las corrientes de cola generadas por diferentes potenciales repolarizantes (-90 a -120 mV), partiendo de un pulso de prueba de -20 mV (Fig. 4). En condiciones control la constante de tiempo de desactivación (τ_{deact}) mostró una

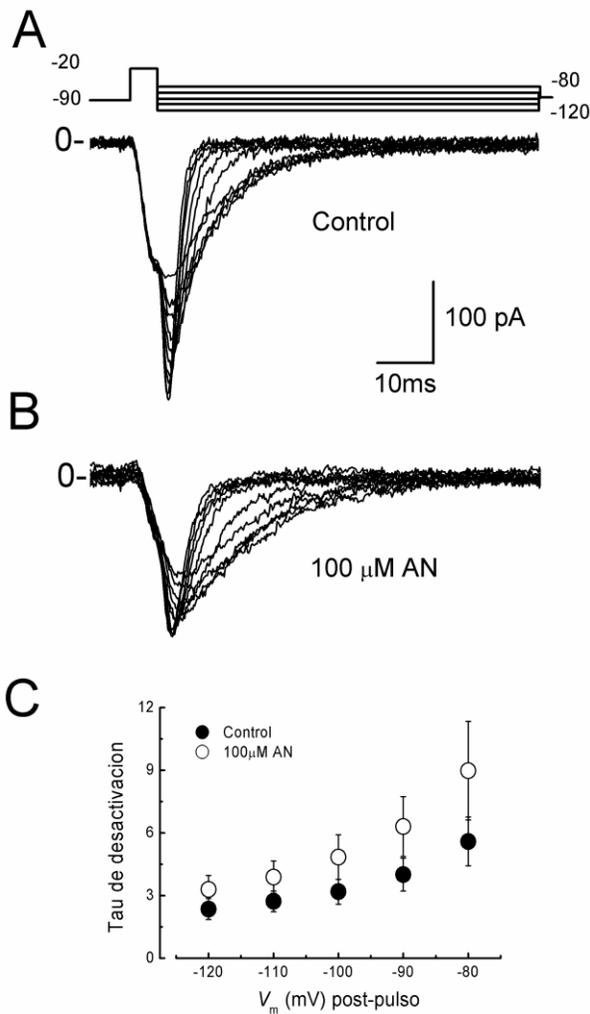


Figura 4. El AN no altera la cinética de desactivación de la corriente tipo T. A) trazo original de corrientes Control de Ca^{2+} , donde se generaron corrientes de cola por la aplicación del protocolo de pulsos dibujado arriba. B) Corrientes registradas en presencia de AN. En C) se grafican los datos obtenidos en A y B donde se observa que no hay diferencia significativa entre ambas condiciones. Las barras representan la SEM (n= 6).

moderada dependencia al voltaje con valores de 2.4 ± 0.5 ms a -120 y de 5.6 ± 1.1 ms a -80 mV (Fig. 4A). Los valores de la τ_{deact} obtenidos en presencia de 100 μM de AN fueron similares a los obtenidos en condiciones control (3.3 ± 0.7 ms a -120 y 8.9 ± 2.3 a -80 mV; n= 9) (Fig. 4B), y no hubo diferencia significativa entre ambas condiciones

(Fig. 4C). Estos resultados nos indicaron que el cierre de los canales ocurre más rápido a potenciales hiperpolarizantes (-120 mV) y que el AN no interfiere con este mecanismo en los canales de Ca^{2+} tipo T en nuestro modelo de estudio.

6.5 El bloqueo por el ácido niflúmico ocurre en todos los estados de los canales de Ca^{2+} tipo T.

Ciertos compuestos como por el mibefradil requiere que los canales de Ca^{2+} tipo T se abran para poder bloquearlos, mientras que la pimozida bloquea preferencialmente a los canales en estado inactivado (Arnoult et al., 1998) Es probable que el AN tenga un efecto más potente en alguno de los estados de los canales tipo T. Para probar esto diseñamos protocolos específicos para estudiar la interacción de la droga con los tres estados principales del canal (**C**, **A** e **I**). En primer lugar, para estudiar el estado cerrado removimos la inactivación de los canales con un pulso de -90 mV seguido por un pulso despolarizante (-20 mV) de 300 ms de duración para abrir a los canales, al final de este pulso repolarizamos y mantuvimos el potencial a -90 mV durante 120 s. Con este protocolo registramos una corriente Control de $\sim -100 \pm 15$ pA (Fig. 5A, primer trazo). El AN se agregó al inicio del pulso repolarizante y se incubó durante 120 s, al término de este tiempo aplicamos un segundo pulso de -20 mV para volver a abrir los canales y registrar el efecto del AN en el estado cerrado. En estas condiciones registramos una corriente de $\sim -75 \pm 10$ pA (Fig. 5A, segundo trazo). Esta disminución no fue producto del lavado de la corriente (Recuadro en la figura 5C). La cuantificación de estos datos nos indicó que el AN tuvo un bloqueo máximo en el estado cerrado de los canales del

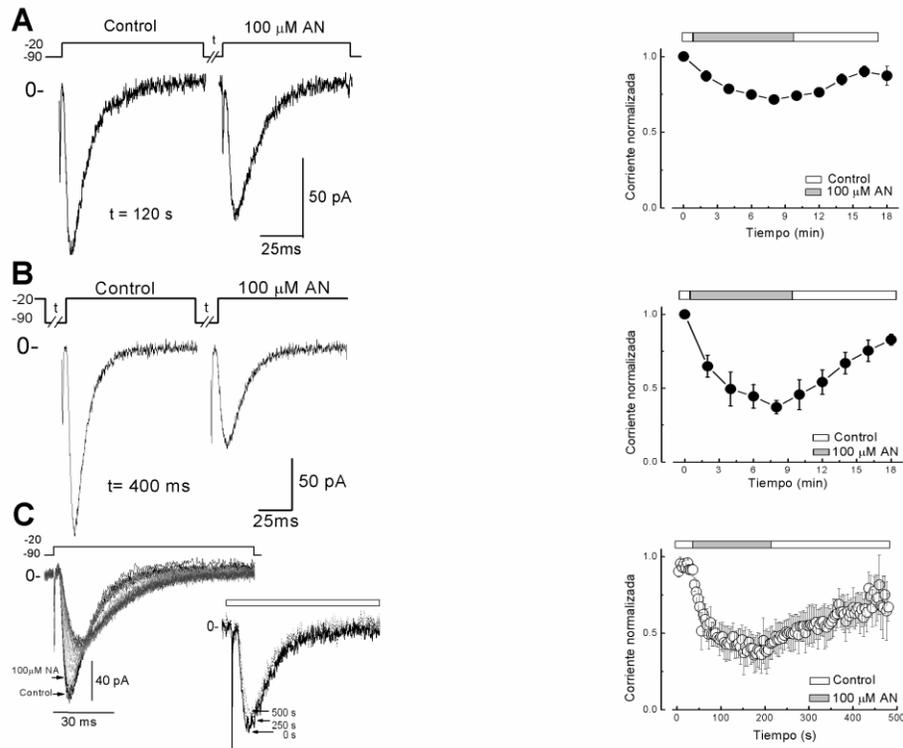


Figura 5. El bloqueo de los canales tipo T por el AN es dependiente de estado. A) *panel izquierdo*, trazos de corriente registrados con el protocolo dibujado arriba para mantener los canales en el estado cerrado. Un pulso de prueba de -20 mV se aplicó con un $t = 120$ s de un HP= -90 mV. *Panel derecho*, gráfica de la corriente normalizada contra el tiempo; las barras blancas y grises representan el tiempo de exposición a la solución Control y al AN, respectivamente. Con éste protocolo ~25% de la corriente entrante se redujo por el AN. B) Efecto del AN sobre el estado inactivado de los canales. *Panel izquierdo*, corriente registrada en respuesta a una despolarización a -20 mV de un pulso hiperpolarizante de -90 mV, de 400 ms de duración. Las células se mantuvieron a -20 mV para mantener a los canales en estado inactivado. *Panel derecho*, corriente normalizada Vs tiempo de exposición al AN. En esta condición observamos una reducción mayor al 50% en presencia del fármaco. C) *Panel izquierdo*, bloqueo de la corriente tipo T por el AN en estado abierto. Las células se fijaron a -90 mV durante todo el experimento, con una despolarización a -20 mV cada 5 s. *Recuadro*, células continuamente estimuladas con el protocolo descrito previamente durante 500 s sin droga, las corrientes permanecieron sin cambio durante todo el experimento. *Panel derecho*, la corriente normalizada muestra un decremento en la amplitud mayor al 50% en presencia del AN. Las barras de error representan SEM, ($n= 6$). En las tres condiciones probadas, se recuperó ~85 % de la corriente original cuando la droga se lavó con solución Control.

~25 % después de 8 minutos de incubación. El bloqueo fue reversible cuando retiramos la droga (Fig. 5A, panel derecho, min 8-18).

En segundo lugar para registrar el efecto del AN sobre el estado inactivado mantuvimos a los canales a -20 mV después de una ronda de apertura en la que registramos la corriente Control de -125 ± 15 pA (Fig. 5B, primer trazo). Aplicamos la droga al final del pulso de prueba e incubamos a los canales inactivados con el AN. Aplicamos un pulso hiperpolarizante de -90 mV de 400 ms seguido de un segundo pulso de -20 mV y registramos la corriente cada 120 s. Después de 8 min de incubación con AN registramos una corriente de -65 ± 10 pA (Fig. 5B, segundo trazo). La cuantificación de estos datos nos indicó que el AN bloqueó el ~50 % de la corriente cuando los canales se mantuvieron la mayor parte del tiempo en el estado inactivado (Fig. 5B, panel derecho). La disminución de la corriente entrante no fue producto del lavado de la corriente (Recuadro en la figura 5C). El bloqueo de los canales en estado inactivado por el AN fue parcialmente reversible, ya que después de lavar la droga recuperamos un máximo de ~85 % de la corriente control (Fig. 5B, panel derecho, 8-18 min).

En tercer lugar, debido a que la activación está acoplada a la inactivación de los canales de Ca^{2+} tipo T resulta complicado mantener a los canales en el estado abierto. Para registrar el efecto del AN sobre este estado aplicamos pulsos despolarizantes de -20 mV para abrir los canales (1 pulso cada 5 s) partiendo de un HP= -90 mV (Fig. 5C, panel izquierdo), tomando como control la corriente generada por los primeros 10-15 pulsos. Sin interrumpir el registro de corriente iniciamos la perfusión de 100 μM de AN a una velocidad de 2 ml/min para garantizar que los canales pasaran continuamente por

el estado abierto. En estas condiciones observamos que la corriente entrante disminuyó gradualmente con cada pulso despolarizante aplicado (~60 pulsos de -20 mV) en presencia del AN hasta un máximo de reducción del ~50 % de la corriente después de 200 s (Fig. 5C, trazos grises). El efecto del AN en el estado abierto fue parcialmente reversible (Fig. 5C, panel derecho, 200-500 s). Para comprobar que nuestro protocolo de pulsos y la frecuencia de estimulación utilizada no generasen la acumulación de canales en estado inactivado, o el lavado de la corriente con el paso del tiempo aplicamos el mismo protocolo de pulsos despolarizantes con perfusión continua de la solución control durante más de 500 s. En estas condiciones observamos una reducción menor al 5% con respecto a la corriente control (Fig. 5C, panel inferior).

En conjunto, estos resultados nos sugieren que el bloqueo por el AN ocurre en los tres estados de los canales tipo T siendo los estados abierto e inactivado más propensos al bloqueo que el estado cerrado. Debido a que la activación y la inactivación están acopladas en este tipo de canales no podemos determinar con certeza la proporción de canales que se bloquean en cada uno de los estados, por lo que nuestros datos representan una mezcla del efecto de la droga en los tres estados del canal.

