



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

SENSIBILIDAD DE LOS CANALES  
DE CALCIO DEPENDIENTES DEL  
VOLTAJE AL  $pH_i$  EN EL  
ESPERMATOZOIDE HUMANO  
CAPACITADO. EFECTO MODULADOR  
DEL AMP<sub>c</sub>.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

PALOMA DEL CARMEN NERI VIDAURRI

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO TULIO GONZÁLEZ MARTÍNEZ

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2007



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 se realizó bajo la dirección del Dr. Marco Tulio González Martínez en el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina. Ciudad Universitaria.

Y fue apoyada por el CONACyT (beca 193899)

El trabajo experimental y escrito fue avalado por el Comité Tutoral integrado por:

Dra. E. Martha Perez Armendáriz  
Dra. María del Carmen Beltrán Nuñez  
Dr. Marco Tulio González Martínez  
Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins  
Dr. Luis Manuel Montaña Ramirez.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi mas sincero agradecimiento al Dr. Marco Tulio por todas las consideraciones, infinita paciencia y asesoría para la realización de esta tesis.

Al M. en C. Victor Torres por toda la ayuda, consejos y asesoría técnica para la realización de la parte experimental.

Al Dr. Claudio Serviere por todas las facilidades, consideraciones, comprensión y apoyo para mi preparación y crecimiento académico.

A todos los miembros de mi Comité Tutorial por aceptar amablemente pertenecer a él, por su asesoría académica y consejos.

A MIS PAPÁS  
Por darme la vida y ser una guía ejemplar

A MI HERMANA CARITO  
Por que sin ella me vida no sería igual

A MI ESPOSO PEDRO  
Por volar conmigo

## CONTENIDO

INDICE GENERAL.....	I
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	III
LISTA DE ABREVIATURAS .....	V
RESUMEN.....	1
I INTRODUCCION.....	5
Hiperactivación de la movilidad.....	7
Capacitación espermática.....	8
Reacción acrosomal.....	9
Los CCDV en el espermatozoide de mamífero.....	12
II JUSTIFICACION.....	14
III OBJETIVOS.....	16
IV HIPOTESIS.....	16
V METODOLOGIA .....	17
1 Aislamiento de los espermatozoides, cargados con indicadores ópticos y capacitación.....	17
2 Determinación y calibración del calcio intracelular y determinación del potencial de membrana.....	18
3 Determinación y calibración del pHi.....	19
4 Determinación de la capacidad buffer de las células.....	21
5 Cuantificación de la motilidad del espermatozoide.....	21
6 Cuantificación del AMPc.....	21
7 Determinación del influjo de calcio dependiente de voltaje a diferente pHi.....	23
8 Análisis estadístico.....	23

VI RESULTADOS.....	24
1 Selección del detector de $\text{Ca}^{2+}$ apropiado para espermatozoides capacitados.....	24
2 Efecto del $\text{pHi}$ en el influjo de calcio a través de los CCDV en espermatozoides capacitados.....	25
3 Efecto de elevar el AMPc intracelular en los espermatozoides no capacitados sobre los CCDV y su sensibilidad a $\text{pHi}$ .....	30
3.1 Evaluación diferentes agentes que elevan el AMPc en la motilidad del espermatozoide.....	30
3.2 Determinación de AMPc en espermatozoides tratados con papaverina.....	36
3.3 Efecto de la papaverina en los CCDV.....	37
3.4 Efecto de la papaverina en la sensibilidad de los CCDV al $\text{pHi}$ .....	40
VII DISCUSION.....	43
VIII CONCLUSIONES.....	47
IX BIBLIOGRAFIA.....	49
ANEXOS	

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1. Proceso de formación del espermatozoide.....	6
Fig. 2. Principales eventos de transducción de señales durante la capacitación <i>in vitro</i> del espermatozoide de ratón.....	9
Fig. 3. Reacción acrosomal.....	10
Fig. 4. Mecanismos de movilización de calcio que se propone que dispara la ZP3 durante la reacción acrosomal en el espermatozoide de ratón.....	11
Fig. 5. Registro de calibración para $[Ca^{2+}]_i$ .....	19
Fig. 6. Calibración del registro de BCECF-AM para el pHi.....	20
Fig. 7. Curva estándar de AMPc.....	22
Fig. 8. Registros obtenidos con fura 2, fura-ff y mag fura.....	24
Fig. 9. Despolarización inducida por $NH_4Cl$ en el influjo de $Ca^{2+}$ en espermatozoides no capacitados (A) y capacitados (B).....	26
Fig. 10. Efecto de la alcalinización producida con $NH_4Cl$ en el pHi de muestras no capacitadas y capacitadas detectadas con BCECF-AM.....	27
Fig. 11. Capacidad buffer de las muestras no capacitadas y capacitadas durante la alcalinización del pHi con 2.5, 5 y 10 mM de $NH_4Cl$ .....	28
Fig. 12. Influjo de $Ca^{2+}$ dependiente de voltaje en función del pHi en espermatozoides no capacitados (A) y capacitados (B registro rojo).....	29
Fig. 13. Compuestos utilizados para elevar el AMPc.....	30
Fig. 14. Efecto de la papaverina y el H89 sobre la motilidad en espermatozoides no capacitados.....	35
Fig. 15. Efecto de 30 mM de KCl en el potencial de membrana en el espermatozoide humano incubado con papaverina (rojo) y sin tratamiento (negro) con la cianina $diSC_3(5)$ .....	38
Fig. 16. Efecto de la papaverina y el H89 en el influjo de $Ca^{2+}$ dependiente del voltaje en espermatozoides no capacitados.....	39
Fig. 17. Estadística de los experimentos mostrados en la figura 16.....	39
Fig. 18. El efecto del $NH_4Cl$ en el influjo de $Ca^{2+}$ dependiente del voltaje en espermatozoides no capacitados con AMPc aumentado por papaverina.....	40
Fig. 19. Efecto de la alcalinización en el pHi producida con $NH_4Cl$ de muestras de espermatozoides no capacitados con AMPc elevado por papaverina y comparación entre los espermatozoides no capacitados (azul) y capacitados (rojo).....	41
Fig. 20. Influjo de calcio dependiente del voltaje en función del pHi en espermatozoides no capacitados, capacitados y no capacitados incubados con papaverina cargados con fura-ff.....	42
Fig. 21. Modelo propuesto de la posible regulación de los CCDV en el espermatozoide humano por la papaverina.....	48



Tabla I. Concentraciones y tiempos monitoreados de los compuestos seleccionados.....	31
Tablas II. Determinación de la movilidad espermática en las condiciones indicadas de tiempo, concentración e inductores indicados.....	31-33
Tabla III. Concentración y tiempos monitoreados para observar el efecto del H89sobre la movilidad espermática.....	34
Tabla IV. Incubación de espermatozoides no capacitados con H89.....	34
Tabla V. La papaverina aumento la motilidad espermática con respecto al control y al incubarse junto al H89 esta disminuyó aún por debajo del control.....	34
Tabla VI. Cuantificación de AMPc.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACm	Adelinato ciclase membranal
ACs	Adenilato ciclase soluble
AM-AMPC	AMPC acetoxi-metilado
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosostato
BCECF-AM	Carboxietil-caboxifluoresceina acetoxi-metilado
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CatSper	Canal catiónico del espermatozoide
CCDV , Cav	Canal de calcio dependiente de voltaje
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio intracelular
db-AMPC	Dibutiril AMPC
disSC <sub>3</sub> (5)	Yoduro de diisopropiltiadicarbocianina
EGTA	Etilen glicol del ácido tetracético
EPAC	Proteínas de intercambio activadas por AMPC
ES	Error estándar
FA-AMPC	Conjugado de fosfatasa alcalina y AMPC
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
HCl	Acido clorhídrico
Hepes	Hidroxietilpiperazina etansulfónico
HSM-H	Méio para espermatozoides humanos amortiguado con hepes
IP3	Inositol trifosfato
IP3R	Receptor de IP3
KCl	Cloruro de potasio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
NaCl	Cloruro de sodio
Na-lactato	Lactato de sodio
Na-piruvato	Piruvato de sodio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monosódico
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH <sub>4</sub> Cl	Cloruro de amonio

pHi	pH intracelular
PKA	Cinasa A de proteína
PLC	Fosfolipasa C
PTI	Photon technology international
RA	Reacción acrosomal
SOCC	Canales operados por cisternas de Ca <sup>2+</sup>
TK	Cinasa de tirosina
ZP3	GlicoProteina 3 de la zona pelúcida
β	Capacidad amortiguadora
Δ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Influjo de calcio (calcio intracelular en el pico menos calcio intracelular basal)

## RESUMEN

Durante su camino por el tracto uterino hacia el ovocito, el espermatozoide lleva a cabo un aumento en la motilidad, hiperactivándola, se inicia la capacitación espermática que involucra la activación de la adenilato ciclasa, que forma el AMPc y activa en consecuencia la proteína cinasa A, (PKA, vía AC/AMPc/PKA), y por contacto con la ZP3 de la zona pelúcida del óvulo, se presenta la reacción acrosómica. Estos fenómenos requieren de mecanismos dependientes de transporte de calcio. El empleo de técnicas ópticas con fura 2 han permitido el estudio de los canales iónicos en espermatozoides con lo cual se han detectado la presencia de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV). Estos canales se estimulan durante la capacitación espermática y por la acción de la progesterona, además de que su actividad se incrementa con la alcalinización del pH<sub>i</sub>.

El mecanismo por el cual los CCDV aumentan su actividad podría ser por una estimulación del pH<sub>i</sub> que se presenta durante la capacitación, de ~6.7 a 6.81, o por estimulación de un regulador bioquímico que también aparece en la capacitación como el AMPc, PKA o la tirosina cinasa (TK). En un trabajo previo se observó que la alcalinización del pH<sub>i</sub> 6.7 a 6.81 era suficiente para producir sólo ~30% de la estimulación total de los canales observada en la capacitación.

El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto del AMPc sobre los CCDV y su sensibilidad al pH<sub>i</sub> en el espermatozoide humano capacitado. Para tal efecto, se utilizaron 2 enfoques experimentales: 1) el uso de espermatozoides no capacitados a los que se les elevó el AMPc *in vitro* y 2) espermatozoides capacitados que de por sí tienen el AMPc elevado respecto a los no capacitados.

Se trabajó con muestras de espermatozoides normospermicos no capacitados y capacitados cargados previamente con fura-ff (detector de calcio) o con BCECF (detector de pH<sub>i</sub>). El fura-ff se seleccionó por su rango de detección del orden micromolar. Para elevar el AMPc en espermatozoides no capacitados, se probaron diversos agentes químicos y se evaluaron siguiendo un ensayo biológico de motilidad, que se sabe es dependiente de AMPc y PKA, sensible al H89 (inhibidor de la PKA). El inhibidor de fosfodiesterasas, papaverina, resultó ser el agente más activo (0.5 mM incubados 5 minutos).

Bajo estas condiciones se cuantificó el AMPc y se encontró que la papaverina cuadruplicó los niveles en comparación con los espermatozoides no capacitados, en tanto que en los espermatozoides capacitados durante 4 horas el incremento de AMPc solo se duplicó.

En el espermatozoide no capacitado la papaverina estimuló la entrada de calcio a través de los CCDV a niveles muy similares que el capacitado y esta estimulación, al contrario del efecto sobre la motilidad, aumentó ligeramente con H89. La ausencia del efecto inhibitorio del H89 hace suponer que el AMPc estimuló a los CCDV por un mecanismo independiente de la activación de la PKA y que, por el contrario a lo inicialmente supuesto, la PKA inhibiría los CCDV.

La papaverina también incrementó el pHi a niveles parecidos al del espermatozoide capacitado, de manera independiente de H89, y aumentó los niveles de calcio intracelular, aunque a niveles más altos de los encontrados en el espermatozoide capacitado. Dado que los CCDV son sensibles al pHi se investigó la dependencia del pHi en estas células. Se encontró que la papaverina aumentó 3 veces la sensibilidad de los CCDV al pHi respecto a los espermatozoides no tratados. Interesantemente, en el espermatozoide capacitado, la sensibilidad de los CCDV al pHi aumentó aún más, alrededor de 7 veces. Esto sugirió que estos canales, además del pHi y el AMPc, se modulan por otro(s) efector(es) bioquímico(s) que aparecen durante la capacitación. Además, se encontró que la capacidad amortiguadora de las células disminuye tanto en los espermatozoides capacitados como en los no capacitados tratados con papaverina.

Concluimos que los CCDV en el espermatozoide humano son sensibles a efectores asociados a la capacitación como el pHi y el AMPc, favoreciendo la permeación a calcio. Cabe señalar que este mecanismo regulatorio puede ser importante ya que podría explicar el hecho de que solo los espermatozoides capacitados, que entran en contacto con la zona pelúcida del óvulo, presentan reacción acrosomal, evento en el que los CCDV juegan un papel central como mecanismo de entrada de calcio.

## **SUMMARY**

During their journey through the uterine tract, mammalian sperm undergo a series of processes that are absolutely required for egg fertilization: an increase in the motility named “hyperactivation”, the so called sperm capacitation, that involves the activation of the AC/cAMP/PKA pathway, and the acrosome reaction induced by egg-zona pellucida glycoprotein ZP3. These phenomena require the activation of calcium transport mechanisms which result in intracellular calcium increase; among them, voltage-dependent calcium channels (VDCC) have been involved as calcium entry mechanism. The use of optical techniques with calcium-sensitive fluorophores such as fura 2 have allowed the study of VDCC in live sperm populations via the increase in the intracellular calcium induced by depolarization with potassium in sperm incubated with the potassium ionophore valinomycin. These channels are highly regulated: they are stimulated during the sperm capacitation, by the steroid hormone released by granulosa cells, progesterone, and by pHi alkalization.

The mechanism by which VDCC are stimulated during capacitation has been studied. The channels could be stimulated either by pHi, that increases from 6.7 to 6.84 pHi units during capacitation, or by other biochemical effectors, also triggered during capacitation, such as the outstanding cAMP-PKA pathway, or by the tyrosine kinase pathway. In a previous work, it was observed that the alkalization of the pHi of 6.7 to 6.84 was enough to elicit only ~30% of the total stimulation of the channels observed during capacitation. This finding indicated that whereas the pHi alkalization importantly contributed to VDCC stimulation, other biochemical parameter should contribute to explain the whole stimulation observed during capacitation.

The objective of this work was to investigate the effect of AMPc on VDCC and their sensibility to pHi in human capacitated sperm. For this purpose, two experimental approaches were considered: 1) the induction of cAMP increase in non capacitated sperm and 2) the use of capacitated sperm which naturally produce increased levels of cAMP as compared with non capacitated cells.

We used samples of non-capacitated human sperm (provided by wealthy donors) loaded with fura ff or with BCECF (a pHi detector). The fura ff was selected by its appropriate range of detection, of the micromolar order.

To increase the intracellular AMPc content in non-capacitated sperm, different chemicals were tested (cyclase stimulators: bicarbonate and forskolin; phosphodiesterase inhibitors: papaverine and pentoxifylline, cAMP analogs: dibutyryl-cAMP and cAMP-AM) and the cAMP production was qualitatively assessed following a biological test of motility, a sperm function that is stimulated by the cAMP-PKA via. Among these reagents, papaverine had the highest activity, also displayed in the shortest time of incubation (0.5 mm incubated 5 minutes). Under these conditions cAMP was quantified, the cAMP content increased 4-fold as compared with non-capacitated sperm; in sperm capacitated for 4 hours, the cAMP content increased 2-fold.