6.6 El ácido niflúmico aumenta la tau de recuperación de la inactivación de la corriente de Ca²⁺ tipo-T.

Después de un ciclo de apertura e inactivación los canales de Ca²⁺ tipo T regresan a un estado de reposo (*R*). Durante este tiempo no pueden volver a abrirse en respuesta a pulsos despolarizantes. Este parámetro biofísico se conoce como tiempo de

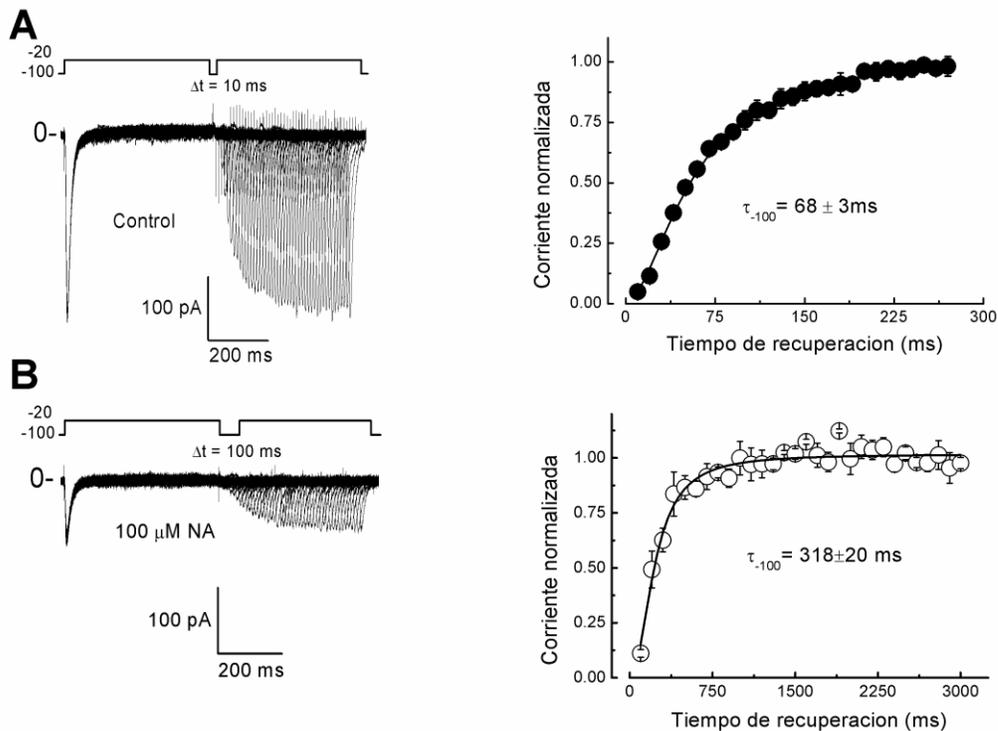


Figura 6. El AN retrasa el tiempo de recuperación de la inactivación de los canales tipo T. Trazos de corriente registrados con un protocolo de doble pulso, un pulso de -20 mV fue aplicado a partir de un HP= -100 mV, e interpulsos del mismo valor con un $\Delta t= 10$ ms para la condición control (A), y 100 ms para AN (B). Curso temporal de la recuperación de la inactivación (*paneles de la derecha*) ajustados con una exponencial simple con una constante de tiempo (τ_h) de 67.6 ± 3 ms para el Control (A) y 318 ± 20 ms en presencia de $100 \mu\text{M}$ de AN (B). Las barras de error representan SEM ($n= 9$).

recuperación de la inactivación (τ_h) y es dependiente del voltaje, siendo más rápido a potenciales hiperpolarizantes (-110 mV). Cada tipo de CCDV y en particular cada isoforma de los Ca_v3 tienen un τ_h particular. Por lo que determinar este parámetro nos permitirá saber cuáles isoformas generan la corriente global de Ca^{2+} tipo T en las células espermatozógenas. Para determinar el τ_h de los canales de Ca^{2+} tipo T aplicamos un protocolo de doble pulso despolarizante de -20 mV partiendo de un HP= -

100 mV y con un inter-pulso repolarizante del mismo valor que el potencial de reposo con un aumento de 10 ms ($\Delta t = 10$ ms) (Fig. 6A). El primer pulso de prueba de -20 mV generó una corriente de -250 ± 25 pA que se inactivó rápidamente (< 50 ms). El segundo pulso de prueba aplicado 10 ms después de la hiperpolarización a -100 mV casi no generó corriente entrante y pero está fue aumentando conforme el tiempo del inter-pulso fue más largo ($t = 10, 20, 30 \dots n$ ms), hasta que se recuperó el 100% de la corriente original (Fig. 6A, panel izquierdo). Graficamos la corriente normalizada contra el tiempo de recuperación (ms) y le ajustamos una exponencial simple de donde obtuvimos un valor de $\tau_h = 68 \pm 3$ ms, (Fig. 6A panel derecho y Tabla I) ($n = 9$). Aplicando el mismo protocolo de doble pulso despolarizante pero ahora en presencia de 100 μ M de AN observamos la reducción de más del 50% de la corriente entrante con respecto al control (Fig. 6B panel izquierdo Vs 6A). En presencia de AN y con un $\Delta t = 100$ ms obtuvimos una $\tau_h = 318 \pm 20$ ms ($n = 9$) (Fig. 6B, y Tabla I). Este valor fue casi 5 veces mayor a la τ_h obtenida en condiciones control. Estos resultados nos sugieren que en presencia de AN a los canales les toma más tiempo regresar al estado *R* lo que indica que esta droga posiblemente estabiliza el estado *I* (ver discusión).

6.7 El bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo T por el ácido niflúmico es independiente de la frecuencia de estimulación.

Algunos fármacos como por ejemplo los analgésicos locales requieren que los canales iónicos se estimulen continuamente para que estos puedan surtir su efecto. Para determinar si el bloqueo de la corriente de Ca^{2+} tipo T por el AN es dependiente de la frecuencia de estimulación (uso del canal), aplicamos un protocolo de pulsos a tres

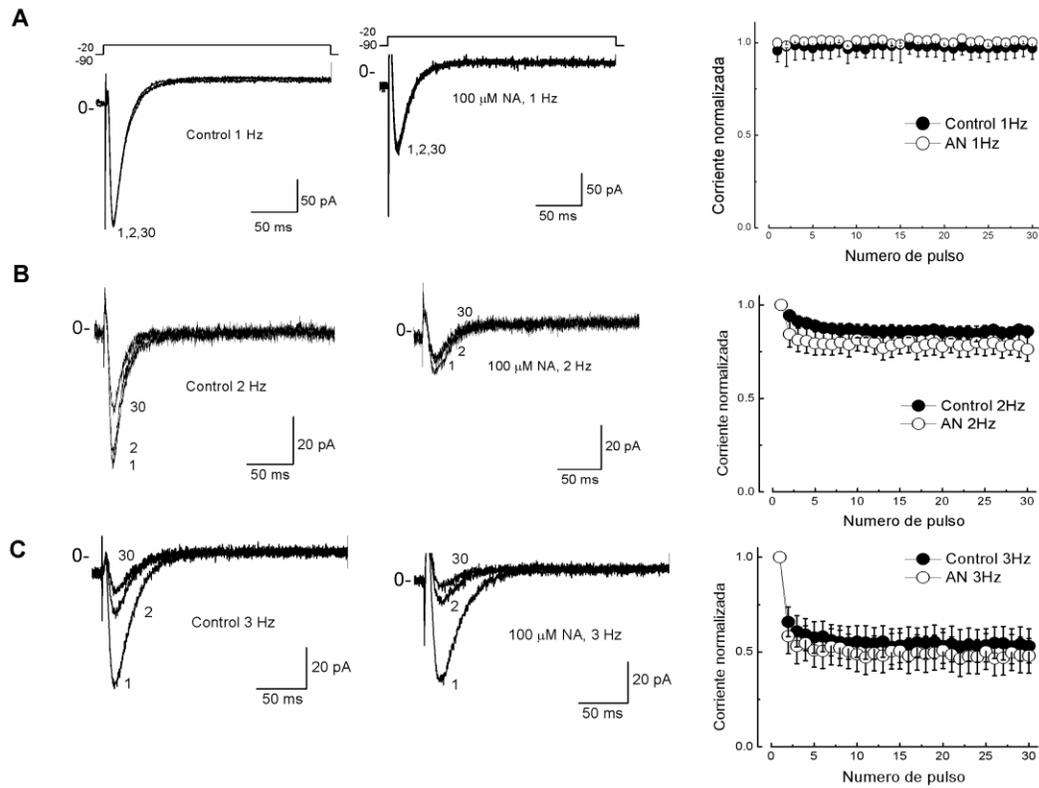


Figure 6

Figura 7. El bloqueo de los canales tipo T por el AN no es dependiente del uso del canal. Las células se estimularon a -20 mV de un HP de -90 mV con una frecuencia de 1 (A), 2 (B), y 3 Hz (C). Bajo condiciones control (*paneles de la derecha*) y en presencia de 100 μM de AN (*paneles medios*). Solo los pulsos 1, 2 y 30 son mostrados por claridad. *Paneles de la derecha*, gráficas de corriente normalizada Vs tiempo, para control (círculos negros) y AN (círculos blancos) en las tres frecuencias probadas. Se observó una reducción de ~35 % en la corriente debida a la acumulación de la inactivación al menos a 2 y 3 Hz. Las barras de error representan SEM ($n=6$).

frecuencias distintas (1, 2 y 3 Hz). Las células se mantuvieron a -90 mV y aplicamos 30 pulsos de prueba sucesivos de -20 mV (Fig. 7). En condiciones control registramos una corriente entrante de -150 ± 23 pA en todos los pulsos aplicados a 1 Hz de frecuencia (Fig. 7A, panel izquierdo. Pulsos 1, 2 y 30). En contraste la corriente entrante disminuyó a la mitad con 100 μM de AN pero esta disminución fue la misma en todos los pulsos

aplicados (Fig. 7A panel medio. Pulsos 1,2 y 30). Las corrientes normalizadas al valor máximo en la condición control y con el AN indicaron que a 1 Hz de estimulación no hubo diferencia significativa entre ambas condiciones (Fig. 7A panel derecho).

Estimulando a los canales en condiciones control con una frecuencia de 2 Hz registramos una corriente de $\sim -80 \pm 15$ pA en promedio que disminuyó gradualmente entre cada pulso de voltaje aplicado (Fig. 7B, panel izquierdo). Con 100 μ M de AN la corriente entrante disminuyó más del 60% en todos los pulsos aplicados, con respecto al control (Fig. 7B, panel medio). La normalización de las corrientes con el AN con respecto al valor máximo de las registradas en condiciones control nos indicaron que no hubo diferencia significativa entre ambas condiciones con una frecuencia de estimulación de 2 Hz de los canales (Fig. 7B panel derecho).

La estimulación de los canales tipo T con una frecuencia de 3 Hz generó una corriente de -100 ± 15 pA con el primer pulso despolarizante que disminuyó a -30 ± 10 pA con el segundo pulso en condiciones control (Fig. 7C, panel izquierdo). En presencia de 100 μ M de AN la corriente fue disminuyendo conforme se aplicaron los pulsos siguientes (Fig. 7C, panel medio). La grafica de las corrientes normalizadas al valor máximo en ambas condiciones indicó que no hubo diferencia significativa (Fig. 7C, panel derecho). Estos resultados en conjunto nos sugieren que el bloqueo de la corriente de Ca^{2+} tipo T por AN no depende de la frecuencia de estimulación de los canales.

Nuestros resultados indican que el AN inhibe a los canales de Ca^{2+} tipo T que se expresan de forma nativa en las células espermatozógenas de ratón. Esta droga

bloquea también a las tres isoformas de los canales tipo T recombinantes (Balderas et al., 2011) (ver discusión).

El Cbx es un antiinflamatorio de uso común en humanos que bloquea canales de K^+ y de Ca^{2+} tipo L. Debido a estos antecedentes decidimos probar y caracterizar el efecto del Cbx en las corrientes de Ca^{2+} tipo T en células espermatoogénicas de ratón para establecer si uno de los efectos colaterales del uso de esta droga podría estar relacionado con los procesos de fertilidad.

6.8 El celecoxibe inhibe la corriente de Ca^{2+} tipo T en una forma dependiente de la dosis.

Para determinar el efecto de Cbx sobre las corrientes de Ca^{2+} tipo T en células espermatoogénicas de ratón aplicamos 50 μ M de este fármaco a la corriente registrada en condiciones Control con pulsos despolarizantes de prueba de -80 a +70 mV a partir de un HP= -90 mV (Fig. 8A). El efecto sobre la corriente tipo T fue dramático ya que disminuyó en más del 60 % con esta concentración (Fig. 8B). Posteriormente construimos una curva dosis-respuesta en donde graficamos la fracción de la corriente bloqueada en función de la concentración de Cbx (Fig. 8C). La ecuación de Hill se ajustó a nuestros datos y calculamos una $IC_{50} = 27 \pm 3 \mu$ M. De aquí en adelante la caracterización del efecto inhibitorio del Cbx se realizó utilizando una concentración de 50 μ M. En la curva *I-V* podemos observar que tanto el umbral de activación (~-60 mV) como la dependencia de voltaje de los canales no cambiaron con el Cbx (Fig. 8D) (n= 9). Estos resultados nos sugieren que el efecto inhibitorio de la corriente de Ca^{2+} no afecta al **S4** del canal. El efecto del bloqueo fue parcialmente reversible ya que solo

recuperamos ~25 % de la corriente Control después de lavar la droga por más de 30 minutos con la solución control.

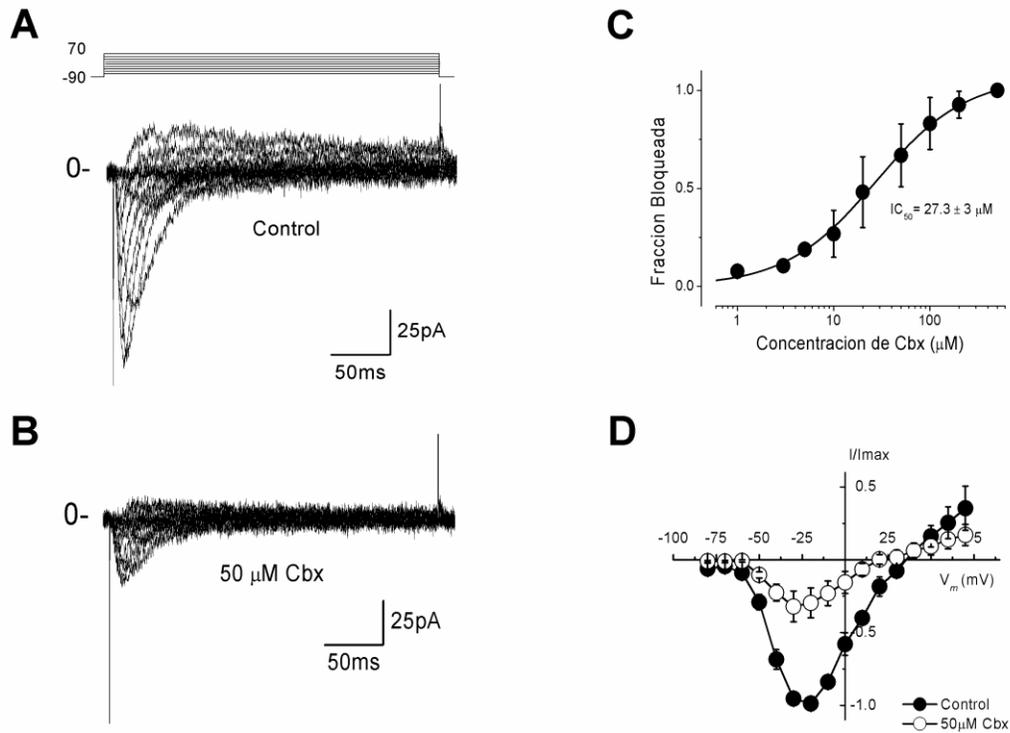


Figura 8. El Cbx bloquea la corriente tipo T en una forma dependiente de la dosis. A) corrientes de Ca^{2+} registradas con el protocolo de pulsos descrito arriba en condiciones Control. B) efecto de 50 μM de Cbx sobre las corrientes de Ca^{2+} tipo T registradas en A. C) gráfica de la fracción bloqueada contra el logaritmo de la concentración de Cbx, de donde derivamos una IC_{50} de $27.3 \pm 3 \mu\text{M}$ con la ecuación de Hill. D) Curva I - V de los datos obtenidos en A y B, para la condición Control (círculos negros) y en presencia de 50 μM de Cbx (círculos blancos). La dependencia de voltaje y el E_{rev} se mantuvieron sin cambio en presencia de Cbx. Las barras representan SEM (n= 6).

6.9 El celecoxibe no afecta dependencia de voltaje de la activación ni la curva de inactivación en el estado estable de los canales de Ca²⁺ tipo T.

Para determinar si el Cbx afecta la dependencia al voltaje de la activación de los canales de Ca²⁺ tipo T aplicamos prepulsos de -80 a -20 mV en pasos de +5 mV a un pulso de prueba de -20 mV, partiendo de un HP= -90 mV, en condiciones Control (Fig. 9A), y en presencia de 50 μM de Cbx (Fig. 9B). A partir de estos datos obtuvimos la conductancia (G) al pico a -20 mV y la graficamos en función del voltaje (Fig. 9C). Ajustamos la ecuación de Boltzmann a la curva de activación y calculamos un voltaje medio (V_{50}) de -43 mV (Fig. 9C símbolos negros), mismo que se mantuvo sin cambio en presencia de 50 μM de Cbx (Fig. 9C, símbolos blancos, Tabla I). Estos resultados nos indicaron que esta droga no afecta la dependencia de voltaje de la activación de los canales de Ca²⁺ tipo T, lo que apoya nuestra hipótesis de que la unión

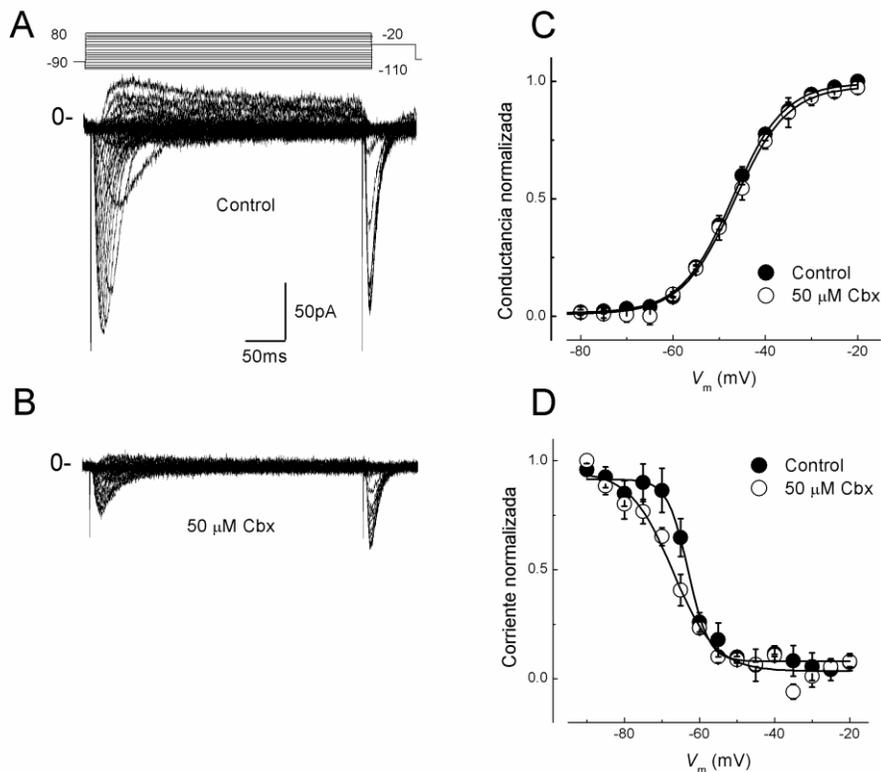


Figura 9. El Cbx no altera la dependencia de voltaje de la activación ni la inactivación en estado estacionario. A) Trazos originales de la corriente de Ca^{2+} registrada en condiciones Control con el protocolo de doble pulso dibujado arriba. Un pulso de -20 mV se aplicó al final de los pulsos de prueba para determinar cuanta corriente se recuperaba. B) Efecto de $50 \mu\text{M}$ de Cbx sobre las corrientes registradas en A. En C) Curva de activación de la corriente tipo T donde graficamos la conductancia (G) normalizada en función del pulso de prueba (V_m), para la condición Control (círculos negros) y Cbx (círculos blancos). D) Curva de inactivación, donde graficamos la corriente recuperada normalizada en función de los potenciales de prueba aplicados, para la condición Control (círculos negros) y Cbx (círculos blancos). Las barras de error representan SEM ($n=6$).

del fármaco no interfiere directamente con el **S4** de los canales.

La curva de inactivación en el estado estable la construimos normalizando la corriente entrante generada por el pulso de prueba de -20 mV en función de los prepulsos aplicados tanto en condiciones Control (Fig. 9A), y en presencia de $50 \mu\text{M}$ de Cbx (Fig. 9B). La inactivación de los canales ocurrió en un rango de -80 a -50 mV y obtuvimos

una V_{50} de -63 ± 0.4 mV en condiciones Control (Fig. 9D símbolos negros), y un V_{50} = -66 ± 0.7 mV con Cbx (Fig. 9D símbolos blancos). En esta grafica se observó una ligera variación entre -65 mV y -70 mV de la curva de inactivación que no fue significativamente diferente con respecto al control. El valor de la K_i aumentó casi 2 veces en presencia de Cbx con respecto al Control (Tabla I). Estos datos en conjunto nos indicaron que el Cbx no afectó la dependencia de voltaje de la activación ni de la inactivación en el estado estacionario (Fig. 9D).

6.10 El celecoxibe no cambia la tau de activación ni la tau de inactivación de la corriente de Ca^{2+} tipo T.

El Cbx no afectó la sensibilidad al voltaje de los canales tipo T pero redujo la magnitud de la corriente entrante. Estos resultados sugieren que la droga afecta posiblemente las transiciones entre los diferentes estados de estos canales. Para determinar la tau de activación y de inactivación de los canales ajustamos exponenciales simples a los trazos de corriente, una para la fase de activación y otra para la de inactivación (Fig. 10). En condiciones control la τ_{act} se aceleró monótonicamente con el voltaje dentro del rango de -60 a -20 mV, y se mantuvo sin cambio a potenciales mas despolarizantes que -20 mV (Fig. 10A). Con estos datos calculamos una τ_{act} = 3.4 ± 1.1 ms a -20 mV (Tabla I). Este valor no cambió en presencia de 50μ M de Cbx (Fig. 10 y Tabla I). Por otro lado el ajuste de la exponencial a la fase de inactivación nos indicó que la τ_{inact} se aceleró de manera monótonica en el rango de -60 a -40 mV, haciéndose prácticamente independiente de voltaje a potenciales mas despolarizantes que -40 mV (Fig. 10B).

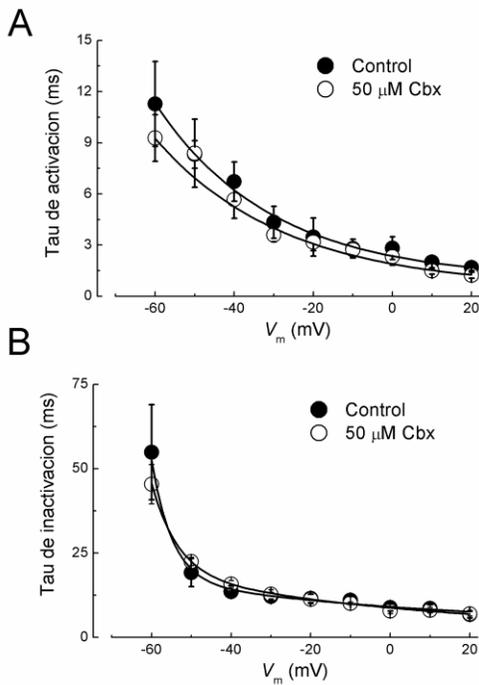


Figura 10. La cinética de activación e inactivación no cambian en presencia de Cbx. En A) graficamos los valores promedio de la tau de activación de la corriente tipo T contra el potencial de membrana (V_m), obtenidos mediante el ajuste de una exponencial simple a los trazos originales de la figura 9. En B) graficamos la tau de inactivación obtenida por el ajuste de una exponencial simple a la fase de inactivación de las corrientes. En ambos casos los círculos negros corresponden a la condición Control, y los círculos blancos a 50 μ M de Cbx. Las barras representan SEM ($n=6$).

La τ_{inact} a -20 mV fue de 11.5 ± 1.3 ms y no cambió en presencia de Cbx ($\tau_{inact} = 11. \pm 1.3$ ms, Tabla I). Estos resultados nos sugieren que este fármaco no afecta la transición de los canales del estado **C** al **A** y del **A** al **I**. Estos efectos son notablemente diferentes a los observados con el AN que aumentó tanto la τ_{act} como la τ_{inact} (Fig. 3).