In non-capacitated sperm papaverine incubation stimulated calcium influx through VDCC at similar extent than capacitated cells. Unexpectedly, unlike the effect observed on motility, the stimulated calcium increase was not inhibited but slightly overstimulated by the PKA inhibitor H89. The absence of the inhibitory effect of H89 indicated that the VDCC were stimulated by cAMP through a mechanism independent of PKA activation. Papaverine also increased the resting pHi, and decreased their buffer capacity, at levels similar to those found in capacitated sperm, and it increased the levels of intracellular calcium at resting, a phenomenon that has also been observed in capacitated sperm. Interestingly, the effects of papaverine on resting intracellular calcium and resting pHi were also insensitive to the pKA inhibitor H89.

Since VDCC is sensitive to pHi, the dependence of the pHi was investigated in papaverine-treated non capacitated sperm. It was found that papaverine increased 3-fold the pHi- sensibility of VDCC. Interestingly, in capacitated sperm, the sensibility of VDCC to pHi increased even more, around 7-fold. This finding suggested that these channels, besides the pHi and cAMP, are modulated by other(s) biochemical regulator(s) that appear during the capacitation.

We conclude that human sperm VDCC are sensitive to regulators associated to sperm capacitation, that is, the pHi alkalization and AMPc content, favoring the calcium influx. This phenomena may be physiologically relevant since only capacitated sperm is capable to undergo the acrosome reaction induced by ZP3, an exocytic event that require the activation of VDCC as a major mechanism of calcium entry.

## I INTRODUCCION

La aparición de la reproducción sexual causó una enorme ventaja adaptativa y evolutiva en los seres vivos, los cuales adquirieron características genéticas heredadas de sus progenitores para adaptarse con mayor facilidad al medio ambiente. Este proceso biológico requirió la fusión de una célula germinal madura femenina y una masculina: el óvulo y el espermatozoide. Ambos gametos se desarrollan por meiosis, un proceso biológico que genera, a partir de una célula diploide, cuatro células haploides con características genéticas diferentes a la que les dio origen debido a la recombinación genética de los cromosomas homólogos. Este proceso se denomina ovogénesis en el caso de la generación del gameto femenino y espermatogénesis en el caso del gameto masculino (Yanagimachi and Usui, 1994).

En los mamíferos la producción de espermatozoides se lleva a cabo en los túbulos seminíferos que contienen una gran cantidad de espermatogonias y células de Sertoli, las cuales responden a la hormona folículo estimulante (FSH por sus siglas en inglés) para producir proteínas de unión a andrógenos (ABP, por sus siglas en inglés) las cuales unen andrógenos intra-testiculares, principalmente testosterona secretada por las células de Leydig, por influencia de la hormona luteinizante y así facilitar sus efectos directos en la diferenciación y maduración de las espermatogonias e iniciar la espermatogénesis. Durante este proceso, una espermatogonia lleva a cabo una serie de cambios morfológicos y de reorganización de sus organelos para formar un espermatozoide maduro, el cual consta de tres partes: la cabeza formada por el acrosoma, el núcleo (con el material genético altamente compactado) y los componentes del citoesqueleto; la pieza intermedia formada por el centriolo y mitocondrias organizadas de manera espiral; y el flagelo formado por el axonema. Dicho proceso culmina con el desarrollo de un espermatozoide con forma hidrodinámica, genéticamente y morfológicamente maduro (Figura 1) (Yanagimachi and Usui, 1994). Posteriormente los espermatozoides son liberados a la red de testis donde confluyen hacia el conducto eferente para pasar al epidídimo, sitio en el que llevarán a cabo diversas modificaciones: 1) a nivel anatómico pérdida en su gran mayoría de la gota citoplasmática, 2) a nivel bioquímico el empaquetamiento de enzimas acrosomales, el intercambio de histonas a protaminas y la remoción parcial de



colesterol de sus membranas y 3) a nivel funcional adquieren un patrón de motilidad eficiente que en estudios *in vitro* han demostrado que espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo (sitio de almacenamiento) son capaces de llevar a cabo la fecundación.

Al momento de la eyaculación los espermatozoides entran en contacto con secreciones de las glándulas sexuales accesorias, que en su conjunto conforman el líquido seminal para ser depositado en el tracto genital femenino (Bedford, 1975; Robaire y Hermo, 1988).

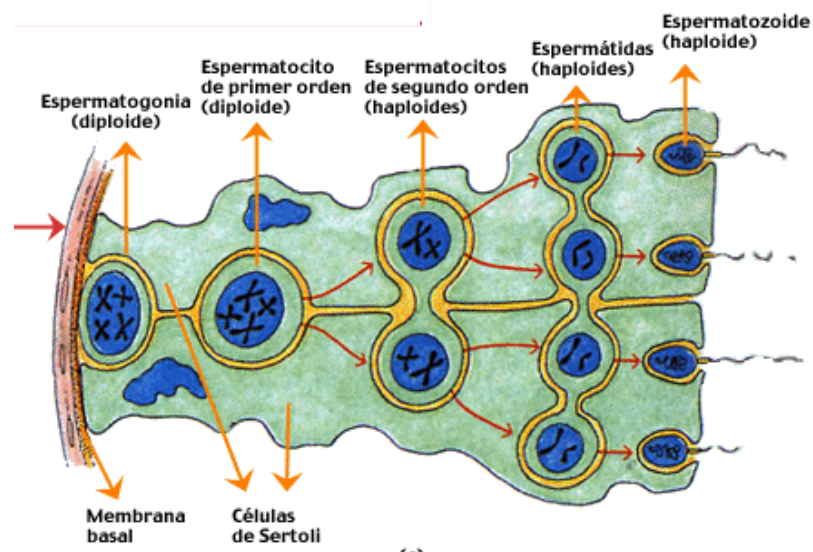


Fig. 1. Proceso de formación del espermatozoide. Este proceso ocurre en el epitelio de los túbulos seminíferos en donde a partir de una espermatozoona, se llevan simultáneamente cambios morfológicos y rearrreglos en sus organelos y material genético.

En este momento el espermatozoide, depositado en el tracto genital femenino, debe pasar por tres procesos fundamentales que se requieren para que pueda fecundar el óvulo: la hiperactivación de la movilidad, la capacitación espermática y la reacción acrosomal. En todos estos procesos está involucrado el transporte de calcio, cuyo estudio, en lo relativo a los CCDV, es motivo principal de la presente tesis. A continuación se describe brevemente cada uno de estos procesos.

### **Hiperactivación de la movilidad.**

Los espermatozoides son células altamente especializadas que tienen como principal objetivo la fecundación de un óvulo, para lo cual requieren ser móviles. El espermatozoide de mamífero muestra 2 formas de movilidad: activación e hiperactivación e inherente a estas funciones está la importante participación del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Antes de ser eyaculados, los espermatozoides de mamífero inician su movilidad en el epidídimo donde adquieren un patrón de movimiento flagelar muy débil y solamente el 60% son activos. Cuando son depositados en el tracto genital femenino adquieren un tipo de movilidad más simétrico, proceso conocido como activación (Darszon, *et al*, 2005). Este proceso está modulado por la presencia de electrolitos disueltos ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}$ ,  $\text{Cu}$  y  $\text{Fe}$ ) y elementos de bajo peso molecular como glucosa, maltosa, manosa, lípidos, AMPc, glicógeno, aminoácidos libres y proteínas séricas como la albúmina contenidos en el moco cervical, y la composición del ambiente del útero rico en  $\text{Ca}^{2+}$  y progesterona con lo cual la membrana del espermatozoide lleva a cabo cambios dinámicos como la remoción de colesterol y el incremento de la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando con ello su movilidad (De Jonge, 2005).

Con el tiempo (en horas) se desarrolla la hiperactivación, esto es, los espermatozoides alcanzan un movimiento flagelar vigoroso y comienzan un desplazamiento más efectivo que evita que queden atrapados en las criptas uterinas, impidiendo la adhesión con las células del epitelio uterino. Además, la hiperactivación les confiere la capacidad de penetrar por las células de la granulosa y corona radiada que rodean al ovocito (Mortimer, *et al*, 1998).

La hiperactivación se caracteriza por el desarrollo de movimientos flagelares amplios, que en medios de cultivo no viscosos, nadan “en figura de ocho”. Esta forma de 8 se torna en un movimiento rectilíneo y vigoroso en medios viscosos, como el del fluido folicular (Jin, *et al*, 2007). Para su iniciación y mantenimiento se requiere de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que regula directamente los componentes del axonema del flagelo del espermatozoide (Darszon, *et al*, 2006).

El mecanismo de hiperactivación requiere de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e involucra la participación de CCDV atípicos, denominados *Catsper1* y *Catsper2*, que están presentes a lo largo del flagelo de los espermatozoides de ratón (Carlson, *et al*, 2003; Quill, *et al*, 2001). La importancia de la hiperactivación es tal, que los ratones “knock out” para el gen del *Catsper*, aun cuando generan espermatozoides en forma normal y son capaces de tener reacción acrosomal son incapaces de hiperactivarse, imposibilitando a los espermatozoides para llegar al ovocito, volviendo a los ratones machos infértiles.

### **Capacitación espermática**

Aunado a la hiperactivación de la movilidad, los espermatozoides entran en un proceso llamado “capacitación”, que operacionalmente significa adquisición de la capacidad para fecundar al óvulo. La capacitación es un proceso lento, de unas 3 horas en el espermatozoide humano (dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y esta relacionada con cambios bioquímicos complejos. (De Jonge, 2005; Baldi, 2000). La capacitación puede reproducirse “*in vitro*” en medios fisiológicos que contengan  $\text{HCO}_3^-$ , albúmina y un pH ligeramente alcalino.

En un paso al parecer inicial, la capacitación involucra un incremento en la fluidez de la membrana celular originada por la extrusión de colesterol, favorecida por proteínas como la albúmina, que unen este lípido, y que da lugar a un aumento en el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  al interior de la célula. El  $\text{HCO}_3^-$  activa una adenilato ciclasa soluble (ACs), también dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Litvin, *et al*, 2003) y consecuentemente, se produce AMPc a partir de ATP, que a su vez activa a la PKA. La actividad de la PKA resulta en la fosforilación de proteínas y en la activación de una cinasa de tirosina. Esta ruta bioquímica parece ser esencial en la capacitación ya que la genisteína y el H89, inhibidores de las actividades de TK y PKA, respectivamente, bloquean la capacitación del espermatozoide humano (Bajpai and Doncel, 2003). Asimismo, destaca un ligero aumento en la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), de alrededor de 80 nM, y una ligera alcalinización del  $\text{pH}_i$ , de alrededor de  $\text{pH}_i$  6.7 a  $\text{pH}_i$  6.85. El esquema de la figura 2 muestra la activación de canales de  $\text{K}^+$  que producen hiperpolarización de la membrana, un efecto que se ha demostrado en el espermatozoide de ratón.

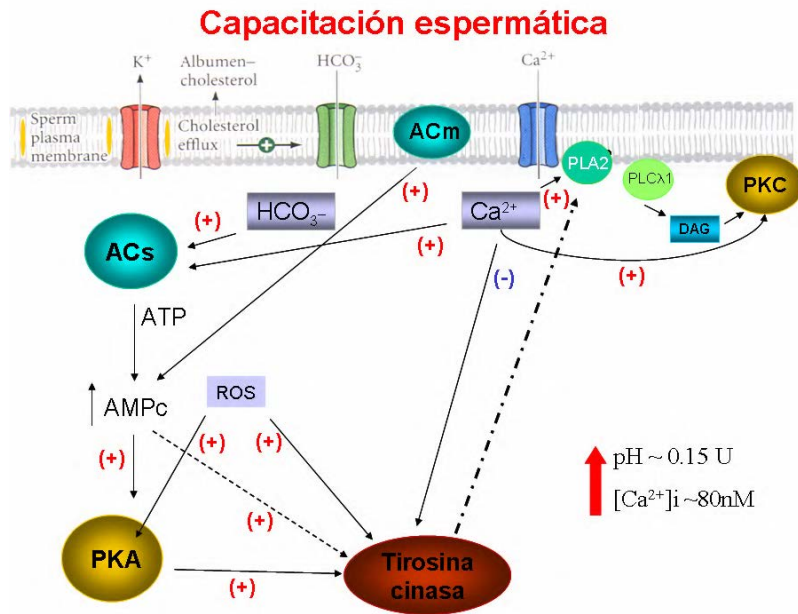


Fig. 2. Principales eventos de transducción de señales durante la capacitación *in vitro* del espermatozoide de ratón (Modificado de Baldi, 1996).

El disparo de otros efectores como la vía de la cinasa C de proteína (PKC, por sus siglas en inglés) la fosfolipasa A2 (PLA2, por sus siglas en inglés) y las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) también se han involucrado en el disparo de la capacitación (revisado por Baldi, 1996).

### Reacción acrosomal

Una vez capacitado, el espermatozoide es susceptible de presentar reacción acrosomal (RA) inducida fisiológicamente, ya sea por la ZP3, una glicoproteína de la ZP que rodea al ovocito, y por la progesterona, una hormona esteroide presente en el líquido folicular producida por las células de la granulosa que acompañan al ovocito (Baldi, *et al*, 1996; González-Martínez, *et al*, 2002)

La RA se dispara por un influjo de  $Ca^{2+}$  ( $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ) que incrementa el calcio intracelular y hace que se fusionen la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide con la membrana acrosómica externa, próxima a ella (figura 3). El proceso de fusión parece involucrar la activación de proteínas de intercambio de nucleótidos dependiente de AMPc, una ruta metabólica que no utiliza a la PKA (Branham, *et al*, 2006).

La RA propiamente dicha ocasiona una exocitosis de enzimas hidrolíticas del acrosoma que ayudan al espermatozoide a atravesar la ZP del óvulo. Asimismo, queda expuesta la membrana acrosómica interna del espermatozoide, que en el segmento localizado en la parte ecuatorial de la cabeza, permite la fusión con la membrana plasmática del óvulo, todo esto como un paso inicial en la fecundación propiamente dicha (Baldi, *et al*, 1996).

El mecanismo por el cual la ZP3 induce la RA no está completamente dilucidado. La figura 4 muestra un esquema hipotético de la secuencia de eventos que resultan en un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular, requerido para disparar la RA. La ZP3 induciría dos eventos en paralelo, uno rápido (decenas de milisegundos) que consistente en la activación de una conductancia que produciría una despolarización de la membrana. Este paso, aún no identificado, abriría CCDV tipo T produciendo una elevación transitoria en el  $[Ca^{2+}]_i$ . Paralelamente la ZP3 se uniría a un receptor acoplado a proteína Gq, produciendo IP3. El IP3, junto el  $Ca^{2+}$  elevado, producto de la activación del canal T, actuaría en receptores presentes en el acrosoma, vaciando su contenido de  $Ca^{2+}$  (Baldi, *et al*, 1996; O'Toole, *et al*, 2000) y, consecuentemente, se activarían los canales de calcio activados por vaciamiento de poza interna (SOC, "store-operated channel) produciendo una entrada secundaria y sostenida de  $Ca^{2+}$  intracelular (figura 4).