6.11 El celecoxibe no interfiere con el mecanismo de cierre de los canales de Ca²⁺ tipo T.

Para determinar si el Cbx era capaz de interferir con el mecanismo de cierre de los canales de Ca²⁺ tipo T calculamos la τ_{desact} en condiciones control y en presencia 50 μM de la droga. Para esto aplicamos un pulso de prueba de un pulso de -20 mV partiendo de un HP= -90 mV. Cuando la corriente alcanzó su máxima amplitud aplicamos pulsos repolarizantes de -110 a -50 mV en pasos de 10 mV para generar corrientes de cola (Fig. 11). A cada una de las corrientes de cola le ajustamos una exponencial simple y graficamos los valores en función del valor de repolarización aplicado (Fig. 11). La cinética de las corrientes de cola fue más lenta a potenciales más despolarizantes que -80 mV en condiciones Control (Fig. 11A). En presencia de 50 μM de Cbx se observó una reducción mayor al 60 % en la magnitud de las corrientes tanto la generada por el pulso de prueba (-20 mV), como las corrientes de cola (Fig. 11B). En ambas condiciones la τ_{desact} permaneció sin cambio (Fig. 11C, símbolos blancos). Estos resultados en conjunto nos sugieren que la reducción de la corriente entrante ocasionada por el Cbx no es producto de la interacción de este con el mecanismo de cierre de los canales.

6.12 El bloqueo de la corriente de Ca²⁺ tipo T por el celecoxibe es poco reversible.

El curso temporal del bloqueo de la corriente tipo T por el Cbx reveló esta disminuyó gradualmente en presencia de 50 μM de la droga (Fig. 12A trazos negros Vs grises). Una vez que la corriente residual alcanzó su un estado estacionario lavamos la droga con solución Control. Después de por varios minutos de lavado logramos recuperar

solo el 15 % de la corriente Control (Fig. 12B). Estos resultados sugieren que el Cbx interactúa de manera estable con alguna de las conformaciones de los canales lo que hace más difícil revertir su efecto incluso a tiempos largos de lavado (>30 min).

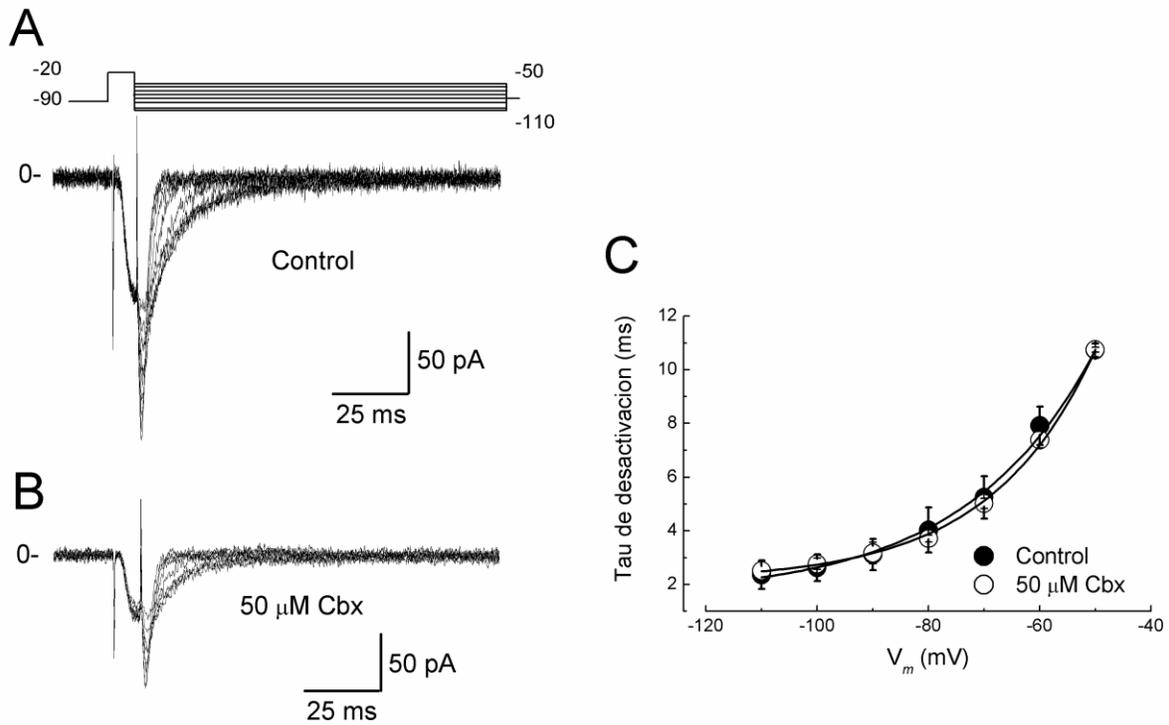


Figura 11. El Cbx no cambia la cinética de desactivación de la corriente tipo T. A) trazo original de corrientes de Ca^{2+} obtenidas con el protocolo de doble pulso dibujado arriba, en condiciones control. Las corrientes de cola representan la cinética de cierre de los canales. B) Corrientes registradas igual que en A, pero en presencia de Cbx. En C) se graficaron las taus de desactivación obtenidas en A y B en función del V_m . Los círculos negros representan el Control y los blancos la presencia de 50 μ M de Cbx. Las barras representan la SEM (n= 6).

6.13 El celecoxibe aumenta la tau recuperación de la inactivación de los canales de Ca²⁺ tipo T.

Para determinar si el Cbx afectaba la recuperación de los canales del estado inactivado aplicamos el mismo protocolo de doble pulso descrito para el AN en la figura 6A. En este caso partimos de un HP= -110 mV con un interpulso al mismo potencial hiperpolarizante y un $\Delta t = 10$ ms. Ambos pulsos de prueba despolarizantes fueron de -20 mV (Fig. 13B). Las corrientes registradas en condiciones Control (Fig. 13A) se normalizaron al valor máximo de la corriente inicial y le ajustamos una exponencial de primer orden de donde obtuvimos una $\tau_{h-110} = 57 \pm 5$ ms (Fig. 13A panel derecho). En presencia de 50 μ M de Cbx la corriente entrante registrada con el primer pulso de prueba disminuyó ~65 % (Fig. 13B) con respecto a la corriente control (Fig. 13 A) y la τ_{h-110} aumentó casi 8 veces (385 ± 62 ms) (Fig. 13B panel derecho). El movimiento de las subunidades que hacen que los canales regresen al estado **R** depende del voltaje, por lo que a potenciales menos hiperpolarizados que -110 mV el valor de la τ_h es casi del doble (~ 110 ms). El aumento en la τ_{h-110} ocasionado por el Cbx sugiere que este fármaco posiblemente estabiliza el estado **I** de los canales lo que a su vez provoca que el regreso al estado **R** sea más lento.

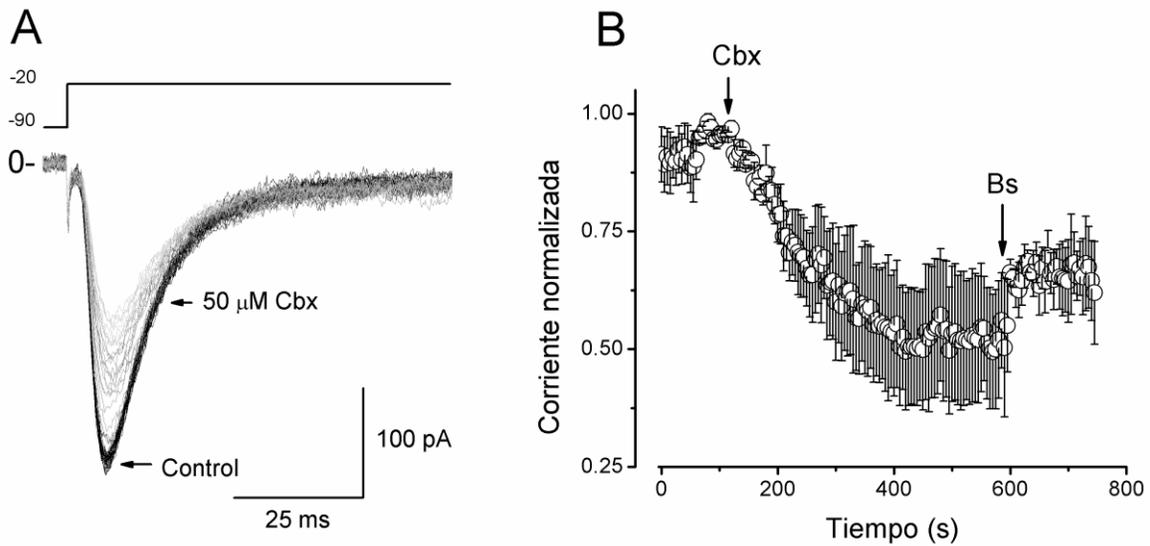


Figura 12. Curso temporal del bloqueo de la corriente T por el Cbx. En A) se presentan los registros originales de la corriente de Ca^{2+} tipo T obtenidos mediante la aplicación de un pulso despolarizante de -20 mV partiendo de un HP de -90 mV. Los trazos negros representan la condición Control, mientras que los grises representan la cinética del bloqueo por Cbx. B) La corriente bloqueada se normalizó con respecto al máximo de la corriente Control y se graficó en función del tiempo que duró el experimento (~800 s). Las flechas indican la aplicación de la droga y la solución de baño (BS) para el lavado. Las barras representan SEM (n= 6).

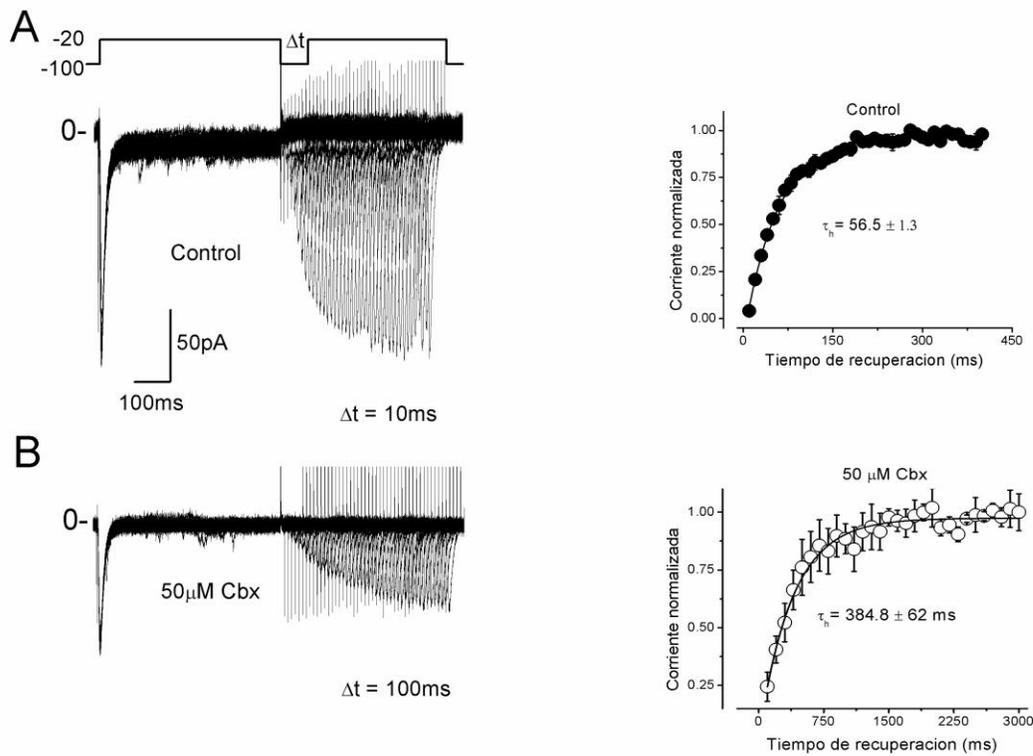


Figura 13. El tiempo de recuperación de la inactivación de la corriente de Ca^{2+} tipo T aumenta en presencia del Cbx. En A) se presentan los trazos de corriente Control registrados con un pulso de -20 mV que fue aplicado a partir de un HP de -100 mV, con interpulsos de -100 mV cada 10 ms (Δt) (panel izquierdo). En el panel derecho se graficó la corriente normalizada en función del tiempo de recuperación de la inactivación. B) Trazos de corriente registrados en presencia del Cbx con el mismo protocolo que en A pero con $\Delta t = 100$ ms (panel izquierdo). En el panel derecho se presentan los datos de la corriente normalizada ajustados con una exponencial simple, que mostraron un retraso significativo del tiempo de recuperación con respecto al Control. Note la escala de tiempo en el eje de las x en B. Las barras representan SEM ($n = 9$).