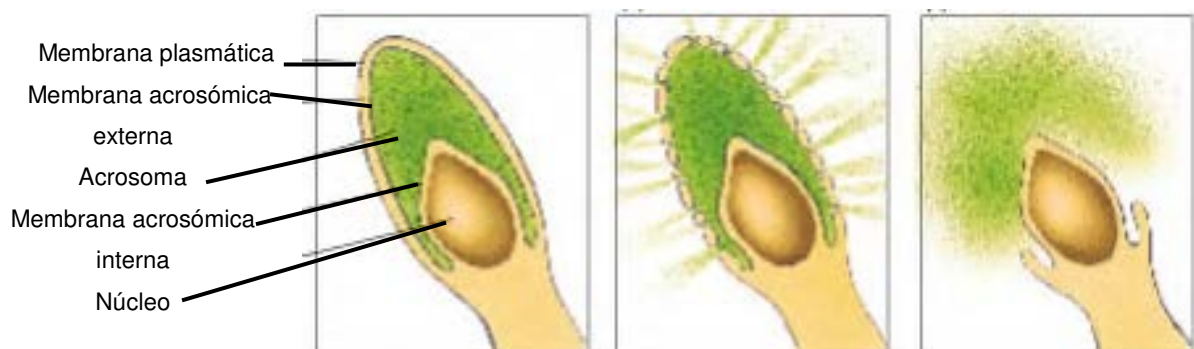


Fig. 3. Reacción acrosomal. El influjo de iones de  $Ca^{2+}$  causa que la membrana acrosomal externa se fusione con la membrana plasmática produciendo la exocitosis de las enzimas hidrolíticas del acrosoma y exponiendo a la membrana acrosomal interna para que interactúe con la membrana del ovocito

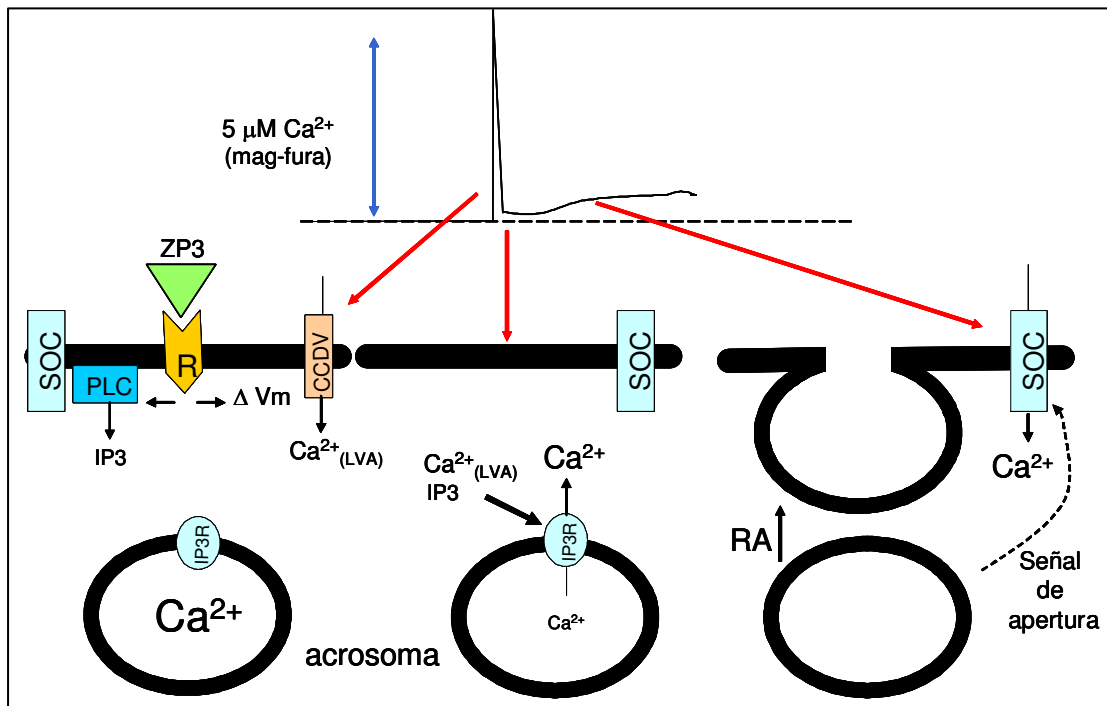


Fig. 4. Modelo de los mecanismos de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  que se propone dispara la ZP3 durante la RA en el espermatozoide de ratón. La ZP3 produce un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$ , por dos eventos en paralelo, uno rápido que activa un receptor que produce una despolarización de la membrana ( $\Delta V_m$ ) el cual abre los CCDV tipo T ( $\text{Ca}^{2+}_{LVA}$ ) produciendo una elevación transitoria en el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Al mismo tiempo la ZP3 se une a un receptor acoplado a proteína Gq, vía PLC produciendo IP3. El IP3, junto con el  $\text{Ca}^{2+}$  elevado producto de la activación del canal T, activa los receptores a IP3 (IP3R) presentes en la membrana del acrosoma, vaciando su contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol. Consecuentemente, se activan los canales SOC en la membrana plasmática produciendo una entrada secundaria y sostenida de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular llevando a cabo la RA (Modificado de O'Toole, *et al*, 2000)

Es evidente que la movilidad, la capacitación y la RA son procesos complejos que requieren un entendimiento íntegro de los mecanismos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  y de cómo se regulan. Dentro de estos procesos, como se comenta anteriormente, destacan los CCDV. Es importante resaltar que este tipo de canales se requieren para la hiperactivación de la motilidad (Catsper1) y para el disparo de la RA (canales tipo T). Además, durante la capacitación se presenta un aumento en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular basal que podría involucrar a estos canales.

### **Los CCDV en el espermatozoide de mamífero.**

Debido al tamaño y forma de los espermatozoides maduros es muy difícil el empleo de técnicas electrofisiológicas para estudiar los CCDV. Alternativamente, se han utilizado células espermátogénicas de roedores que por su forma y tamaño si son susceptibles de ser analizadas con la técnica de "patch clamp". Estos estudios reportaron, exclusivamente, la presencia de CCDV-LVA (tipo T) (Santi, *et al*, 1996; Darszon, *et al*, 1999, Florman, *et al*, 1998). Estos canales se activan a  $\geq -60$  mV y se caracterizan por ser insensibles a dihidropiridinas pero sensibles a níquel, mibefradil y amilorida. El hecho de que la RA inducida con ZP sea sensible a estos bloqueadores y que se haya inmunolocalizado este canal en la cabeza y flagelo del espermatozoide, ha contribuido al mecanismo de acción propuesto en la figura 4. (O'Toole, *et al*, 2000).

Recientemente Kirichok y cols. desarrollaron un método directo para el registro iónico en espermatozoides, usando la técnica de patch-clamp en la gota citoplasmática de espermatozoides de ratón para la detección y el registro de la actividad del canal (Kirichok, *et al*, 2006). Aún cuando estos espermatozoides no están maduros, detectaron las corrientes de Catsper, esto es, canales de calcio débilmente dependientes de voltaje localizados exclusivamente en el flagelo del espermatozoide. Estos canales permiten el paso de grandes corrientes monovalentes en ausencia de calcio (que de hecho permitieron identificarlos) que se estimulan por alcalinización del pH. Interesantemente, no detectaron los CCDV tipo T. Cabe recordar que Catsper es un CCDV atípico que se requiere para la hiperactivación de la motilidad y su ausencia, en ratones "knock-out" para el gen que codifica para dicho canal, produce ratones machos estériles, precisamente por su falta de hiperactivación, ya que la capacitación y RA son normales (Ren, *et al*, 2001).

Alternativamente a los métodos electrofisiológicos, ha sido posible detectar indirectamente CCDV en poblaciones de espermatozoides vivos y maduros usando técnicas ópticas fluorescentes que permiten detectar  $Ca^{2+}$  (como ejemplo el fura 2) y potencial de membrana (con tiodicarbocianina) (Linares-Hernández, *et al*, 1998).

Estos canales se han detectado funcionalmente mostrando un incremento en el  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a la despolarización inducida con KCl, en presencia de valinomicina, un ionóforo de  $K^+$ . La presencia de este ionóforo es fundamental en este método ya que por una parte lleva el potencial de membrana al potencial de equilibrio del  $K^+$  (potencial de Nernst) pudiendo con ello cuantificar y modificar (con  $K^+$  externo) el potencial en estas células. Además la valinomicina remueve la inactivación de los CCDV ya que el ionóforo lleva el potencial de  $-40$  mV, presente en medio normal, a  $-71$  mV. A este potencial los CCDV están cerrados (estado desactivado) y son susceptibles de ser abiertos por despolarización.

Los CCDV que se detectan por el incremento en la despolarización con potasio se activan en segundos, son insensibles a dihidropiridinas pero se bloquean por el níquel, y se inactivan en  $\sim 90$  seg en medio sin  $Ca^{2+}$ . Dadas las características farmacológicas y cinéticas existe la posibilidad de que la señal involucre principalmente al *Catsper*, sin embargo, no descartamos que de manera minoritaria (dada su rápida inactivación) el canal T contribuya también a esta señal.

El papel fisiológico de este canal es motivo de investigación en el laboratorio. En este sentido, se ha encontrado que la permeabilidad al  $Ca^{2+}$  de los CCDV incrementa notablemente durante la capacitación (que en el espermatozoide humano se lleva unas 4 horas) y por la acción de la progesterona (González-Martínez, *et al*, 2002). Esto ha llevado a la hipótesis de que la capacitación y esta hormona afectan al canal de tal manera que aumenta varias veces su probabilidad de apertura. Desde el punto de vista fisiológico esta modulación sería relevante, ya que se ha propuesto que la ZP3 moviliza inicialmente el  $Ca^{2+}$  vía una apertura de CCDV activándolos (figura 4). Así, los espermatozoides capacitados y expuestos a la progesterona, que se libera de las células de la granulosa y consecuentemente está presente en el fluido folicular, llegarían a la zona pelúcida provistos de CCDV con una capacidad de permeación notablemente potenciada, asegurando así la rápida inducción de la RA y una exitosa fecundación (Guzmán-Grenfell and González-Martínez, 2004).



## II JUSTIFICACIÓN

Por lo dicho anteriormente creemos que la estimulación del potencial de apertura de los CCDV en los espermatozoides, que se presenta durante la capacitación y por acción de la progesterona (presente en el fluido folicular) es fisiológicamente relevante. Ante la baja ocurrencia de síntesis de proteínas en los espermatozoides maduros, proponemos que los CCDV se regulan bioquímicamente a través de las múltiples vías metabólicas que se disparan durante la capacitación.

La vía principal y más conocida consiste en la activación de una adenilato ciclasa dependiente de  $\text{HCO}_3^-$ , que eleva los niveles de AMPc con la consecuente activación de una PKA y de la cinasa de tirosina. Estos pasos bioquímicos son esenciales en la capacitación y podrían modular los CCDV.

Otro modulador potencialmente importante que se presenta durante la capacitación es el pHi. Durante la capacitación el pHi se eleva de 6.7 a 6.85 (Cross and Razy-Faulkner, 1997). Recientemente en el laboratorio se encontró que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje en el espermatozoide no capacitado depende del pHi, con un valor de pKa aparente de cerca de 7.0, y otro componente a un valor de pKa más alcalino (Fraire-Zamora and González-Martínez, 2004). El influjo aumenta 6 veces en el rango de 6.5 a 7.1; interesantemente en el rango en el que se presenta la alcalinización durante la capacitación, esto es de 6.7 a 6.85 y la estimulación de los CCDV alcanza un ~30 % de la estimulación total observada durante este proceso. (Fraire-Zamora and González-Martínez, 2004). Esto sugiere, que además de la alcalinización del pHi, existen otros reguladores bioquímicos que se activan durante la capacitación que modifican a los canales incrementando aun más la permeación del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Con base en estos hallazgos el planteamiento del presente trabajo es estudiar si el aumento del AMPc afecta los CCDV directamente o alteran (aumentan) su sensibilidad al pHi. En este sentido, nos proponemos básicamente dos enfoques; 1) estudiar este efecto por dos vías: estudiar el efecto del pHi en espermatozoides capacitados, donde sabemos que el AMPc está elevado, y 2) estudiar el efecto de aumentar el AMPc en espermatozoides no capacitados y examinar su sensibilidad a pHi.

Es importante notar que en el espermatozoide capacitado la permeación de  $\text{Ca}^{2+}$  se eleva a valores cercanos a la saturación del indicador óptico fluorescente utilizado en el laboratorio, fura 2. Ante la expectativa de encontrar valores de estimulación muy altos, por ejemplo, en espermatozoides capacitados y alcalinizados, planteamos en este trabajo el uso de indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  con una  $K_d$  más alta, como el fura-2FF ( $K_d$  en el rango de unidades de micromolar), o el mag fura ( $K_d$  en el rango de decenas de micromolar).

### III OBJETIVOS.

1. Estudiar el efecto del pHi sobre el influjo de los CCDV en espermatozoides capacitados.
  - Seleccionar el detector de  $\text{Ca}^{2+}$  apropiado para espermatozoides capacitados: mag fura, fura ff y compararlo con el fura 2.
  - Determinar el efecto del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en el pHi en espermatozoides capacitados.
  - Determinar la capacidad amortiguadora ( $\beta$ ) en espermatozoides capacitados.
  - Determinar el efecto del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por despolarización en espermatozoides capacitados.
  
2. Estudiar el efecto de elevar el AMPc sobre el influjo de los CCDV en espermatozoides humanos no capacitados y ver si se afecta la sensibilidad de éstos canales al pHi.
  - Elevar el AMPc intracelular con pentoxifilina, forskolin, AM-AMPc,  $\text{HCO}_3^-$ , db-AMPc o papaverina. Seleccionar el más efectivo en base a su efecto en la movilidad.
  - Estudiar el efecto de H89 (inhibidor de PKA).
  - Cuantificar el AMPc intracelular en estas condiciones.
  - Determinar el efecto del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides no capacitados con AMPc elevado.
  - Determinar el efecto del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en el pHi en espermatozoides no capacitados con AMPc elevado.

### IV HIPÓTESIS.

1. En el espermatozoide humano no capacitado el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente del voltaje, estimulado por el pHi, aumentaría con un AMPc intracelular elevado. El AMPc por si mismo podría estimular la permeación del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales.
2. En el espermatozoide humano capacitado (donde el AMPc esta elevado) el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente del voltaje podría ser más sensible al pHi comparado con el espermatozoide no capacitado.

## **V METODOLOGÍA.**

### **1 Aislamiento de los espermatozoides, cargados con indicadores ópticos y capacitación.**

Se utilizó semen humano obtenido de donadores sanos (entre 18 y 25 años de edad). Una vez colectada la muestra, se incubó 30 min a 36°C para permitir su licuefacción y reducir la viscosidad. Las muestras fueron seleccionadas según los valores referidos en el manual de laboratorio de la Organización mundial de la Salud (OMS, 2001).

Los espermatozoides se separaron del plasma seminal por centrifugación en un gradiente discontinuo de percoll isotónico a 75% y 50% (ambos gradientes amortiguados a pH 7.4 con hepes 10 mM y NaCl 150 mM) 20 min a 300g en tubos cónicos de 12 ml. A continuación la pastilla obtenida (espermatozoides) en la parte cónica fue separada y lavada también por centrifugación 10 min a 300g. Los espermatozoides se lavaron con medio HSM-H, cuya composición es: NaCl 117.5 mM, KCl 8.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.49 mM, Na-Piruvato 0.3 mM, Na-lactato 25 mM y hepes 25 mM, ajustado a pH 7.6 con NaOH

Una vez obtenidos, los espermatozoides se resuspendieron en 1 ml de medio HSM-H y se incubaron 40 min a 36°C con 5 µM de los indicadores ópticos acetoximetilados, esto es, con fura 2-AM, mag fura-AM o fura-ff (Invitrogen, Molecular Probes). Para la determinación del pHi, los espermatozoides se cargaron con 1 µM de BCECF-AM (Invitrogen, Molecular Probes) seguido de la adición del indicador de Ca<sup>2+</sup>, excepto que el tiempo de incubación, fue de 30 minutos. Posteriormente las muestras se lavaron con medio HSM-H por centrifugación a 300g durante 5 minutos para eliminar el excedente del colorante no incorporado. Estas células se procesaron de manera diferente, de acuerdo al planteamiento experimental indicado.

Para capacitar los espermatozoides cargados con fura-ff se incubaron 4 horas a 36°C en 25 ml medio HSM-H modificado para capacitación a una concentración aproximada de 3-5 millones de células/ml. Este medio se preparó igual que el HSM-H pero con hepes 15 mM y se suplementó con 25 mM NaHCO<sub>3</sub> y 3 mg/ml de albúmina sérica bovina a pH 7.6.

Alternativamente, para la determinación del pHi en espermatozoides capacitados, la incubación se realizó en células no cargadas con BCECF-AM. En este caso, las células se cargaron 30 minutos antes de concluir la incubación de 4 horas.

## **2 Determinación y calibración del Ca<sup>2+</sup> intracelular y determinación del potencial de membrana**

Los registros de fluorescencia se hicieron en un espectrofluorómetro PTI. Una vez cargadas con el indicador óptico, las células, sujetas a diversos tratamientos, fueron centrifugadas y el botón celular se añadió a la celda de fluorescencia, con 2.5 ml de medio HSM-H suplementado con 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, con agitación magnética continua y termostatizada a 36°C. La fluorescencia se detectó con un filtro de 488 nm y se excitó alternadamente a 340 y 380 nm con el monocromador de PTI.

Los registros de Ca<sup>2+</sup> se calibraron añadiendo 1 µM de ionomicina, que permeabiliza la célula a Ca<sup>2+</sup> y satura el fura, con lo que se obtuvo la relación 340/380 nm máxima (Rmax) y posteriormente se queló el Ca<sup>2+</sup> con 3.5 mM EGTA + 1 % Tritón X-100 para obtener la relación 340/380 nm sin Ca<sup>2+</sup> (Rmin). Los valores de R a lo largo del registro, se convirtieron a valores de Ca<sup>2+</sup> intracelular con la ecuación descrita por Grynkiewicz (Grynkiewicz, *et al*, 1985):

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

en donde  $\beta = (F_{f380}/F_{b380})$ , esto es, la relación de fluorescencias detectadas excitando a 380 nm en medio sin Ca<sup>2+</sup> (EGTA-tritón) y con Ca<sup>2+</sup> (ionomicina), respectivamente (figura 5). La Kd que es la constante de disociación, para el fura ff es 5.5 µM (González-Martínez, 2002), para el fura-2 de 260 nm (Grynkiewicz, *et al*, 1985) y para el mag fura de 50 µM (Martínez-Zaguilán, *et al*, 1998).

En algunos trazos se determinó, simultáneamente al Ca<sup>2+</sup> intracelular, el potencial de membrana con el detector fluorescente diSC<sub>3</sub>(5) de acuerdo al procedimiento de Linares-Hernández (1998).

Se añadieron células cargadas con fura-ff a la celda de fluorescencia (fluorómetro pTI) con 2.5 ml de medio HSM-H + 0.5  $\mu$ M de diSC3(5) a 36°C y bajo agitación magnética. Después de 4 minutos de equilibrio con la cianina, se agregaron aditivos.

La fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se midió y calibró como se describe en el párrafo anterior; la fluorescencia de cianina se determinó con un filtro de 670 nm y se excitó con un filtro de 600 nm, irradiando con una lámpara adicional de haluro (colocada en línea recta a la fuente de xenón del equipo de PTI).

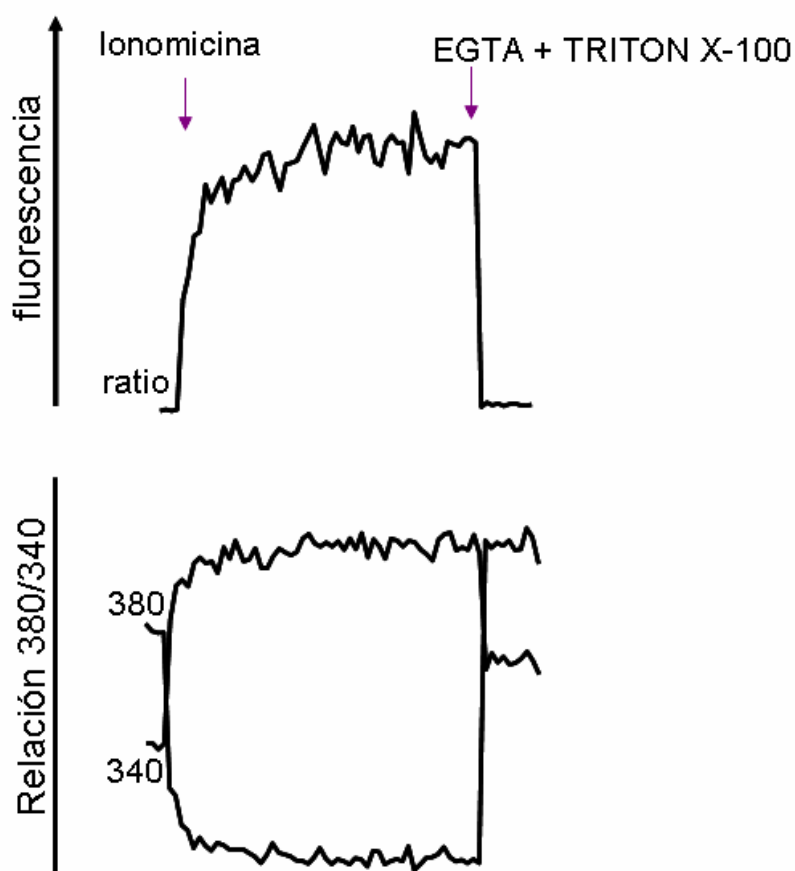


Fig. 5. Registro de calibración para  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

### 3 Determinación y calibración del pHi

Las células cargadas con BCECF-AM se centrifugaron y añadieron a la celda de fluorescencia, tal y como se describe en el procedimiento para la detección de  $\text{Ca}^{2+}$ . La fluorescencia se detectó a 550 nm, excitando alternadamente a 500 nm (longitud de onda sensible a pH) y a 440 nm (longitud de onda insensible al pH).

Para calibrar la señal, se permeabilizaron las células con 0.1 % Tritón X-10. Esta permeabilización aumentó el valor de R (fluorescencia a 550 nm y su excitación a 500 nm dividida entre 440 nm: 500/440) a un valor correspondiente al pH de el medio HSM-H, esto es pH 7.6 (figura 6a y 6b).

Posteriormente se acidificó a tres valores diferentes mediante adiciones de 10  $\mu$ l HCl al 15% (figuras 6a y 6b) y se compararon los valores de R con los pH medidos con un electrodo normal de pH en cada administración (figura 6c). Consistentemente los valores de R en función del pH muestran una curva sigmoide (figura 6d). Los datos obtenidos se analizaron con el software del PTI para convertir los valores de R a valores de pHi.

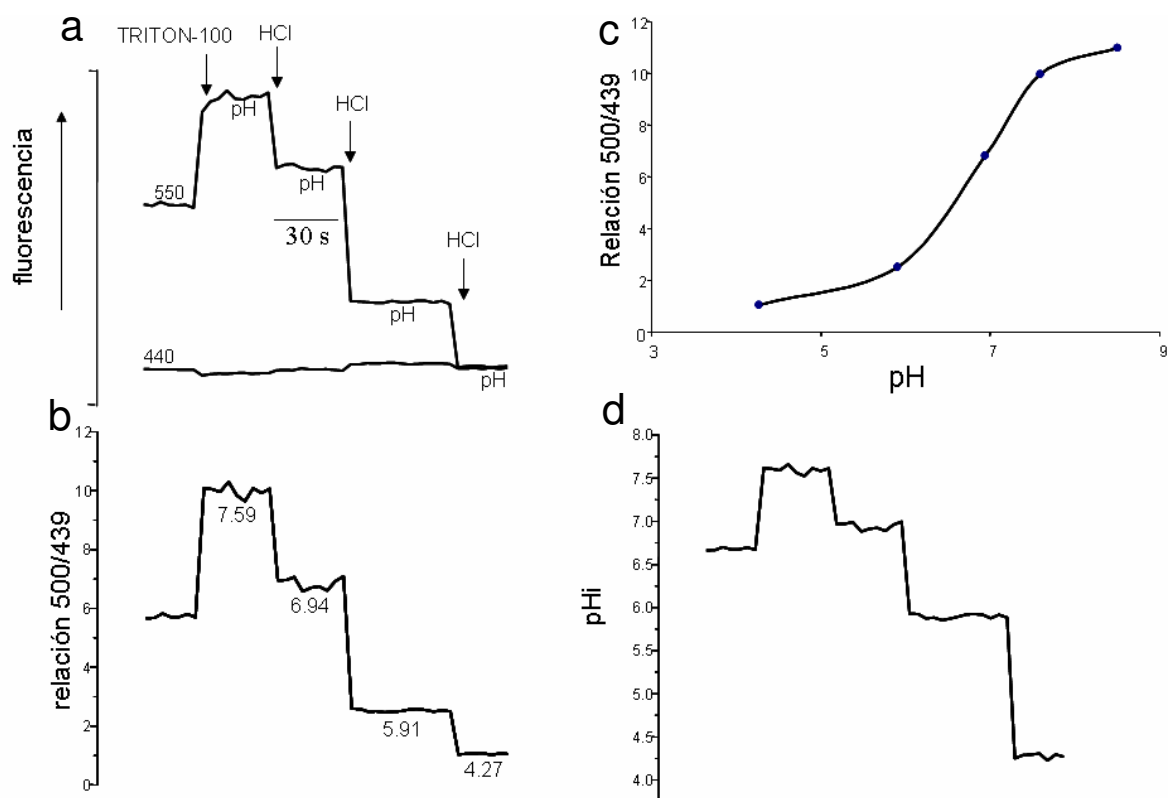


Fig. 6. Calibración del registro de BCECF-AM para el pHi.

#### 4 Determinación de la capacidad amortiguadora de las células.

La capacidad amortiguadora de las células, denominado  $\beta$ , se define, en este caso, como la capacidad que presentan los espermatozoides de responder a la alcalinización del pH inducida con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se determino por medio de la ecuación: (Kaufman, *et al*, 1993)

$$\beta = [\text{NH}_4\text{Cl}] 10 \exp (7.6-\text{pHi}) / \Delta\text{pHi}$$

donde  $\Delta\text{pHi} = \text{pHi con } \text{NH}_4\text{Cl} - \text{pHi reposo}$  y 7.6 es el pH del medio H-HSM + 5 mM  $\text{NaHCO}_3^-$ .

#### 5 Cuantificación de la motilidad del espermatozoide.

La cuantificación de la motilidad espermática se evaluó en un microscopio óptico siguiendo los criterios de la OMS (OMS, 2001), la cual describe 4 tipos de motilidad espermática: A, motilidad lineal; B, motilidad curvilínea; C, motilidad *in situ* y D, inmóviles.

Se evaluaron la movilidad de todos los espermatozoides observados en un campo para cada tratamiento y se determinó el porcentaje de cada parámetro de movilidad. Arbitrariamente se otorgó una calificación designada por un signo de (+) para destinar porcentajes de motilidad:

$$\begin{aligned}+++++ &= A + B + C = 100\% \\++++ &= A + B + C = 90 \% \text{ y } D= 10\% \\+++ &= B + C = 65 \% \text{ y } D= 35\% \\++ &= B + C = 40 \% \text{ y } D= 60\%\end{aligned}$$

#### 6 Cuantificación del AMPc.

La cuantificación del AMPc se hizo por duplicado en células sujetas a diferentes tratamientos. Cada muestra se centrifugó 5 min a 300g, se retiró el sobrenadante y el botón celular se mezcló con 1 ml de 0.05 M de HCl, después se hirvió 3 min, se enfrió en hielo y se centrifugó nuevamente. Se obtuvo el sobrenadante y la detección se llevó a cabo, según el protocolo establecido por el Kit de inmunoensayo enzimático competitivo para la detección de AMPc (Zimed. Laboratories Inc).



En este método se aplica el principio de competencia entre el AMPc presente en el extracto de los espermatozoides y el conjugado fosfatasa alcalina-AMPc (FA-AMPc), por un anticuerpo anti-AMPc. Los complejos anticuerpo-AMPc y anticuerpo-AMPc-FA se unen a un anticuerpo adherido a la poza. Una vez llevada a cabo la competencia por 30 min a 36°C, la mezcla se retiró, se lavó y se le añadió p-nitrofenil fosfato. Cuando la cantidad de AMPc es poca, el anticuerpo reconoce a la FA-AMPc y se genera un color intenso amarillo (leído a 450 nm). Así, la cantidad del complejo anticuerpo-AMPc-FA unido a la poza disminuye proporcional y cuantitativamente cuando se incrementa la concentración de AMPc y consecuentemente el complejo anticuerpo-AMPc.

Para obtener la cantidad de AMPc se elaboró una curva de calibración. Cada punto estándar del kit para la curva se determinó por duplicado y se obtuvo el valor promedio para cada punto. Para las muestras de espermatozoides capacitados y tratados con papaverina se calculó el porcentaje de unión relativa (B/B0) con el anticuerpo y se localizaron los valores de AMPc en la curva (figura 7).