Tabla I.

Parámetros cinéticos y de voltaje de la corriente de Ca^{2+} tipo T en condiciones control, y en presencia de 100 μM de AN y 50 μM de Cbx.

| Parámetro | Corriente tipo T en células espermatogénicas | | |
|--|---|----------------|----------------|
| | Control | NA | Cbx |
| V_{50} (mV) | -43 ± 0.6 | -42 ± 1.2 | -42.08 |
| K (mV) | 6.2 ± 0.4 | 7 ± 1 | 4.2 ± 0.6 |
| V_{rev} (mV) | 37 ± 1 | 33 ± 2 | 31 ± 3 |
| τ_{act} (ms) | 3 ± 0.4 | 4.4 ± 1 | 3 ± 1 |
| τ_{inact} (ms) | 15 ± 1 | $27 \pm 2^*$ | 11 ± 1.3 |
| $\tau_{\text{h-110}}$ (ms) | 68 ± 3 | $318 \pm 21^*$ | $385 \pm 62^*$ |

Los datos representan la media \pm SEM. Las unidades de V_{50} , k , y V_{rev} están dadas en mV y se obtuvieron mediante el ajuste de la ecuación modificada de Boltzmann a los datos de la figura 2 (AN) y 9 (Cbx). Los valores de la τ_{act} y τ_{inact} están en ms, y se obtuvieron del ajuste de dos exponenciales simples a los registros de corriente a -20 mV. Los valores de la τ_{h} están presentados en ms y se obtuvieron del ajuste de una sola exponencial a los datos de recuperación de la inactivación a -100 mV. El número de células investigadas fue entre 6 y 9, para cada parámetro. Los asteriscos indican diferencia significativa utilizando la prueba t de Student ($P < 0.05$).

7. Discusión.

Los canales de Ca^{2+} tipo T son elementos esenciales de los que depende una gran variedad de procesos y vías de señalización en una enorme diversidad de tipos celulares. Estos incluyen a las neuronas, las células de riñón, las células cardíacas, y las células espermatogénicas y los espermatozoides entre muchas otras (Perez-Reyes 2003; Santi et al., 1996; Arnoult et al., 1998; Espinosa et al., 1999; Son et al., 2000; Park et al., 2003; Benoff et al., 2007; Treviño et al., 2004; Darszon et al., 2006; Wennemuth et al., 2000; Escoffier et al., 2007; Darszon et al., 2011). En las células espermatogénicas de ratón se encuentran las tres isoformas de la familia Ca_v3 ($\text{Ca}_v3.1$; 3.2 y 3.3) (Treviño et al., 2004), y se conservan durante el desarrollo y la maduración de los espermatozoides (Darszon et al., 2004). La hipótesis de que los Ca_v3 podrían participar en los procesos de fecundación dependientes de Ca^{2+} en los espermatozoides maduros se sustenta en gran parte debido a que estos no tienen la capacidad de sintetizar proteínas de *novo* y que los Ca_v3 se inmunolocalizaron tanto en los espermatozoides de ratón como de humano (Treviño et al., 2004; Darszon et al., 2006). En este sentido la ausencia de registros electrofisiológicos de los canales tipo T en espermatozoides maduros (Lishko et al., 2011; Ren and Xia, 2010) puede deberse a la baja actividad de los Ca_v3 que no puede resolverse con la técnica de “patch-clamp”. La existencia de mecanismos de regulación negativa que mantiene inactivados a los canales durante la maduración y los activa en ciertas etapas del proceso de fecundación también debe de ser considerada. Las células espermatogénicas son hasta ahora el único ejemplo de células germinales en donde se han logrado registrar las corrientes de los canales de Ca^{2+} tipo T y se han estudiado con cierto nivel de

detalle (Darszon et al., 2011). En el ratón se propone que la corriente de Ca^{2+} tipo T corresponde principalmente a la actividad de la isoforma $\text{Ca}_v3.2$ debido principalmente a que las células espermáticas del ratón nulo en este canal no tienen corrientes de Ca^{2+} (Stamboulian et al., 2004; Escoffier et al., 2007). Sin embargo, la corriente global de Ca^{2+} tipo T en este tipo celular podría representar una mezcla de la actividad de las distintas isoformas (Santi et al., 1996), lo que hace necesaria la generación de ratones nulos en las tres isoformas de los Ca_v3 y el estudio detallado de las propiedades biofísicas de la corriente tipo T.

En este trabajo nos propusimos en primer lugar hacer un estudio biofísico detallado de la corriente de Ca^{2+} tipo T en células espermáticas de ratón con el fin de conocer los parámetros biofísicos que nos permitieran separar la contribución de cada una de las isoformas en la corriente global de Ca^{2+} . Adicionalmente nos propusimos establecer el mecanismo de bloqueo por el AN y el Cbx para determinar si es posible utilizarlas como herramientas químicas que nos permitan conocer la participación de los Ca_v3 en los procesos de fecundación. Es importante remarcar que ambas drogas se prescriben para el tratamiento de padecimientos comunes como la artritis reumatoide. Considerando la distribución de los canales tipo T en los distintos tejidos y la gran variedad de procesos fisiológicos en los que participan incluyendo posiblemente la formación, el desarrollo y/o la maduración de los espermatozoides (Mishra et al., 2006; Darszon et al., 2011), nuestro trabajo nos ayudará a establecer el impacto que este tipo de compuestos químicos representa en la reproducción.

El AN es una droga anti-inflamatoria no esteroidea que pertenece al grupo de los fenamatos y se prescribe para el tratamiento de padecimientos como el dolor agudo y la artritis reumatoide. Esta droga puede bloquear una variedad de canales iónicos, incluyendo a los Ca_v3 (White and Aylwin, 1990; Espinosa et al., 1999; Scott-Ward et al., 2004; Lee and Wang, 1999; Ottolia and Toro, 1994; Malhykina et al., 2002; Wang et al., 1997; Busch et al., 1994; Peretz et al., 2005; Accili and DiFrancesco, 1996; Satoh and Yamada, 2001; Cheng and Sanguinetti, 2009; Hu et al., 2010). De forma interesante, la RA inducida por GABA, Progesterona o ZP, es sensible al AN (Espinosa et al., 1998). Como parte de esta tesis determinamos que el AN bloquea a las corrientes tipo T de las células espermatoogénicas de ratón con una IC_{50} de $\sim 74 \mu M$, un valor cercano al reportado en 1999 por Espinosa y colaboradores ($\sim 45 \mu M$, Espinosa et al., 1999). Las tres isoformas de los Ca_v3 tienen distinta sensibilidad al AN (Balderas et al., 2011) de tal forma que la diferencia con la IC_{50} reportada por Espinosa y colaboradores (1999) podría deberse a que los registros se hicieron en células que se encontraban en diferente estadio de desarrollo en donde probablemente la expresión, función y distribución de las tres isoformas determinen las propiedades de la corriente total . Anteriormente Espinosa y colaboradores (1998) habían demostrado que la RA inducida por Progesterona presentó una IC_{50} de $\sim 80 \mu M$ por el AN (Espinosa et al., 1998). Extrapolando nuestros resultados con las células espermatoogénicas hacia los espermatozoides maduros considerando que estos no tienen la capacidad de sintetizar proteínas de *novo*, existe la posibilidad de que la inhibición de la RA por AN por el bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo T (Espinosa et al., 1998). Sin embargo, debido a la relativamente baja especificidad del AN (IC_{50} de $\sim 75 \mu M$) existe la posibilidad de que

afecte a otras conductancias de Ca^{2+} que participan en los procesos de fecundación como los transportadores tipo CatSper (Kirichok et al., 2006).

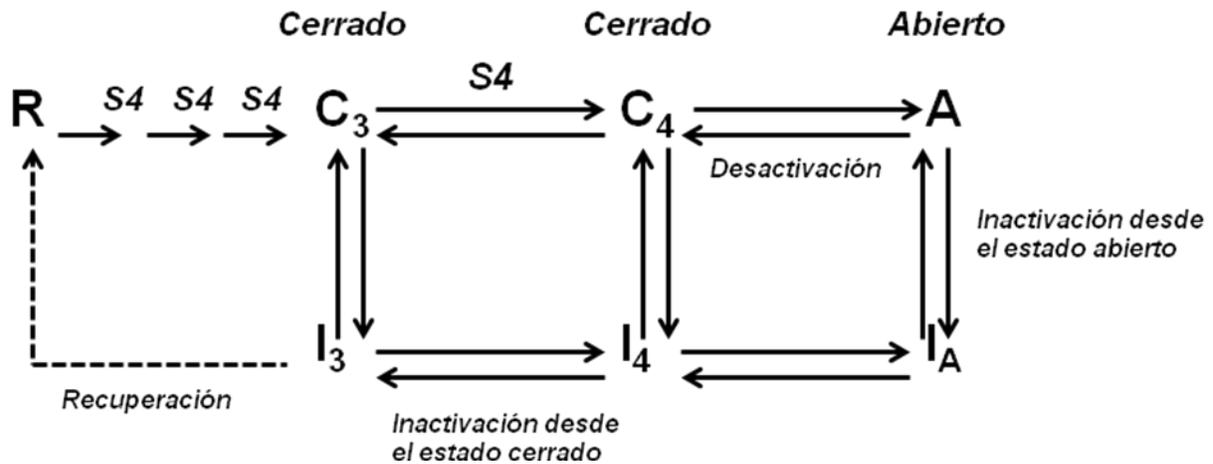
En el presente trabajo demostramos que el AN tiene un efecto inhibitorio de las corrientes de Ca^{2+} tipo T que fue dependiente de la dosis (0.1-1000 μM ; Fig.1). Se ha reportado que los canales tipo HCN tienen dos sitios de unión con distinta afinidad para el AN, cuando se une a un solo sitio cambia la dependencia del voltaje de la activación hacia voltajes más negativos, mientras que cuando ocupa los dos sitios de unión bloquea a los canales (Cheng y Sanguinetti, 2009). En nuestro estudio observamos: *i*) que el AN no cambió el umbral de activación de los canales tipo T (~ -60 mV), *ii*) que la máxima actividad de los canales se presentó a -20 mV y esto no cambió con AN, y *iii*) que el potencial de inversión ocurrió cerca de los $+40$ mV tanto en el control como en presencia del AN (Fig. 1). Estos resultados nos indican que si el AN se une a un sitio específico en los canales tipo T ($n_H \sim 1$) esto no afecta la sensibilidad al voltaje de los canales porque posiblemente se encuentra alejado de las **S4**.

Es importante resaltar que en nuestros registros existe un componente insensible a concentraciones mayores de 1 mM de AN (~ 15 % de la corriente de Ca^{2+}). Los estudios realizados con las isoformas recombinantes de los Ca_v3 indicaron que el AN bloqueó solo el 70% de la corriente de Ca^{2+} a concentraciones mayores a 1 mM (JC. Gómora, comunicación personal). Estas evidencias en conjunto sugieren que posiblemente el AN no es un bloqueador muy potente de este tipo de canales, o que el 15% insensible a esta droga corresponde a otras conductancias de Ca^{2+} como por ejemplo los canales

de Ca^{2+} tipo L (Treviño et al., 2004; José-O, et al., 2010; Darszon et al., 2011) u otras isoformas.

La caracterización biofísica de la corriente tipo T en las células espermatoogénicas de ratón reveló que sus propiedades son más parecidas a las características de la isoforma $\text{Ca}_v3.1$ que a las de la 3.2 recombinantes. El análisis de la constante de disociación (K_d) del complejo AN-canal utilizando la fracción de corriente bloqueada con 100 μM de AN para cada isoforma recombinante reveló una $k_d = 78.4$; 192; y 137 μM para $\text{Ca}_v3.1$; 3.2 y 3.3, respectivamente (Balderas et al., 2011). El valor de la k_d equivalente a la corriente bloqueada (60%) con 100 μM de AN registrada en células espermatoogénicas fue de 69.6 μM , que es muy cercano al valor de la IC_{50} calculada con los datos de la figura 1 del presente trabajo ($\sim 75 \mu\text{M}$ de AN). Esto nos sugiere que la corriente total de Ca^{2+} tipo T de las células espermatoogénicas tiene características que corresponden a la actividad de la isoforma $\text{Ca}_v3.1$, y que el AN puede utilizarse para diferenciarlas.

En este trabajo reportamos que el bloqueo por el AN no alteró la sensibilidad al voltaje de los canales tipo T, contrario a lo reportado en otros canales iónicos (Wang et al., 1997; Busch et al., 1994; Peretz et al., 2005; Accili and Difrancesco 1996; Satho and Yamada 2001). Adicionalmente nuestros resultados con el AN nos indicaron que el bloqueo de los canales tipo T fue independiente del voltaje mientras que Espinosa y col. (1999) observaron que el bloqueo de los canales tipo T por AN fue débilmente dependiente del voltaje en el mismo tipo celular. Las tres isoformas recombinantes de los Ca_v3 tienen distinta sensibilidad al AN, el bloqueo de la isoforma 3.1 y la 3.3 es



Esquema 1. Representación de las transiciones que ocurren entre los diferentes estados de los canales de Ca^{2+} tipo T: (**R**) reposo, (**C**) cerrado, (**A**) abierto e (**I**) inactivado. Se piensa que los cambios de potencial de membrana provocan que los sensores de voltaje (**S4**) se desplacen lo que conlleva a cambios generalizados en toda la estructura de la proteína. El movimiento de tres de los cuatro **S4** es suficiente para inducir la transición de los canales hacia estados cerrados que se inactivan rápidamente. El estado **C₄** puede pasar a un estado **I₄** o bien al estado **A**. Los efectos del voltaje sugieren que para que los canales puedan recuperarse de la inactivación los **S4** deben regresar a su posición original.

Esquema tomado de Perez-Reyes 2003 y modificado.

dependiente del voltaje, mientras que en la isoforma recombinante 3.2 es independiente del voltaje (Balderas et al., 2011). Estos resultados apoyan la hipótesis de que posiblemente las células empleadas por Espinosa y col. (1999) y por nosotros en este trabajo corresponden a un estadio diferente de desarrollo que quizá contengan una proporción distinta de isoformas de los Ca_v3 que en conjunto generan la corriente global de Ca^{2+} .

El AN aumenta la τ_{activ} y la $\tau_{inactiv}$ de los canales tipo T (Fig. 3), dejando la $\tau_{desactiv}$ sin cambio (Fig. 4). Esto significa que la droga retrasa la transición del estado **C** (**C4**) al estado **A** pero no la transición reversa (del **A** al **C4**). La transición del estado **A** al estado **I** también se retrasa lo que sugiere que los canales permanecen más tiempo en el estado abierto en presencia del AN (Esquema 1). La disminución de la corriente entrante sin embargo, podría explicarse si tomamos en cuenta que el efecto del AN fue mayor cuando los canales se incubaron con la droga mientras estos se encontraban en el estado **I** (Fig. 5). Esto último sugiere que el número de canales que permanecieron en el estado **I** fue mayor al número de canales a los que sí se les pudo remover la inactivación con el pulso hiperpolarizante, lo que generó una menor corriente de Ca^{2+} al abrirlos. El aumento en la recuperación de la inactivación apoya la hipótesis de que el AN estabiliza el estado **I** de los canales tipo T retrasando el regreso de los **S4** a su posición original en el estado **R**. Las evidencias encontradas en el ratón nulo en $Ca_v3.2$ sugieren que esta es la isoforma que genera la corriente T en células espermatogénicas, sin embargo la τ_h de ~70 ms que nosotros obtuvimos es 8 veces menor a la correspondiente para la isoforma $Ca_v3.2$ recombinante (Perez-Reyes 2003).

En contraste la τ_h de la isoforma 3.1 recombinante es de ~ 100 ms, cercana al valor que nosotros calculamos en nuestro modelo (Balderas et al., 2011). En este trabajo también observamos que el AN aumenta la τ_h a ~ 320 ms y si tomamos en cuenta que la isoforma $Ca_v3.2$ es menos sensible al AN que la 3.1, la corriente residual podría corresponder a la isoforma $Ca_v3.2$ ó a la $Ca_v3.3$ cuyos valores de la τ_h son de entre 300 y 450 ms. La caracterización biofísica detallada que realizamos en este trabajo así como el estudio del mecanismo de bloqueo por el AN nos indican en primer lugar que la corriente de Ca^{2+} tipo T resulta de la actividad de una isoforma adicional a la $Ca_v3.2$. En segundo lugar estos resultados nos indican que el AN es una droga que nos permite separar la contribución de las distintas isoformas en la corriente total de Ca^{2+} en células espermatogénicas de ratón y que podría ser utilizada para determinar la participación de los canales tipo T en los procesos de fecundación. Esta hipótesis es parcialmente apoyada por los efectos del AN reportados en la dinámica del Ca^{2+} relacionada con la quimiotaxis en espermatozoides de erizo de mar. El AN a $10 \mu M$ incrementa tanto la amplitud como la duración del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el flagelo de los espermatozoides de erizo de mar (*S. purpuratus*) e incrementa el intervalo entre las transiciones individuales inducidas por su agonista natural, el sperct (Wood et al., 2007). En otra especie de erizo de mar (*L. pyctus*) el AN a una concentración de $30 \mu M$ aumenta la longitud de arco de la vuelta del espermatozoide en la búsqueda del centro del gradiente del quimioatrayente, respuesta asociada a los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ (Guerrero A, comunicación personal). En ambos casos aunque la concentración de AN es menor a la IC_{50} que bloquea a los canales de Ca^{2+} tipo T en células espermatogénicas de ratón, no se puede descartar la participación de este tipo de

canales en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ puesto que las características de las isoformas de los Ca_v3 y su sensibilidad a los distintos bloqueadores puede variar entre especies.

La observación de que el ratón con fondo genético $Ca_v3.2^{-/-}$ no tenga corrientes de Ca^{2+} tipo T (Escoffier et al., 2007) no excluye la posibilidad de que el apagamiento del gen de la isoforma $Ca_v3.2$ haya afectado de algún modo la expresión de las otras dos isoformas de los Ca_v3 . En el trabajo en donde se reportó la construcción del ratón $Ca_v3.2^{-/-}$ no se indica claramente que se haya verificado la presencia de los transcritos, o de las proteínas de las isoformas $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ (Escoffier et al., 2007). La caracterización detallada de la corriente de Ca^{2+} tipo T en el fondo genético $Ca_v3.1^{-/-}$ (Stambouliau et al., 2004) ayudaría a clarificar la naturaleza de las isoformas que participan. Nuestro análisis indica que algunos parámetros de la corriente tipo T nativa no corresponden a los reportados para la isoforma $Ca_v3.2$ en otros tejidos (Perez-Reyes et al., 2007; Darszon et al., 2011). Sin embargo, aun cabe la posibilidad de que estas diferencias sean el resultado de la existencia de mecanismos de regulación (Arnoult et al., 1998) que influyen sobre las características de las distintas isoformas de los Ca_v3 provenientes de diferentes tejidos.

Otra posibilidad es que la corriente de Ca^{2+} tipo T que registramos en células espermatozógenas se debe a la actividad de una isoforma distinta de los Ca_v3 identificados hasta ahora. Recientemente en invertebrados se encontró una nueva isoforma de los Ca_v3 nombrada LCa_v3 con características y propiedades biofísicas que difieren del resto de las isoformas de la familia Ca_v3 en mamíferos (Senatore y Spafford 2010). La presencia de canales con propiedades únicas que se expresan de

forma exclusiva en las células germinales no es un tema nuevo. A la fecha se conocen al menos 2 canales iónicos que corresponden a esta categoría, los transportadores tipo CatSper (1-4) y los canales tipo Slo3 (KSper) (Carlson et al., 2003; Kirichok et al., 2006; Xia et al., 2007; Ren and Xia 2010; Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011; Navarro et al., 2007; Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011). La hipótesis de la existencia de nuevas isoformas de los Ca_v3 se tendrá que comprobar quizás mediante la clonación y el alineamiento de secuencias entre las tres isoformas de los Ca_v3 provenientes de células espermatogénicas de ratón con la isoforma LCa_v3 de invertebrados.

Como lo mencionamos en la introducción los AINEs son drogas de uso común que se prescriben para el tratamiento de varias enfermedades en los humanos. Una de estas drogas es el Cbx que inhibe canales de K^+ y Na^+ activados por voltaje en ratas, induce arritmias en insectos, bloquea a los canales $Kv2.1$ y modifica el “gating” de los canales de K^+ tipo Shab. Además bloquea reversiblemente a los canales de Ca^{2+} tipo L en células PC12. Con base en estos antecedentes decidimos probar y caracterizar el efecto del Cbx en las corrientes tipo T en células espermatogénicas de ratón para establecer si uno de los efectos colaterales del uso de esta droga podría estar relacionado con los procesos de fertilidad. El Cbx bloquea canales de Ca^{2+} tipo L de forma reversible con una IC_{50} de $0.45 \mu M$ en células PC12 (Zhang et al., 2007). Se ha reportado que el Cbx inhibe las adenilato ciclasas y en consecuencia la producción de AMPc, el cual regula la entrada de Ca^{2+} y el estado de fosforilación de los Ca_v s y de otras proteínas (Saini et al., 2003; Caterall 2000).

En este estudio demostramos la eficacia del Cbx para bloquear la corriente de Ca^{2+} tipo T en células espermatozógenas con una IC_{50} de $\sim 27 \mu\text{M}$ (Fig. 8). Aunque el Cbx es tres veces más potente que el AN para bloquear las corrientes tipo T (Fig. 1), bloquea a los canales tipo L más potentemente ($\text{IC}_{50} \sim 500 \text{ nM}$) (Zhang et al., 2007). Nuestros resultados sugieren la presencia de un solo sitio de unión a esta droga en los canales de Ca^{2+} tipo T ($n_H = 1.4$). El efecto de bloqueo fue parcialmente reversible en todas las concentraciones de Cbx empleadas. Lo anterior indica que el complejo Cbx-canal T es más estable (Fig. 12) que con otro tipo de canales de Ca^{2+} como los tipo L, donde el efecto es reversible (Zhang et al., 2007).

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que el Cbx no afectó la dependencia de voltaje, ni de la activación ni de la inactivación en el estado estacionario (Fig. 9). Esta droga tampoco alteró la cinética de activación ni la inactivación, a diferencia del AN (Fig. 10). Adicionalmente, la tau de desactivación de la corriente tipo T (entre -110 y -50 mV) tampoco se modificó. Estos resultados en conjunto nos indican por un lado que la unión de Cbx al canal no interfiere con su sensibilidad al voltaje. Por otro lado indican que la unión del Cbx al canal no interfiere con el mecanismo de apertura, de inactivación y de cierre de los canales. En la curva de inactivación del estado estacionario se observó una leve tendencia hacia voltajes más negativos en presencia de la droga (Fig. 9), sin embargo este efecto no fue estadísticamente significativo.

Un parámetro fuertemente afectado por el Cbx fue la recuperación de la inactivación que aumentó casi seis veces con respecto al control (Fig. 13, tabla I). Este resultado nos sugiere que el Cbx estabiliza el estado *I* de los canales lo que a su vez disminuye

el número de canales que regresan al estado **R** y que pueden pasar al estado **C** y posteriormente al estado **A** en función de los voltajes despolarizados. Esta hipótesis explicaría la disminución de la corriente de Ca^{2+} ocasionada por el Cbx (Figs. 8, 9, 12 y 13). La transición de los canales del estado **A** al estado **I** no cambió en presencia del Cbx (Fig. 10), y el mecanismo de cierre de los canales también permaneció sin cambio (Fig. 11). Es probable que el Cbx promueva la transición de los canales del estado **C** al estado **I** estabilizando este último lo que retrasaría el regreso de los canales al estado **R** (Esquema 1). La τ_{h-110} (~70 ms) de la corriente tipo T que determinamos en condiciones control fue más cercana a la τ_h de la isoforma $\text{Ca}_v3.1$ recombinante (~120 ms) (Pérez-Reyes 2003). En presencia de Cbx la τ_{h-110} aumentó 8 veces aproximándose al valor de la τ_h de las isoformas $\text{Ca}_v3.2$ y la 3.3 (τ_h ~350 - 400 ms) (Fig. 13. Balderas et al., 2011; Pérez-Reyes, 2003).