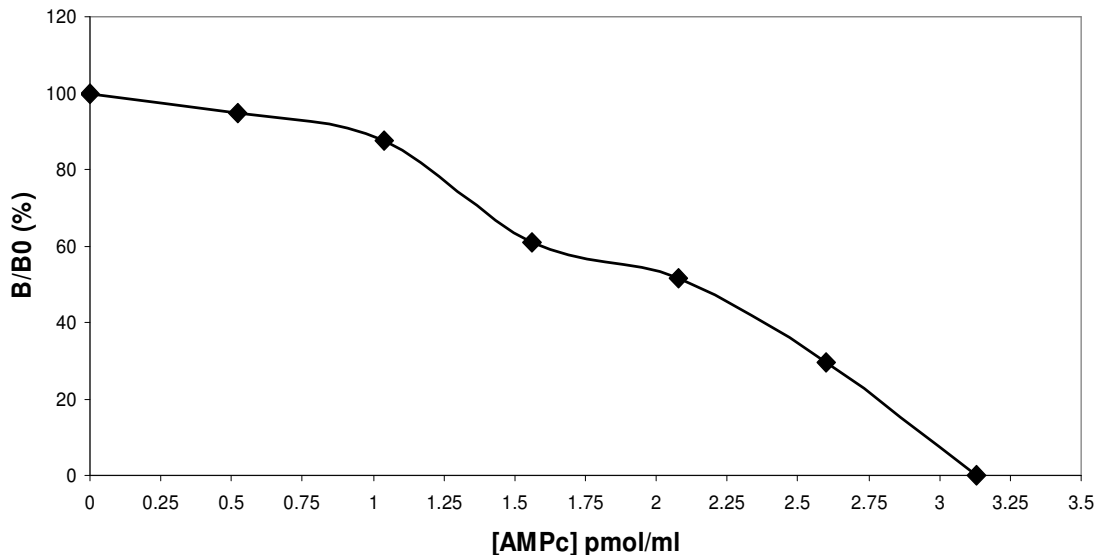


Fig 7. Curva estándar de AMPc obtenida con el Kit de inmunoensayo enzimático competitivo para la detección de AMPc (Zimed. Laboratories Inc). Se grafica la unión relativa, esto es, unión en cada punto entre la unión máxima (B/B0) vs. la concentración de AMPc.

## **7 Determinación del influjo de $\text{Ca}^{2+}$ dependiente de voltaje a diferente pH<sub>i</sub>.**

Para la determinación del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje, se tomaron  $\sim 10 \times 10^6$  espermatozoides cargados con fura-ff sujetos a diferentes tratamientos, se centrifugaron y la pastilla se depositó en la celda de fluorescencia con 2.5 ml de medio HSM-H + 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , a 36°C bajo agitación magnética constante. Después de 1 minuto de iniciado el registro, se adicionó 0.8  $\mu\text{M}$  de valinomicina, para llevar el potencial a -71 mV (de acuerdo al potencial de Nernst) y al mismo tiempo hacer la membrana dependiente principalmente de  $\text{K}^+$ . Después de un minuto, se añadió 30 mM de KCl para despolarizar a -30 mV. Esta despolarización produjo un incremento transitorio del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular debido a la activación de los CCDV.

El  $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$  lo definimos como el valor de  $\text{Ca}^{2+}$  en el pico menos el valor del  $\text{Ca}^{2+}$  en el reposo. Para medir el efecto de la alcalinización, se añadieron simultáneamente 30 mM KCl +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1.5, 5.0 ó 10 mM).

Estas concentraciones se eligieron por la relación aproximadamente lineal que guardan entre el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente del voltaje y el pH<sub>i</sub> observado previamente en espermatozoides no capacitados (Fraire-Zamora and González-Martínez, 2004).

## **8 Análisis estadístico**

Los valores obtenidos se expresaron de una  $n= 5$  y en relación al promedio  $\pm$  ES, el número de individuos se analizó con una prueba de *t*-Student pareada y con una prueba de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls. Los valores de movilidad se analizaron con una prueba de Shi cuadrada. Los valores de  $p < 0.05$  y  $p < 0.0001$  se considerados significativa y extremadamente significativos respectivamente.

## VI RESULTADOS.

### 1 Selección del detector de $\text{Ca}^{2+}$ apropiado para espermatozoides capacitados.

Con el objeto de seleccionar un detector de  $\text{Ca}^{2+}$  con mayor capacidad de detección, con Kds del orden de micromolar, se probaron el fura-2-AM con una Kd de 260 nM, el fura-ff con una Kd de 5.5  $\mu\text{M}$  y el mag fura, un detector con una afinidad más baja, con una Kd de 50  $\mu\text{M}$ , aunque también detecta magnesio con una Kd de 1.9 mM.

En la prueba se usaron condiciones extremas, esto es, inducción de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre estimulada con despolarización a -15 mV (con 30 mM de KCl) y alcalinización con 60 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (que lleva el pH<sub>i</sub> a 7.4 de acuerdo a Fraire-Zamora y González-Martínez (2004), en espermatozoides capacitados (que tienen de por sí una alta capacidad de permeación a través de los CCDV). La figura 8 muestra registros con los valores de R induciendo despolarización con y sin  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en células cargadas con fura-2-AM, fura-ff y mag fura.

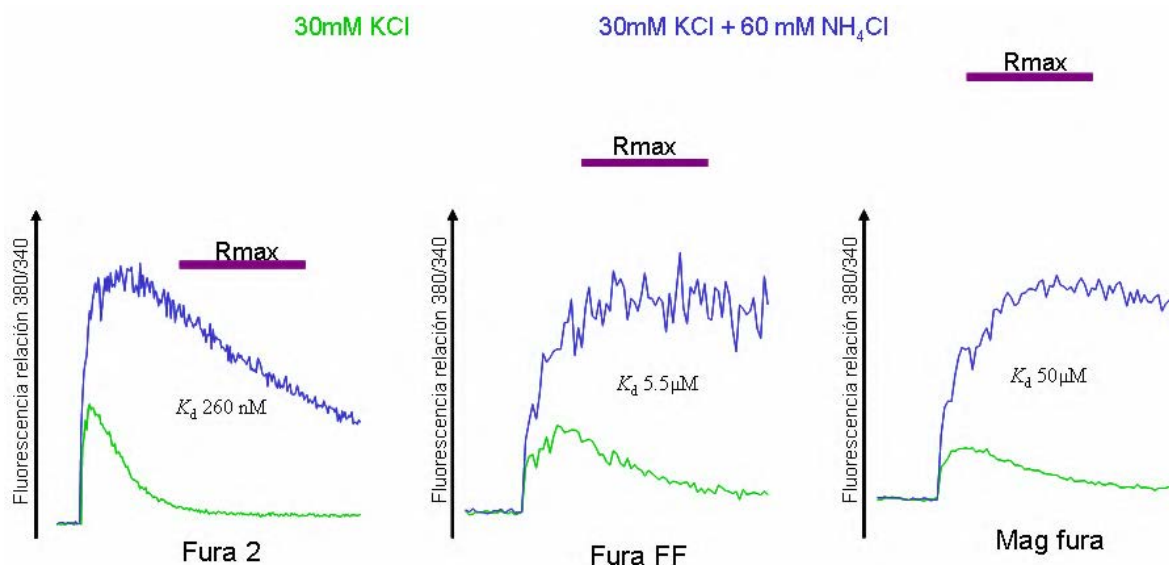


Fig. 8. Aumento en el calcio intracelular inducido por despolarización alcalina, obtenidos con fura 2, fura-ff y mag fura. La inducción de la despolarización en condiciones extremas con 60 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (trazos en azul), indujo un incremento en el calcio intracelular que llegó a valores de saturación de fura 2, indicado por la Rmax (obtenida con el ionóforo de calcio ionomicina). Con mag fura el registro mostró un pico máximo lejos de saturación (esto es, lejos de su Rmax). El fura ff registró también un margen aceptable de medición.

Los registros en verde pertenecen a espermatozoides estimulados solo con 60 mM de KCl y los registros en azul corresponden a espermatozoides estimulados con 30 mM de KCl + 60 mM de NH<sub>4</sub>Cl. En la barra se indica el valor de R<sub>max</sub>, como punto de referencia para saber en que medida nos acercamos a valores de saturación del indicador. En todos los casos fue posible detectar estimulación con NH<sub>4</sub>Cl. La detección con fura-2-AM mostró un pico estimulado que llegó a valores cercanos a la R<sub>max</sub>. En contraste, los registros con mag fura y fura-ff mostraron picos máximos alejados de la R<sub>max</sub>. Si bien el mag fura mostró un mejor margen para la medición, decidimos utilizar el fura-ff, ya que, además de tener buen margen de medición, es un indicador mucho más específico para el Ca<sup>2+</sup> en tanto que en el mag el pH afecta su afinidad a Ca<sup>2+</sup> y detecta también cambios en la concentración de Mg<sup>+</sup> en el rango fisiológico.

## **2 Efecto del pHi en el influjo de Ca<sup>2+</sup> a través de CCDV en espermatozoides capacitados.**

La figura 9 muestra el efecto del pHi sobre la apertura de los CCDV de espermatozoides capacitados y no capacitados cargados con fura-ff. En células no capacitadas se reprodujo el efecto, estudiado con fura 2, reportado por Fraire-Zamora y González-Martínez (2004) esto es, se produjo una estimulación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> dependiente del voltaje que dependió de la concentración de NHCl, duplicándose aproximadamente con 10 mM NH<sub>4</sub>Cl. La capacitación de las mismas células, produjo una estimulación notable de los CCDV y una potenciación de alrededor de 10 veces en su respuesta al NHCl. Por ejemplo, en el no capacitado, la despolarización con 10 mM NH<sub>4</sub>Cl produjo un  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  de  $1.35 \pm 1 \mu M$  en tanto que en el espermatozoide capacitado el resultado fue  $8 \pm 2 \mu M$ .

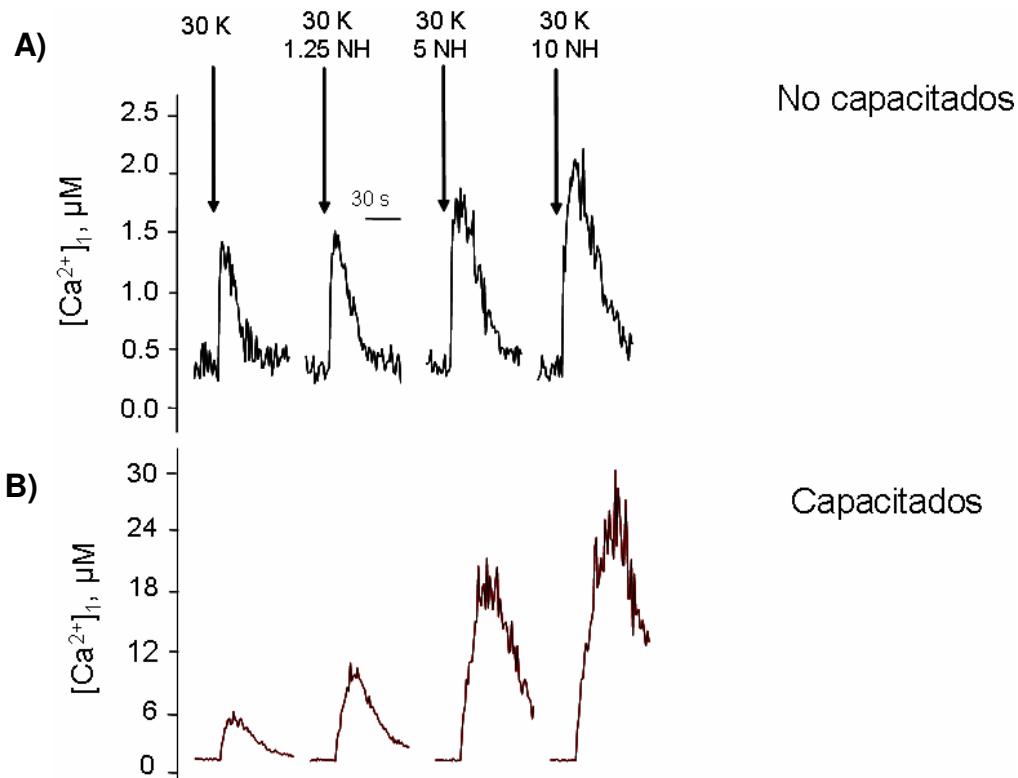


Fig. 9. Despolarización inducida por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides no capacitados (A) y capacitados (B). Un minuto después de iniciado el registro se adicionó  $0.8 \mu\text{M}$  de V y el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se indujo un minuto después con 30 mM KCl + 1.25, 5.0 o 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para cada trazo como se indica. Los registros son representativos de una  $n=6$  de muestras diferentes de semen.

Para precisar el efecto del  $\text{pHi}$  en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV se determinaron los valores de  $\text{pHi}$  en el reposo de los espermatozoides no capacitados y capacitados y se midió la capacidad amortiguadora,  $\beta$ , de cada uno de ellos. La figura 10 muestra el registro temporal de  $\text{pHi}$  en células no capacitadas y capacitadas y sus respuestas a las diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  utilizadas. Como era de esperarse, el valor de  $\text{pHi}$  en los espermatozoides capacitados fue más alcalino ( $\text{pHi}$  6.80) respecto a los no capacitados ( $\text{pHi}$  6.65). El  $\text{NH}_4\text{Cl}$  indujo en ambos grupos elevaciones cuasi instantáneas del  $\text{pHi}$  pero en el caso de el espermatozoide capacitado esta fueron más alcalinas. Este efecto pudo deberse a que en el espermatozoide capacitado el valor basal de  $\text{pHi}$  fue mayor con lo que la alcalinización por necesidad es también más alta, y/o a que su capacidad amortiguadora pudiera estar disminuida. La figura 11 muestra los cálculos de capacidad amortiguadora obtenidas con espermatozoides capacitados y no capacitados.

En efecto, observamos que para cada adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  la disminución de la capacidad amortiguadora disminuyó durante la capacitación.