El análisis de la biofísica de la inactivación de los canales tipo T realizado en este trabajo en células espermatozógenas de ratón no nos permiten establecer cómo es la interacción de la droga con los diferentes estados del canal. Además de que no sabemos con certeza cuántos estados inactivados presenta cada una de las isoformas de los Ca_v3 que se expresan constitutivamente en estas células. Nuestras observaciones están limitadas por el sistema nativo en donde las propiedades y los parámetros de los canales que se expresan representan una mezcla de las distintas isoformas y conductancias. En los canales de K^+ expresados en sistemas heterólogos se reportó por ejemplo que el Cbx desplaza la curva de inactivación hacia voltajes más negativos y acelera la inactivación de los canales tipo $\text{K}_v2.1$ y Shab (Frolov et al., 2010;

Arias-Olguín et al., 2011). Estas observaciones pueden corroborarse en sistemas nativos donde el Cbx afecta la velocidad de repolarización de las neuronas, el alargamiento de los potenciales de acción y el funcionamiento general de los tejidos en donde se expresan este tipo de canales. Nuestro modelo cinético propuesto para las células espermatoogénicas incluye un componente de inactivación rápido pero no podemos descartar la presencia de un componente de inactivación lento, como se reportó para este y otros tipos de canales iónicos (Serrano et al., 1996; Bouchard y Fedida, 1995; Wang et al., 2003; Qu et al., 2007).

El efecto de bloqueo de la conductancia de los canales de Ca^{2+} tipo T por Cbx en células espermatoogénicas de ratón se suma a los efectos colaterales que esta droga produce en otro tipo de canales iónicos que se expresan en otros tejidos, además de los efectos adversos documentados a nivel neuronal y de células cardiacas. En este estudio demostramos que el Cbx es un bloqueador relativamente potente de los canales de Ca^{2+} tipo T que se podría utilizar para realizar estudios biofísicos detallados en sistemas de expresión heteróloga donde puedan separarse los distintos estados inactivados de los canales y tratar de establecer cómo es la interacción a nivel molecular de este tipo de fármacos con los canales de Ca^{2+} . Esto nos permitirá en el futuro establecer nuevos parámetros en el desarrollo y de fármacos con mayor especificidad y eficiencia para el tratamiento de enfermedades específicas con efectos secundarios menores.

8. Perspectivas.

8.1 Clonar los canales de Ca^{2+} tipo T de las células espermatogénicas de ratón y hacer un alineamiento de las secuencias para compararlas con las isoformas de los otros tejidos en donde también se expresan.

8.2 Caracterizar la corriente de Ca^{2+} tipo T en células espermatogénicas del ratón nulo en el $\text{Ca}_v3.1$.

8.3 Determinar si las células espermatogénicas y los espermatozoides del ratón nulo en el $\text{Ca}_v3.2$ se encuentran las isoformas 3.1 y 3.3 para descartar la posible redundancia funcional.

8.4 Caracterizar el efecto del AN y del Cbx sobre los canales tipo CatSper en espermatozoides de ratón y de humano.

8.5 Caracterizar el efecto del Cbx en los patrones de movilidad en espermatozoides de erizo de mar, de ratón y de humano.

9. Anexo 1. Tabla comparativa de los parámetros biofísicos determinados en las tres isoformas de la familia Cav₃.

| <i>Channel origin</i> | <i>Cell type or heterologous expression system</i> | <i>H_p (mV)</i> | <i>Thres (mV)</i> | <i>I-V Peak (mV)</i> | <i>V_{a50} (mV)</i> | <i>V_{i50}</i> | <i>T_d (ms)</i> | <i>T_h at -100mV (ms)</i> | <i>Reference</i> |
|-------------------------|--|---------------------------|-------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Rat Cav3.2 | Spermatogenic | -84 to -94 | -60 | -24 to -29 | | | | | Hagiwara and Kawa 1984 |
| Mouse CaV3.2 | Spermatogenic | -80 | -60 | -20 | | | | | Lievano et al., 1996 |
| Mouse Cav3.2 | Spermatogenic | -90 | -60 | -20 to -30 | -47.3 ± 2.1 | -63.9 ± 4.4 | 7.9 ± 1.3 | 117 | Santiet al., 1996 |
| Mouse Cav3.2 | Round spermatide | -90 | -60 | -30 | | | | | Amoult et al., 1996 |
| Mouse Cav3.2 | Spermatogenic | -80 to -90 | -60 | -20 to -30 | | -70 | | | Amoult et al., 1998 |
| Mouse Cav3.2 | Pachytene Spermatocytes | -90 | -60 | -20 | | | | | Espinosa et al., 1999 |
| Human Cav3.2 | HEK-293 | -90 | -60 | -30 | -45.8 ± 0.7 | -72.0 ± 1.2 | 2.7 | 395 | Klockner et al., 1999 |
| Rat Cav3.1 | HEK-293 | -90 | -60 | -30 | -45.5 ± 0.6 | -72.8 ± 1.3 | 1.7 | 117 | Klockner et al., 1999 |
| Rat Cav3.3 | HEK-293 | -90 | -60 | -27 | -43.8 ± 0.5 | -72.5 ± 1 | 1.0 | 352 | Klockner et al., 1999 |
| Rat Cav3.2 | Brain/HEK-293 | -110 | -70 | -35 to -45 | -43.15 | -73.9 | 0.61 ± 0.81 | | McRory et al., 2001 |
| Rat Cav3.1 | Brain/HEK-293 | -110 | -70 | -35 to -45 | -51.73 | -85.4 | 1.63 ± 0.1 | | McRory et al., 2001 |
| Rat Cav3.3 | Brain/HEK-293 | -110 | -70 | -35 to -45 | -60.7 | -93.2 | 1.15 ± 0.073 | | McRory et al., 2001 |
| Mouse Cav3.1 & Cav3.2 | Pachytene & round spermatides | -95 | -70 | -35 | -51.2 ± 1.9 | -73.4 ± 5.7 | | 104 | Stamboulian et al., 2004 |
| Mouse Cav3.1 | Pachytene & round spermatides | -95 | -70 | -41 | -57.5 ± 5.4 | -77.9 ± 4.3 | | 116 | Stamboulian et al., 2004 |
| Cav3.1, Cav3.2, Cav3.3. | Pachytene & round spermatides | -90 | -60 | -20 | -42 ± 0.6 | -63.9 ± 0.3 | 2.4 ± 0.5 | 67.6 ± 3 | Balderas et al., 2011. |
| Mouse Cav3.1 | HEK-293 | -100 | -70 | -40 | -52.3 ± 0.9 | | | 131 ± 4 | Balderas et al., 2011. |
| Mouse Cav3.2 | HEK-293 | -100 | -70 | -40 | -55 ± 1.0 | | | 545 ± 16 | Balderas et al., 2011. |
| Mouse Cav3.3 | HEK-293 | -100 | -70 | -30 | -50.7 ± 1.5 | | | 503 ± 16 | Balderas et al., 2011. |

En la tabla se muestra, *Channel origin*: tipo de canal y la especie de donde proviene. *Cell type or heterologous expression system*: tejido o tipo celular donde se expresa el canal. *H_p (mV)*: potencial de mantenimiento. *Thres (mV)*: umbral de activación. *I-V Peak (mV)*: potencial donde se registra la corriente al pico. *V_{a50} (mV)*: voltaje medio de activación. *V_{i50} (mV)*: voltaje medio de inactivación. *T_d (ms)*: valor de la Tau de desactivación. *T_h at -100 mV (ms)*: tau de recuperación de la inactivación. *Reference*: referencia del trabajo.

10. Literatura citada.

Accili EA and DiFrancesco D. 1996. Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) of rabbit SA node myocytes by niflumic acid. *Pflugers Arch* 431:757– 762.

Akingmebi BT, Hardy MP. 2001. Osteogenic and antiandrogenic chemical in the environment: effects on male reproductive health. *Ann Med.* 33 (6):391-403.

Arias-Olguín II, Carrillo E, Meza-Torres B, Barriga-Montoya C, Balleza D, Gómez-Laguna F. 2011. Induction of a fast inactivation gating on delayed rectifier Shab K(+) channels by the anti-inflammatory drug celecoxib. *Channels* 1: 56-64.

Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. 1996. Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucid. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13004–13009.

Arnoult C, Villaz M, Florman HM. 1998. Pharmacological Properties of the T-type Ca^{2+} current of Mouse Spermatogenic Cells. *Molecular Pharmacology*, 53: 1104-1111.

Balderas E, Arteaga-Tecuitl R, Rivera M, Gomora JC, Darszon A. 2011. Niflumic Acid Blocks Native and Recombinant T-type Channels. *Journal of Cellular Physiology* (Accepted).

Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Maggi M, Francavilla S, Gabriele A, Properzi G, Forti G. 1999. Nongenomic progesterone receptor on human spermatozoa: biochemical aspects and clinical implications. *Steroids* 64 143–148.

Benoff S, Chu CC, Marmar JI, Sokol RZ, Goodwin LO, Hurley IR. 2007. Voltage-dependent calcium channels in mammalian spermatozoa revisited. *Front Biosci* 12: 1420-49.

Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P. 2001. Calcium signaling – an overview. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12 3–10.

Bouchard R, Fedida D. 1995. Closed- and open-state binding of 4-aminopyridine to the cloned human potassium channel Kv1.5. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275: 864-876.

Brownstein JS, Sordo M, Kohane IS, Mandl KD. 2007. The tell-tale heart: Population-based surveillance reveals an association of rofecoxib and celecoxib with myocardial infarction. *PLoS ONE* 2: e840.

Busch AE, Herzer T, Wagner CA, Schmidt F, Raber G, Waldegger S, Lang F. 1994. Positive regulation by chloride channel blockers of IsK channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 46:750–753.

Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF. 2003. CatSper 1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 100: 14864-14868.

Catterall WA. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16: 521–55.

Cheng L, Sanguinetti MC. 2009. Niflumic acid alters gating of HCN2 pacemaker channels by interaction with the outer region of S4 voltage sensing domains. *Mol Pharmacol* 75:1210-21.

Chopra M, Gu GG, Singh S. 2000. Mutations affecting the delayed rectifier potassium current in *Drosophila*. *J Neurogenet* 14: 107–123.

Costello S, Michelangeli F, Nash K, Lefievre L, Morris J, Machado-Oliveira G, Barratt C, Kirkman-Brown J, Publicover S. 2009. Ca²⁺ stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction* 138: 425-437.

Darszon A, López-Martínez P, Acevedo JJ, Hernández-Cruz A, Treviño CL. 2006. T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium* 40: 241-52.

Darszon A, Nishigaki T, Beltran C and Treviño CL. 2011. Calcium channels in the development, maturation and function of spermatozoa. *Physiological Reviews* (in press).

DeWitt DL. 1999. COX-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol. Pharmacol.* 55(4): 625–31.

Escoffier J, Boisseau S, Serres C, Chen CC, Kim D, Stamboulian S, Shin H-S, Campbell KP, De Waard M, and Arnoult C. 2007. Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 channels in sperm cells: an evaluation from Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 deficient mice. *J Cell Physiol* 212: 753-763.

Espinosa F, De la Vega-Beltran JL, Lopez-Gonzalez I, Delgado R, Labarca P, Darszon A. 1998. Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl⁻ channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* 426:47–51.

Espinosa F, Lopez-Gonzalez I, Serrano CJ, Gasque G, De la Vega-Beltran JL, Trevino CL, Darszon A. 1999. Anion channel blockers differentially affect T-type Ca⁽²⁺⁾ currents of mouse spermatogenic cells, alpha1E currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction. *Dev Genet* 25: 103–114.

Espino J, Mediero M, Lozano GM, Bejarano I, Ortiz A, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB. 2009. Reduced levels of intracellular calcium releasing in spermatozoa from asthenozoospermic patients. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7 11.

Florman HM, Corron ME, Kim TDH, Babcock DF. 1992. Activation of voltage dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.*, 152, 304–314.

Florman, HM. 1994. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular calcium are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.*, 165, 152–164.