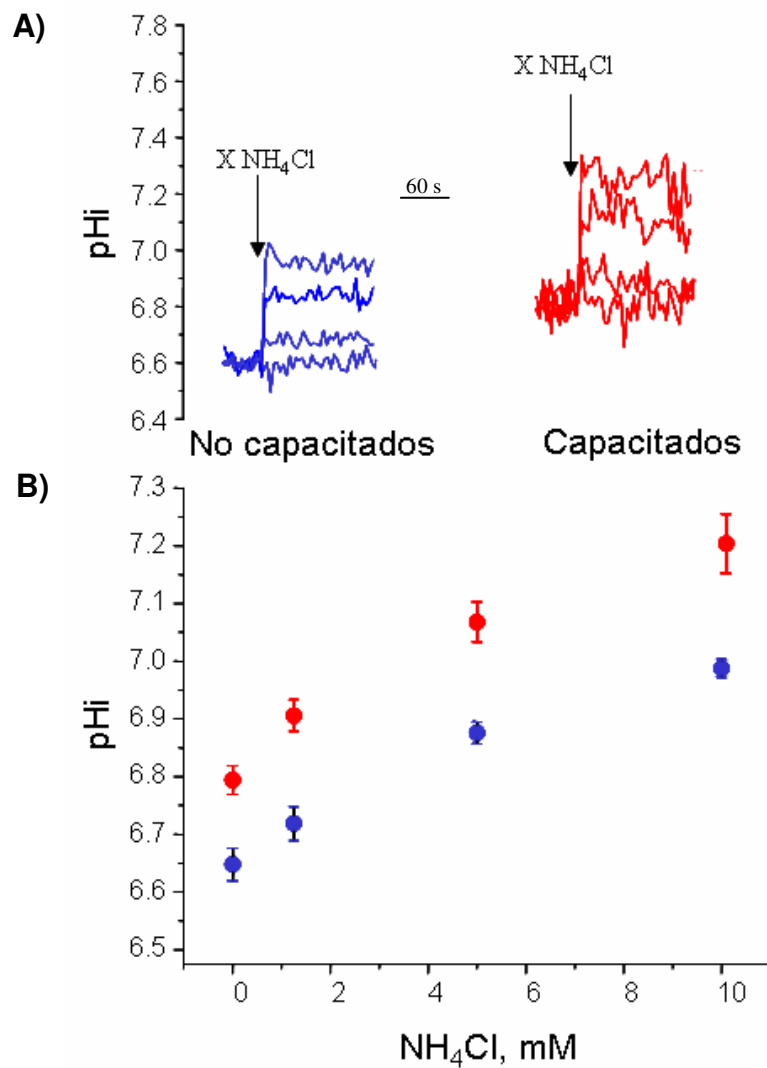


Fig. 10. Efecto de la alcalinización producida con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en el pHi de muestras no capacitadas y capacitadas detectadas con BCECF-AM. (A) un minuto después de iniciado el registro se adicionó  $0.8 \mu\text{M}$  de V y la alcalinización se indujo un minuto después con  $30 \text{ mM KCl} + 0, 1.25, 5.0$  o  $10 \text{ mM}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en espermatozoides no capacitados (azúl) y capacitados (rojo). (B) El pHi alcanzado con dichas adiciones en función de la concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

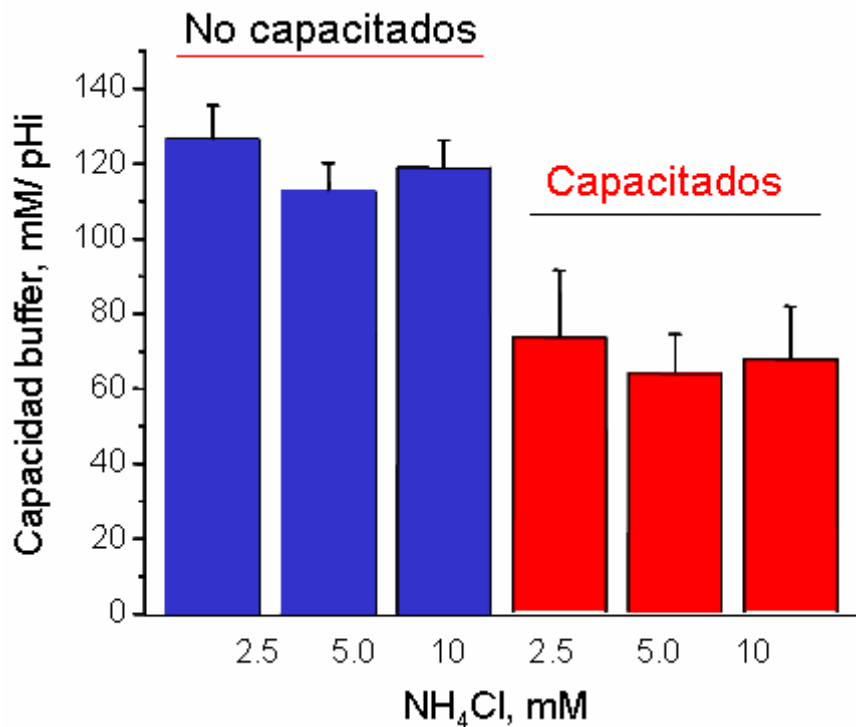


Fig. 11. Capacidad amortiguadora de las muestras no capacitadas y capacitadas durante la alcalinización del pHi con 2.5, 5 y 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl.

Dados los valores del pHi obtenidos en células capacitadas y no capacitadas, ajustamos la curva de sensibilidad a pHi, como se muestra en la figura 12. Observamos que, aún cuando la alcalinización del pHi en células capacitadas fue mayor, el influjo de Ca<sup>2+</sup> a través de los CCDV es mucho mayor en las células capacitadas mostrando una tasa de incremento de 49 μM/pHi, mientras que para los espermatozoides no capacitados fue de 6.7 μM/pHi, esto es, la sensibilidad de los CCDV al pHi incrementó alrededor de 7 veces en condiciones de capacitación. Este resultado indicó que cuando el espermatozoide se capacita el pHi modula de manera cualitativamente diferente los CCDV y sugirió la posibilidad de que un modulador central en la capacitación, el AMPc, pudiera intervenir en dicha estimulación.

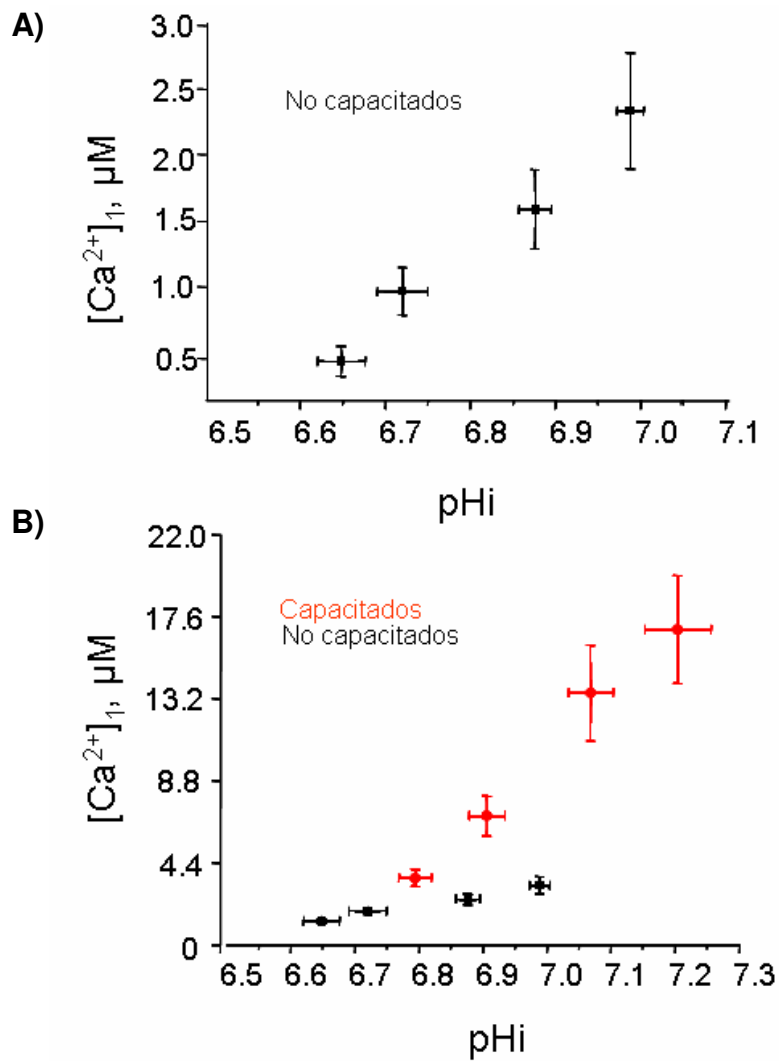


Fig. 12. Influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje en función del pHi en espermatozoides no capacitados (A) y capacitados (B registro rojo). La gráfica B compara los registros de ambas condiciones. El valor de  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  se obtuvo de la diferencia obtenida entre el pico de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido con 30 mM KCl + 0, 1.25, 5.0, o 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , menos la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en basal obtenida de los registros de la figura 9.

En el siguiente apartado se muestran los experimentos hechos para incrementar el cAMP en células no capacitadas y los efectos sobre los CCDV.



### 3 Efecto de elevar el AMPc intracelular en los espermatozoides no capacitados sobre los CCDV y su sensibilidad a pHi.

#### 3.1 Evaluación de diferentes agentes que elevan el AMPc en la motilidad del espermatozoide.

Para elevar el AMPc en los espermatozoides no capacitado, en un tiempo menor, se probaron varios inductores monitoreando su efecto en un ensayo biológico de movilidad espermática. Dado que está bien establecido que la motilidad rectilínea se estimula por un aumento en la PKA, estimulada por el AMPc, decidimos probar diferentes inductores en los parámetros de movilidad A, B, C y D. Pentoxifilina (Sigma-Aldrich, Inc.) y papaverina (Sigma-Aldrich, Inc.) que son inhibidores inespecíficos de fosfodiesterasas, NaHCO<sub>3</sub> (J.T. Baker) que activa a la ACs, forskolin (BioChemika, Fluka), Inc.) que activa a la ACm y para los homologos de AMPc, db-AMPc (Sigma-Aldrich, Inc.) y AM-AMPc (Sigma-Aldrich, Inc.).

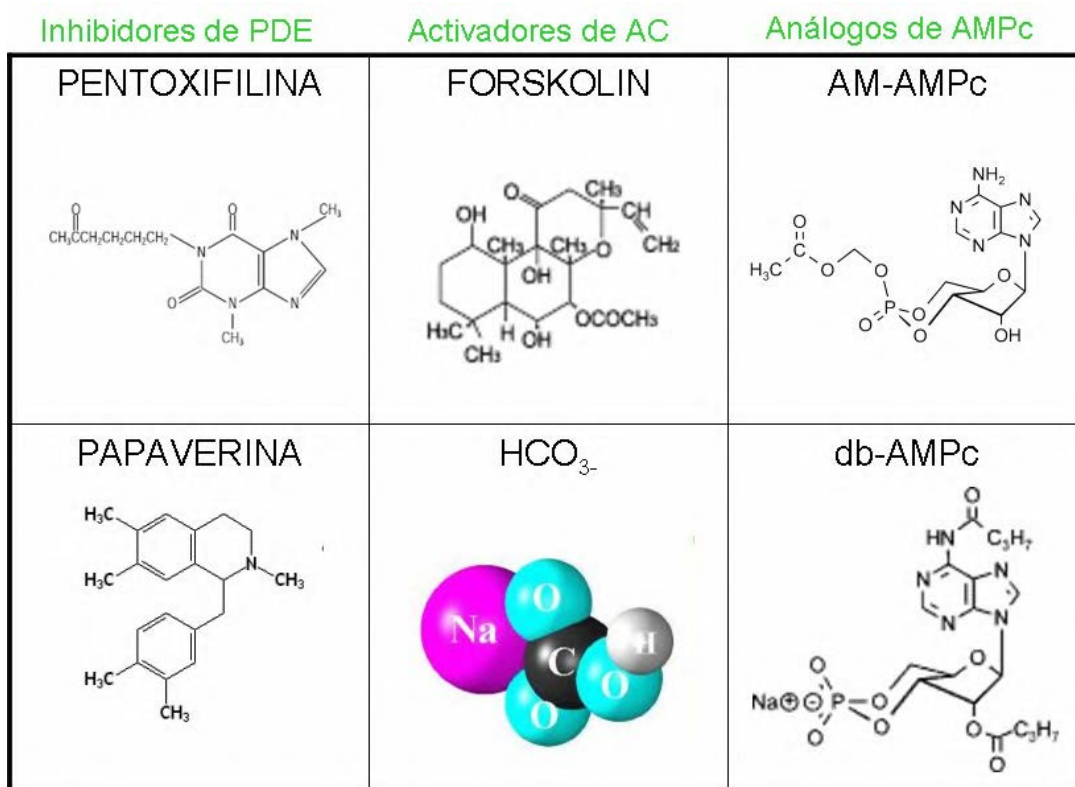


Fig. 13. Compuestos utilizados para elevar el AMPc

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	TIEMPO	REFERENCIA
<b>Pentoxifilina</b>	0.6, 0.12, 0.18, 0.24, 0.30 Mm	20, 40, 60 min	Calogero, <i>et al</i> , 1998 Rupasri, <i>et al</i> , 1999
<b>Forskolin</b>	1.0, 0.5, 0.25 mM	5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min	Ji-Hong, <i>et al</i> , 2003 Okamura, <i>et al</i> , 1993
<b>AM-AMPC</b>	10, 20, 40 $\mu$ M	5, 15, 30 min	Wennemuth, <i>et al</i> , 2004
<b>db-AMPC</b>	1.0 mM	10, 20, 30, 40, 50, 60 min	Ji-Hong, <i>et al</i> , 2003 Visconti, <i>et al</i> , 1995
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	25 mM	10, 20, 30, 40, 50, 60 min	Gadella and Gestel, 2004
<b>Papaverina</b>	1.0, 0.5, 0.25 mM	5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min	Mujica, <i>et al</i> , 1991 Hoskins, <i>et al</i> , 1975

Tabla I. Concentraciones y tiempos registrados de los compuestos seleccionados.

La figura 13 muestra los inductores usados y la tabla I las condiciones experimentales que, en base a los reportes indicados, utilizamos para el ensayo biológico rápido, esto es, de conteo exclusivamente de movilidad espermática en 100 espermatozoides en cada caso. Los resultados obtenidos con pentoxifilina, forskolin, AM-AMPC, db-AMPC, NaHCO<sub>3</sub> y papaverina, se muestran en las tablas II. Las tablas incluyen la concentración usada y el tiempo de incubación. La cantidad de cruces indican el grado de movilidad detectada por un solo observador (Paloma Neri):

#### PENTOXIFILINA

mM \ Min	0	0.6	0.12	0.18	0.24	0.30
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
20	+++	+++	+++	+++	+++	+++
40	++	+++	+++	++++	+++	++
60	++	+++	++++	++++	+++	++

Tablas II. Determinación de la movilidad espermática en las condiciones indicadas de tiempo, concentración e inductores indicados.

### FORSKOLIN

mM \ Min	0	0.25	0.5	1.0
0	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++	+++
20	+++	+++	+++	+++
30	+++	+++	++++	++++
40	++	+++	++++	++++
50	++	+++	+++	+++
60	++	+++	+++	+++

### AM-AMPc

$\mu$ M \ Min	0	10	20	40
0	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++
15	+++	+++	+++	+++
30	++	++	+++	+++

### Db-AMPc

mM \ Min	0	10	20	30	40	50	60
0	+++	+++	+++	+++	++	++	++
1.0	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++

(Continuación). Tablas II. Determinación de la movilidad espermática en las condiciones indicadas de tiempo, concentración e inductores indicados.

NaHCO<sub>3</sub>-

Min \ mM	0	25
0	+++	+++
10	+++	++++
20	+++	++++
30	+++	++++
40	++	++++
50	++	++++
60	++	++++

PAPAVERINA

Min \ mM	0	0.25	0.5	1.0
0	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++++	+++++
10	+++	+++	+++++	+++++
20	+++	++++	+++++	+++++
30	+++	++++	+++++	+++++
40	++	++++	+++++	+++++
50	++	++++	++++	+++++
60	++	++++	++++	++++

(Continuación) Tablas II. Determinación de la movilidad espermática en las condiciones indicadas de tiempo, concentración e inductores indicados.

Evidentemente, la pentoxifilina, el db-AMPc y el forskolin, en ese orden, indujeron estimulación de la movilidad espermática pero a tiempos de exposición muy largos (30-40 minutos) en tanto que el AMPc-AM no produjo ningún efecto. El NaHCO<sub>3</sub>- mostró una alta estimulación en tiempo corto (< 10 minutos), sin embargo la papaverina aumentó la movilidad espermática significativamente desde los 5 minutos de incubación.

Tomando en cuenta esta exploración, decidimos utilizar 0.5 mM de papaverina con exposición de 5 minutos.

Posteriormente, se evaluó el efecto del H89, inhibidor de la PKA, sobre la motilidad en los espermatozoides no capacitados. Para ello, se expusieron las células con 10  $\mu$ M de H89 a diferentes tiempos (Tabla III). Encontramos que el tiempo requerido para inhibir el efecto del H89 fue de 30 minutos, que coincide con reportes hechos por otros investigadores (Tabla IV).

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	TIEMPO	REFERENCIA
H89	10 $\mu$ M	5, 10, 20, 30, 40, 50, y 60 min	Bajpai and Doncel, 2003

Tabla III. Concentración y tiempos registrados para observar el efecto del H89 sobre la movilidad espermática.

min	0	5	10	20	30	40	50	60
10 $\mu$ M								
Control	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
H89	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+

Tabla IV. Incubación de espermatozoides no capacitados con H89. El efecto inhibitorio sobre la movilidad espermática se observó a partir de los 30 min de incubación.

De acuerdo a lo esperado, en esta condición, el H89 efectivamente inhibió la movilidad inducida por 5 minutos de exposición a 0.5 mM de papaverina (es decir, de añadir la papaverina a los espermatozoides incubados con H89), como se muestra en la tabla V.

CONTROL	PAPAVERINA	H89 PAPAVERINA	H89
+++	+++++	++	+

Tabla V. La papaverina aumento la motilidad espermática con respecto al control y al incubarse junto al H89 por 30 minutos esta disminuyó aún por debajo del control. El efecto del H89, solo decrementó notablemente la motilidad hasta valores del 15%.

Dadas estas condiciones, se determinaron los parámetros de motilidad A, B C y D modificados por la papaverina y el efecto de H89 (figura 14). Por razones que se expondrán en la sección 3.3 las medidas de motilidad se hicieron con las células expuestas a papaverina y posteriormente lavadas con medio H-HSM.

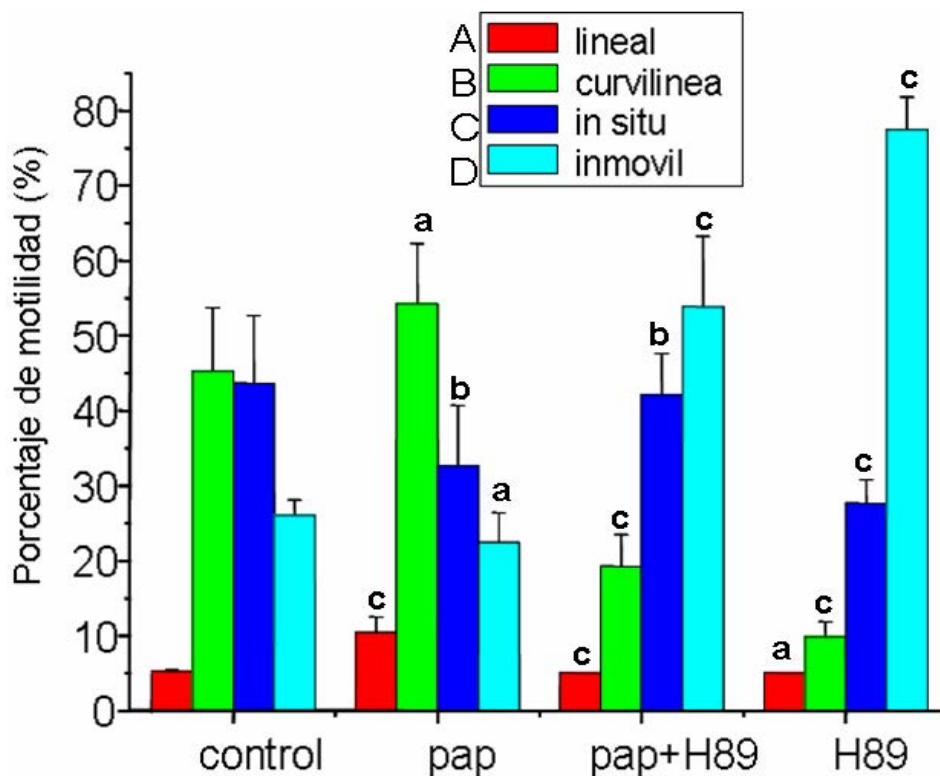


Fig. 14. Efecto de la papaverina y el H89 sobre la motilidad en espermatozoides no capacitados. La papaverina incrementa el grado de movilidad A<sup>c</sup> (líneal) y B<sup>a</sup> (curvilínea) y disminuye el grado de movilidad C<sup>b</sup> (*in situ*) y D<sup>a</sup> (inmóviles). Al incubarse 30 min con H89 (del minuto 25 al 30 se adicionó la papaverina en la serie pap+H89) disminuyeron los grados de movilidad A<sup>c</sup> (líneal) y B<sup>c</sup> (curvilínea) y aumentaron los grados de movilidad C<sup>b</sup> (*in situ*) y D<sup>c</sup> (inmóviles). El H89 solo, disminuyó aún mas el grado de movilidad B<sup>c</sup> (curvilínea) y C<sup>c</sup> (*in situ*) y aumentó el grado D<sup>c</sup> (inmóviles). Prueba de X<sup>2</sup> medida: <sup>a</sup>  $p > 0.05$  diferencia no significativa, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  diferencia significativa y <sup>c</sup>  $p < 0.0001$  diferencia extremadamente significativa.

Se observa que en condiciones normales una muestra seminal presenta movilidad espermática en su mayoría B y C casi en los mismos porcentajes (40-45%) y en menos porcentaje los grados de movilidad A y C. En las muestras de espermatozoides no capacitados incubados con papaverina el grado de movilidad A y B aumentaron, aunque B de manera no significativa, y el grado de movilidad C disminuyó significativamente y el grado D también pero de igual manera de forma no significativa.

En los espermatozoides incubados con papaverina y H89, éste último, disminuyó el grado de movilidad A y B de forma extremadamente significativa y aumentó el grado de movilidad B (significativamente) y C también de forma extremadamente significativa. En los espermatozoides incubados solamente con H89 el grado de movilidad A no presentó cambios, los grados B y C disminuyeron y el grado de inmóviles (D) aumentó todos ellos de forma extremadamente significativa.

De estos resultados fue evidente que el efecto de la papaverina, como inhibidor de fosfodiesterasas, debió haber aumentado los niveles del AMPc, la PKA y por lo tanto la movilidad espermática.

### 3.2 Determinación de AMPc en espermatozoides tratados con papaverina.

De acuerdo al efecto que produjo la papaverina en la motilidad espermática, se cuantificó el AMPc en espermatozoides no capacitados, en espermatozoides capacitados y en no capacitados incubados 5 minutos con 0.5 mM de papaverina. De acuerdo a lo esperado, la cantidad de AMPc se duplicó durante la capacitación y la exposición con papaverina cuadruplicó los valores de AMPc respecto al espermatozoide no capacitado (Tabla VI).

Espermatozoides no capacitados	Espermatozoides capacitados	Espermatozoides no capacitados + 0.5 mM papaverina 5 min
1.3 ± 0.6 pmoles/10 <sup>7</sup> células	2.8 ± 0.3* pmoles/10 <sup>7</sup> células	5.5 ± 1.0* pmoles/10 <sup>7</sup> células

n=4±ES, p<0.05

Tabla VI. Cuantificación de AMPc

### 3.3 Efecto de la papaverina en los CCDV.

Es importante aclarar que la adición de papaverina apaga de manera importante la fluorescencia del fura ff (trazos no mostrados), por lo que después de exponer las células 5 minutos a 0.5 mM de papaverina, éstas fueron lavadas y el botón celular, casi libre de papaverina, fue adicionado a la celda de registro.

Cabe recordar que este mismo procedimiento, es decir, el uso de células lavadas de papaverina, se utilizó para la evaluación de movilidad (figura 14) y para la determinación del AMPc (Tabla VI).

El efecto de la exposición a papaverina sobre el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV se muestra en la figura 16. La papaverina produjo una notable estimulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por despolarización. Este experimento se hizo registrando simultáneamente el potencial de membrana para ver si la papaverina alteraba los cambios en el potencial de membrana inducidos por la valinomicina y KCl, y con ello la apertura de los CCDV. La figura 15 muestra que este no fue el caso, esto es, que tanto en células tratadas como no tratadas con papaverina, la hiperpolarización inducida por la valinomicina y la posterior despolarización inducida por 30 mM de KCl fue similar. Este resultado indicó que la estimulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por despolarización en células tratadas se relacionó a una modulación bioquímica del canal y no a efectos sobre el potencial de membrana. Otro aspecto a destacar es que la incubación con papaverina produjo una notable estimulación en la entrada transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por valinomicina. Interesantemente, este efecto no se apreció en el registro simultáneo pero si fue evidente en registros en los que no se usó la cianina (figuras 16 y 18).



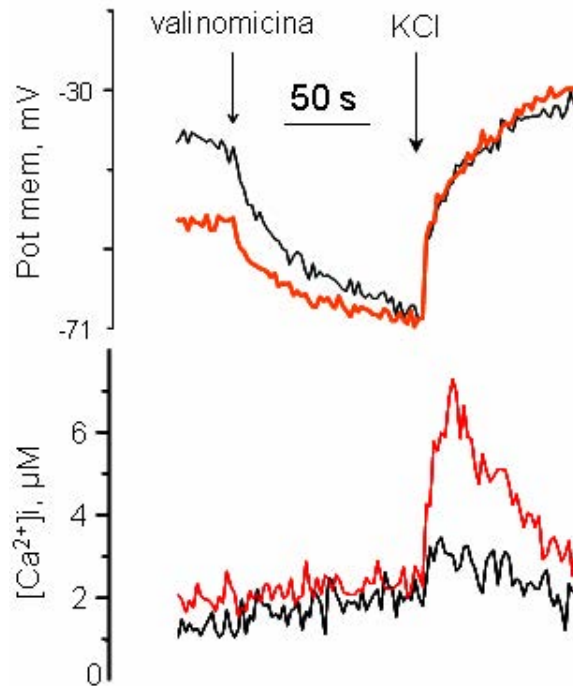


Fig. 15. Efecto de 30 mM de KCl en el potencial de membrana en el espermatozoide humano incubado con papaverina (rojo) y sin tratamiento (negro) con la cianina diSC<sub>3</sub>(5). La fluorescencia del fura-ff (340-380 nm) y del diSC<sub>3</sub>(5) (600-670 nm) se detectaron simultáneamente a 36°C bajo agitación magnética.

Se estudió el efecto del H89 sobre la estimulación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los CCDV en espermatozoides tratados con papaverina. El H89 (10 μM) no inhibió esta entrada (trazo no mostrado); ante la ausencia del efecto, decidimos subir la concentración a 50 μM, y tampoco se observó efecto, sino más bien, se produjo una ligera estimulación (figura 16). En efecto, la entrada de Ca<sup>2+</sup> con papaverina,  $2.86 \pm 1.5$  subió significativamente a  $4.05 \pm 0.93$  en presencia de H89 ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ). La ausencia del efecto inhibitorio del H89 indicó que la estimulación de los CCDV por el aumento en el AMPc inducido por la papaverina no involucró la actividad de la PKA, y en todo caso, esta actividad pudo producir inhibición de los canales.

Dado que los canales son sensibles al pHi, se determinó el valor de pHi en cada condición. Se observó (figura 17) que la papaverina subió el pHi de 6.66 a 6.72 y que esta se mantuvo en presencia de H89 (pHi 6.73). La sola presencia del H89 también alcalinizó a las células (6.75). Esta ligera alcalinización pudo contribuir a un ligero aumento de la entrada de Ca<sup>2+</sup> en presencia del H89 solamente (sin papaverina) (figura 16).

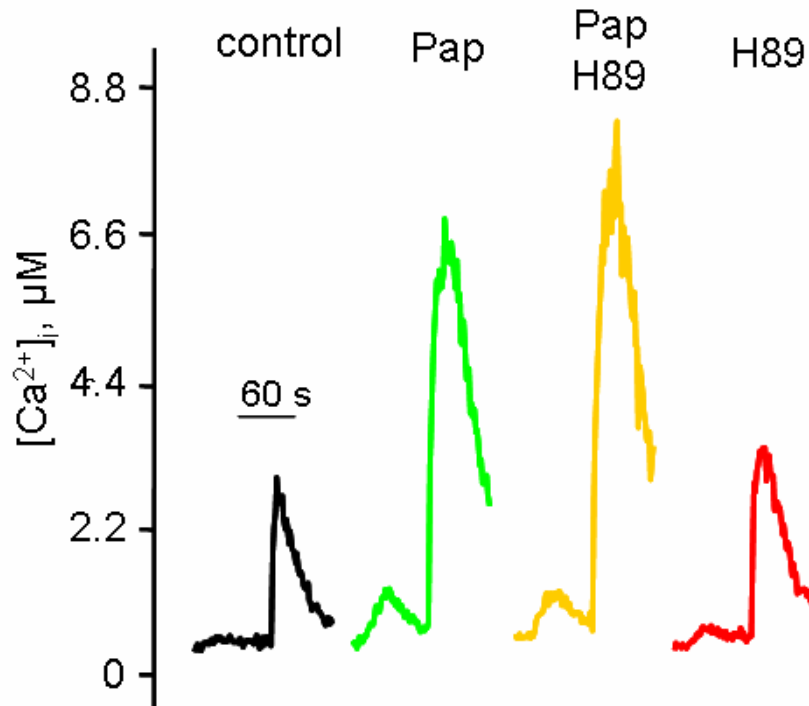


Figura 16. Efecto de la papaverina y el H89 en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente del voltaje en espermatozoides no capacitados. Con una despolarización inducida con 30 mM de KCl para cada caso la papaverina y/con el H89 aumentaron la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . No se observó efecto en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  del H89.

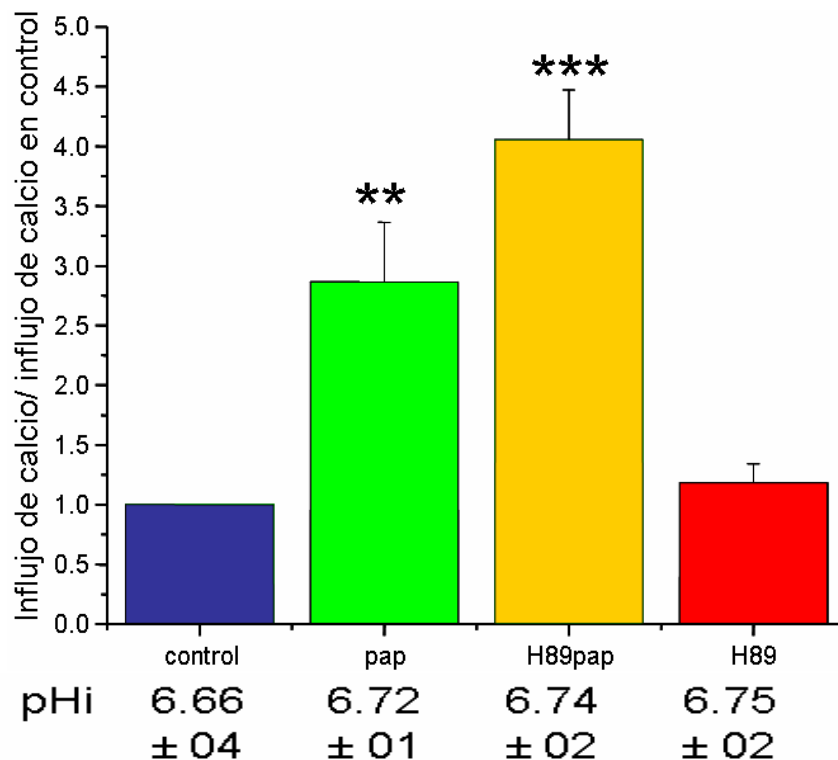


Fig. 17. Estadística normalizando el control de los experimentos mostrados en la figura 16. Se indican los valores de  $\text{pH}_i$  en el reposo obtenidos en el control (azul), tratado con papaverina (verde), papaverina + H89 (amarillo) y H89 solo (rojo). \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.05$

### 3.4 Efecto de la papaverina en la sensibilidad de los CCDV al pHi.

El efecto de la papaverina sobre el pHi pudo contribuir al efecto estimulador sobre los CCDV. Asimismo, la papaverina produjo aumentos en el AMPc y estimulación de los CCDV, condiciones que son parecidas a la capacitación.