Frolov RV, Slaughter MM, Singh S. 2008 (a). Effects of celecoxib on ionic currents and spontaneous firing in rat retinal neurons. *Neuroscience* 154: 1525–1532.

Frolov RV, Berim IG, Singh S. 2008 (b). Inhibition of delayed rectifier potassium channels and induction of arrhythmia: a novel effect of celecoxib and the mechanism underlying it. *J Biol Chem* 283: 1518–1524.

Frolov RV, Bondarenko VE, and Singh. 2010. Mechanism of KV2.1 channel inhibition by celecoxib –modification of gating and channel block. *British Journal of Pharmacology*. 159: 405-418.

Guerrero A, Nishigaki T, Carneiro J, Yoshiro Tatsu, Wood CD, Darszon A. 2010. Tuning sperm chemotaxis byCa²⁺ burst timing. *Dev Biol*. 344: 52-65.

Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G. 2001. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J*.15:2742–4.

Hagiwara S, Ozawa S, Sand O. 1975. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol*. 65:617–44.

Hagiwara S, Kawa K. 1984. Calcium and potassium currents in spermatogenic cells dissociated from rat seminiferous tubules. *J Physiol* 356: 135–149.

Hegde P, Gu GG, Chen D, Free SJ, Singh S. 1999. Mutational analysis of the Shab-encoded delayed rectifier K(+) channels in *Drosophila*. *J Biol Chem* 274: 22109–22113.

Hu H, Tian J, Zhu Y, Wang C, Xiao R, Herz JM, Wood JD, Zhu MX. 2010. Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pflugers Arch* 459: 579-92.

Iftinca M, Hamid J, Chen L, Varela D, Tadayonnejad R, Altier C, Turner RW, Zamponi GW. 2007. Regulation of T-type calcium channels by Rho-associated kinase. *Nat Neurosci* 10: 854-860.

Jagannathan S, Punt EL, Gu Y, Arnoult C, Sakkas D, Barratt CL, Publicover SJ. 2002. Identification and localization of T-type voltage-operated calcium channel subunits in human male germ cells. Expression of multiple isoforms. *J Biol Chem* 277: 8449-56.

José O, Hernández-Hernández O, Chirinos M, González-González ME, Larrea F, Almanza A, Félix R, Darszon A, Treviño CL. 2010. Recombinant human ZP3-induced sperm acrosome reaction: evidence for the involvement of T- and L-type voltage-gated calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 395: 530-4.

Kawai F and Miyachi E. 2001. Modulation by cGMP of the voltage-gated currents in newt olfactory receptor cells. *Neurosci Res* 39: 327-337.

Kirichok Y, Navarro B, Clampham D. 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature* 439: 737-740.

Krausz C, Bonaccorsi L, Luconi M, Fuzzi B, Criscuoli L, Pellegrini S, Forti G, Baldi E. 1995. Intracellular calcium increase and acrosome reaction in response to

progesterone in human spermatozoa are correlated with in-vitro fertilization. Human Reproduction 10 120–124.

Kulp SK, Yang YT, Hung CC, Chen KF, Lai JP, Tseng PH, Fowble JW, Ward PJ, Chen Cs. 2004. 3- phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. Cancer Res. 64: 1444–51.

Lee YT, and Wang Q. 1999. Inhibition of hKv2.1, a major human neuronal voltage gated K₊ channel, by meclofenamic acid. Eur J Pharmacol 378:349–356.

Liantonio A, Picollo A, Babini E, Carbonara G, Fracchiolla G, Loidice F, Tortorella V, Pusch M, Camerino DC. 2006. Activation and inhibition of kidney CLC-K chloride channels by fenamates. Mol Pharmacol 69:165–173.

Lievano A, Santi CM, Serrano CJ, Treviño CL, Bellve AR, Hernandez-Cruz A, Darszon A. 1996. T-type Ca²⁺ channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. FEBS Lett 388: 150–154.

Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. Nature 471: 387-381.

Llinás R, Yarom Y. 1981. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones invitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. J. Physiol. 315: 569–84.

Malykhina AP, Shoeb F, and Akbarali HI. 2002. Fenamate-induced enhancement of heterologously expressed HERG currents in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 452: 269–277.

Mikoshiba K. 2007. IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signal concepts. *Journal of Neurochemistry* 102: 1426-1446.

Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE. 2007. KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci.* 104: 7688-7692.

Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440–43.

Orrenius S, Zhivotovsky B and Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. 2003. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 552-565.

Ottolia M and Toro L. 1994. Potentiation of large conductance KCa channels by niflumic, flufenamic, and mefenamic acids. *Biophys J.* 67:2272–2279.

Park JY, Ahn HJ, Gu JG, Lee KH, Kim JS, Kang HW, Lee JH. 2003. Molecular identification of Ca²⁺ channels in human sperm. *Exp Mol Med* 35: 285–292.

Park SY, Kim TH, Kim HI, Shin YK, Lee CS, Park M, Song JH. 2007. Celecoxib inhibits Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1148: 53–61.

Patel MI, Subbaramaiah K, Du B, Chang M, Yang P, Newman RA, Cordon-Cardo C, Thaler HT, Dannenberg AJ. 2005. Celecoxib inhibits prostate cancer growth:

evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res.* 11: 1999–2007.

Peretz A, Degani N, Nachman R, Uziyel Y, Gibor G, Shabat D, Attali B. 2005. Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity, and exhibit anticonvulsant properties. *Mol Pharmacol* 67:1053–1066.

Perez-Reyes E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev* 83: 117-161.

Perez-Reyes E, Van Deusen AL, Vitko L. 2009. Molecular pharmacology of human Cav3.2 T-type Ca²⁺ Channel: Block by Antihypertensives, Antiarrhythmics and their analogs. *JPET* 328: 621-627.

Prescott SM, Fitzpatrick FA. 2000. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1470 (2): 69–78.

Publicover S, Harper CV, Barratt C. 2007. [Ca²⁺]_i signalling in sperm – making the most of what you've got. *Nature Cell Biology* 9 235–242.

Qu YJ, Bondarenko VE, Xie C, Wang S, Awayda MS, Strauss HC, Morales MJ. 2007. W-7 modulates Kv4.3: pore block and Ca²⁺-calmodulin inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2364–2377.

Rangel A, Sanchez-Armass S, and Meza U. 2010. Protein kinase C-mediated inhibition of recombinant T-type Cav3.2 channels by neurokinin 1 receptors. *Mol Pharmacol* 77: 202-210.

Ren D, and Xia J. 2010. Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology Bethesda* 25: 165-175.

Reuter H. 1967. The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol* 192:479–92.

Reuter H. 1979. Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annu Rev Physiol* 41:413–24.

Reuter H. 1983. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs.

Nature 301:569–74.

Sakata Y, Saequsa H, Zong S, Osanai M, Murakoshi T, Shimizu Y, Noda T, Aso T, Tanabe T. 2001. Analysis of Ca⁽²⁺⁾ currents in spermatocytes from mice lacking Ca(V)2.3 (alpha (1E)) Ca⁽²⁺⁾ channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 1032-1036.

Saini SS, Gesell-Lee DL, Peterson JW. 2003. The cox-2-specific inhibitor celecoxib inhibits adenylyl cyclase. *Inflammation.* 2: 79-88.

Santi CM, Darszon A, Hernandez-Cruz A. 1996. Dihydropyridinesensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am J Physiol* 271: C1583–C1593.

Santi CM, Martínez-López P, de la Vega-Beltran JL, Butler A, Alisio A, Darszon A, Salkoff L. 2010. The Slo3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett.* 584: 1041- 1046.

Satoh TO and Yamada M. 2001. Niflumic acid reduces the hyperpolarizationactivated current (I_h) in rod photoreceptor cells. *Neurosci Res* 40:375–381.

Senatore A, and Spafford JD. 2010. Transient and Big Are Key Features of an Invertebrate T-type Channel (LCaV3) from the Central Nervous System of *Lymnaea stagnalis*. *The Jour. of Biol. Chem.* 285: 7447-7458.

Serrano JR, Perez-Reyes E, Jones SW. 1999. State-dependent inactivation of the alpha 1G T-type calcium channel. *J. Gen. Physiol.* 114 (2): 185-201.

Scott-Ward TS, Li H, Schmidt A, Cai Z, and Sheppard DN. 2004. Direct block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^- channel by niflumic acid. *Mol Membr Biol* 21: 27–38.

Singh A, Singh S. 1999. Unmasking of a novel potassium current in *Drosophila* by a mutation and drugs. *J Neurosci* 19: 6838–6843.

Singh G, Triadafilopoulos G. 1999. Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications. *J. Rheumatol. Suppl.* 56: 18–24.

Sinkkonen ST, Mansikkamaki S, Moykkynen T, Luddens H, Uusi-Oukari M, and Korpi ER. 2003. Receptor subtype-dependent positive and negative modulation of GABA (A) receptor function by niflumic acid, a nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Mol Pharmacol* 64:753–763.

Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN. 1997. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 99 (9):2254–9.

Son WY, Lee JH, Lee JH, Han CT. 2000. Acrosome reaction of human spermatozoa is mainly mediated by alpha1H T-type calcium channels. *Mol Hum Reprod* 6: 893-7.

Stamboulian S, Kim D, Shin HS, Ronjat M, De Waard M, Arnoult C. 2004. Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3.1 (alpha1G) calcium channel: CaV3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. *J Cell Physiol* 200: 116–124.

Strunker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 471: 382-386.

Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ. 1996. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 56 (19): 4424–9.

Sun WH, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Kawai N, Kimura A, Kakiuchi Y, Yasumaru M, Lijima H, Okuda Y, Sasaki Y, Hori M, Kawano S. 2000. Induction of cyclooxygenase-2 in rat gastric mucosa by rebamipide, a mucoprotective agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295(2): 447– 52.

Sun WH, Sun YL, Fang RN, Shao Y, Xu HC, Xue QP, Ding GX, Cheng YL. 2005. Expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 35(12): 707–13.

Tegeder I, Niederberger E, Vetter G, Brautigam L, Geisslinger G. 2001. Effects of selective COX-1 and -2 inhibition on formalin-evoked nociceptive behaviour and prostaglandin E(2) release in the spinal cord. *J. Neurochem.* 79(4):777–86.

Treviño CL, Félix R, Castellano LE, Gutiérrez C, Rodríguez D, Pacheco J, López-González I, Gomora JC, Tsutsumi V, Hernández-Cruz A, Fiordeliso T, Scaling AL, Darszon A. 2004. Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca⁽²⁺⁾ channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett* 563: 87–92.

Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(6):2046–50.

Vivanco I, Sawyers CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2: 489–501.

Wang HS, Dixon JE, and McKinnon D. 1997. Unexpected and differential effects of Cl⁻ channel blockers on the Kv4.3 and Kv4.2 K⁺ channels. Implications for the study of the Ito2 current. *Circ Res* 81:711–718.

Wang S, Morales MJ, Qu YJ, Bett GC, Strauss HC, Rasmusson RL. 2003. Kv1.4 channel block by quinidine: evidence for a drug induced allosteric effect. *J Physiol* 546: 387–401.

Weber A, Casini A, Heine A, Kuhn D, Supuran CT, Scozzafava A, Klebe G. 2004. Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: new pharmacological opportunities due to related binding site recognition. *J Med Chem* 47: 550–557.

Wennemuth G, Westenbroek RE, Xu T, Hille B, Babcock DF. 2000. CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm. *J Biol Chem*. 275: 21210-7.

Whitaker M. 2008. Calcium signaling in early embryos. *Phil Trans R Soc B*. 363: 1401-1418.

White MM and Aylwin M. 1990. Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 37: 720–724.

Wood CD, Nishigaki T, Tatsu Y, Yumoto N, Baba SA, Whitaker M, 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*, 306, 525-537.

Xia J, Reigada D, Mitchell CH, Ren D. 2007. CATSPER channel-Mediated Ca^{2+} Entry into Mouse Sperm Triggers a Tail-to-Head Propagation. *Biology of Rep.* 77: 551-559.

Zeng XH, Yang C, Kim ST, Lingle CJ, Xia XM. 2011. Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K^+ current in mouse spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 5879-5884.

Zhang Y, Tao J, Huang H, Ding G, Cheng Y, Sun W. 2007. Effects of celecoxib on voltage-gated calcium channel currents in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Pharmacol Res* 56: 267–274.