Dadas estas observaciones, decidimos investigar la sensibilidad de los CCDV en espermatozoides tratados con este fármaco y compararlos con los resultados obtenidos con células capacitadas. La figura 18 muestra que la alcalinización con 0, 1.25, 5.0 y 10 mM NH<sub>4</sub>Cl, inducida simultáneamente a la activación de los CCDV, produjo incrementos concomitantes en el influjo de Ca<sup>2+</sup> a través de los CCDV en células no capacitadas tratadas con papaverina.

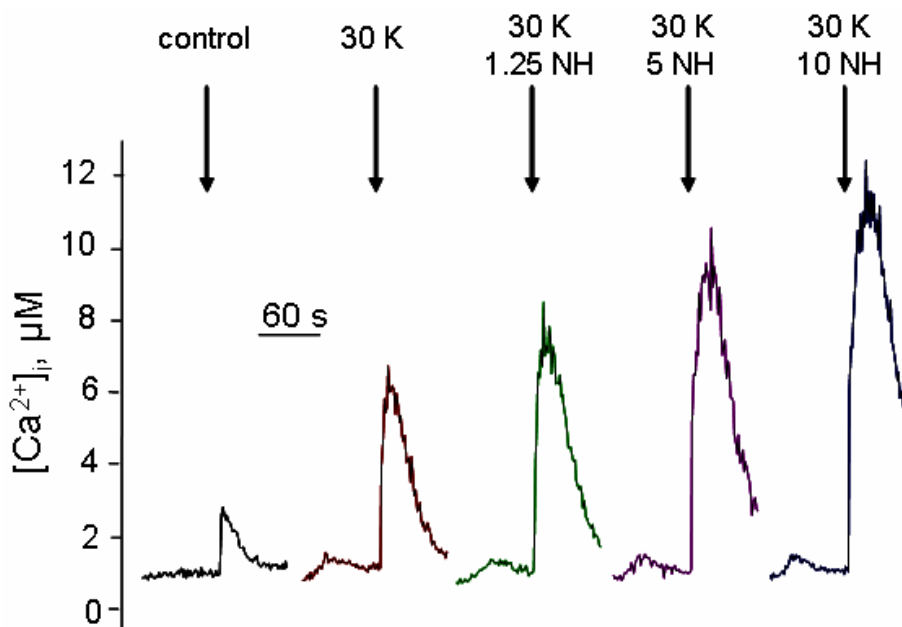


Fig. 18. El efecto del NH<sub>4</sub>Cl en el influjo de Ca<sup>2+</sup> dependiente del voltaje en espermatozoides no capacitados con AMPc aumentado por papaverina. El efecto directamente proporcional a la cantidad de NH<sub>4</sub>Cl adicionado. Los niveles de influjo de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fueron muy similares a los reportados en espermatozoides capacitados.

Llama la atención que el pHi alcanzado en células no capacitadas tratadas con papaverina con estas adiciones de NH<sub>4</sub>Cl, así como la capacidad amortiguadora, fue muy similar al de las células capacitadas (figura 19). Un ajuste del efecto de la papaverina sobre la sensibilidad de los CCDV al pHi y la correspondiente comparación con los espermatozoides no capacitados y los capacitados se muestra en la figura 20.

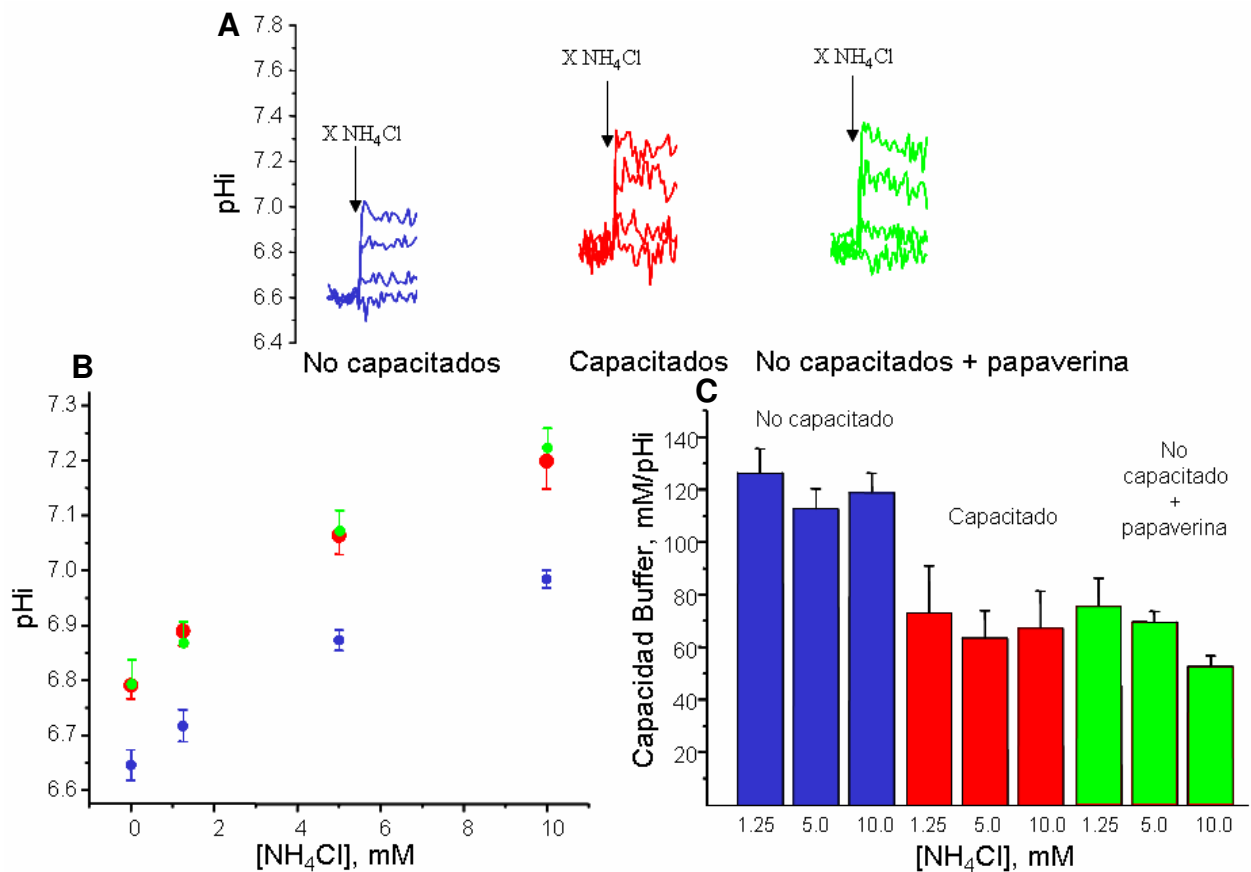


Fig. 19. Efecto de la alcalinización en el pHi producida con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de muestras de espermatozoides no capacitados con AMPc elevado por papaverina y comparación entre los espermatozoides no capacitados (azul) y capacitados (rojo). (A) un minuto después de iniciado el registro se adicionó  $0.8 \mu\text{M}$  de V y la alcalinización se indujo un minuto después con  $30 \text{ mM}$  KCl +  $1.25$ ,  $5.0$  o  $10 \text{ mM}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en espermatozoides no capacitados con AMPc elevado por papaverina (verde). (B) El pHi alcanzado con dichas adiciones en función de la concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  muestra que los espermatozoides no capacitados con el AMPc elevado por papaverina presentan la misma sensibilidad a la alcalinización que los espermatozoides capacitados. (C) Capacidad amortiguadora de los espermatozoides no capacitados, capacitados en condiciones fisiológicas de  $4 \text{ hrs}$  a  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  y no capacitados con AMPc por papaverina. Los trazos en azul y rojo de A los tomamos de las figura 10.

Todos los valores de  $\beta$  se analizaron por una prueba de  $t$  siendo estadísticamente significativos,  $p < 0.05$ , a excepción de los espermatozoides capacitados +  $5.0 \text{ mM}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  vs espermatozoides no capacitados con papaverina +  $5.0 \text{ mM}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Observamos que la estimulación de  $[Ca^{2+}]_i$  con papaverina, si bien fue notable, no alcanzó la elevada estimulación encontrada en los espermatozoides capacitados. En efecto, encontramos que mientras que la sensibilidad de los canales al  $pHi$  ( $\Delta[Ca^{2+}]_i/\Delta pHi$ ) en los espermatozoides no capacitados en presencia de papaverina fue de  $16 \mu M/pHi$ , esto es, alrededor de 2.5 veces mayor que en espermatozoides no capacitados ( $6.7 \mu M/pHi$ ), la sensibilidad al  $pHi$  en los espermatozoides capacitados fue de  $49 \mu M/pHi$ , esto es, alrededor de 7 veces mayor respecto a las células no capacitadas. Estos resultados indicaron que existen otros elementos bioquímicos presentes que se disparan durante la capacitación, además del AMPc y la alcalinización del  $pHi$ , que estimulan la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los CCDV en el espermatozoide humano.

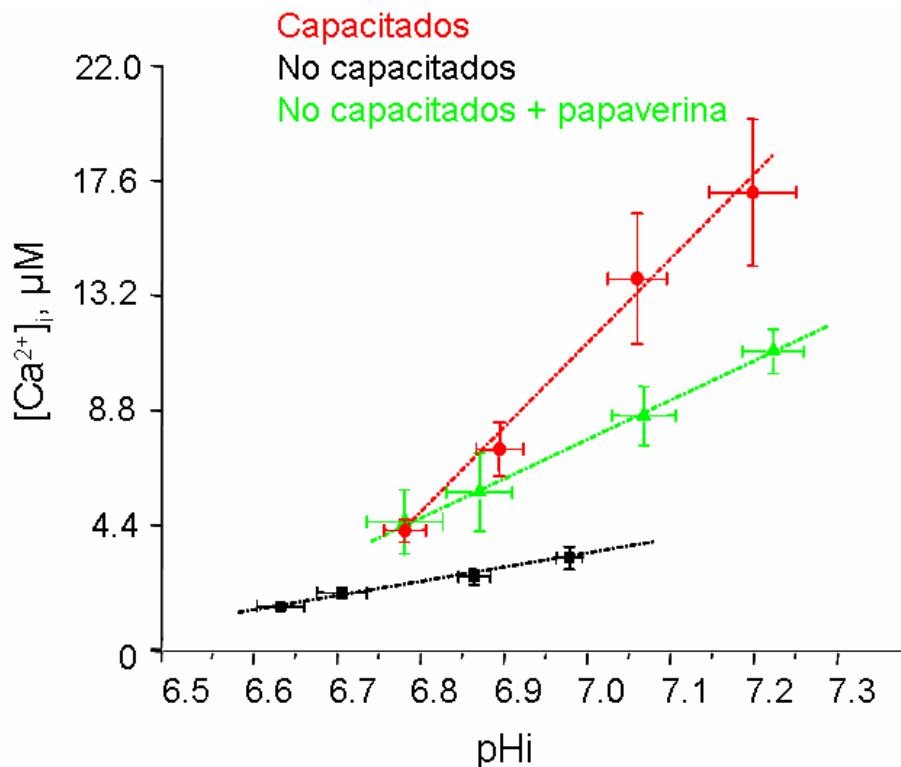


Fig. 20. Influxo de  $Ca^{2+}$  dependiente del voltaje en función del  $pHi$  en espermatozoides no capacitados, capacitados y no capacitados incubados con papaverina cargados con fura-ff. Los valores de  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  se obtuvieron de la diferencia entre el pico de  $Ca^{2+}$  alcanzado con 30 mM de KCl o con 30 mM KCl + 1.25, 5.0, o 10 mM de  $NH_4Cl$ , menos la  $[Ca^{2+}]_i$  en reposo de las figuras 9 y 18. Los trazos en verde y rojo los tomamos de la figura 12. Las líneas punteadas reflejan zonas aproximadamente lineales (coeficiente de correlación de 0.99) de el efecto de  $pHi$  sobre el influxo de calcio dependiente de voltaje y se trazaron para comparar la sensibilidad de estos canales al  $pHi$  en las tres diferentes condiciones.

## VII DISCUSIÓN

Durante la capacitación espermática los canales de calcio dependientes de voltaje de los espermatozoides de humano, detectables por un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por una despolarización con  $\text{K}^+$ , presentan una notable estimulación en su capacidad de permeación iónica. Esta estimulación puede deberse a la dependencia de  $\text{pHi}$  que exhiben estos canales, que al alcalinizarse se estimulan. Sin embargo, la alcalinización del  $\text{pHi}$ , de 0.15 unidades que se presenta durante la capacitación, solo puede explicar alrededor de un 30 % de la dicha estimulación por lo que en esta tesis postulamos que otros reguladores centrales de la capacitación, como el AMPc, contribuirían a la regulación de los CCDV.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que, en efecto, la elevación intracelular del AMPc inducida con papaverina, inhibidor inespecífico para fosfodiesterasas, estimula en el espermatozoide no capacitado a los CCDV e induce también un aumento en el  $\text{pHi}$  similar al observado en el espermatozoide capacitado. Con ello, podríamos concluir que el aumento combinado del AMPc y el  $\text{pHi}$  serían condiciones suficientes para estimular a los CCDV durante la capacitación. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que el AMPc se elevó 4 veces en el espermatozoide no capacitado tratado con papaverina en tanto que en el espermatozoide capacitado solo aumentó 2 veces. Consecuentemente, la hipótesis se sostiene si la estimulación del AMPc se da bajo condiciones de saturación en ambos casos.

A este respecto, cabe preguntarse si la breve exposición a la papaverina equivale a la capacitación. A ello contribuiría el hecho, aunado a lo dicho anteriormente, de que el valor de la capacidad amortiguadora de las células capacitadas (disminuido con respecto a las no capacitadas) alcanza niveles similares a los de las células no capacitadas tratadas con papaverina. Asimismo, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el reposo también aumenta en estas últimas, fenómeno observado en las capacitadas aunque en menor magnitud en estas últimas. En contraste, encontramos que la sensibilidad de los CCDV al  $\text{pHi}$  fue mayor en las células capacitadas que las células no capacitadas tratadas con papaverina, lo cual indica que existen otros reguladores bioquímicos (PKA o cinasa de tirosina), presentes en la capacitación que, además del AMPc y sus efectores, afectan a los CCDV haciéndolos más susceptibles al  $\text{pHi}$ .

En este último caso podría activarse una forma del canal sensible a valores de pKa más altos, como se ha sugerido por Fraire-Zamora y González-Martínez (2004).

En el presente estudio, el aumento en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV no se dio mediante la activación de la PKA, demostrado por el hecho de que fue insensible al inhibidor H89. El efecto del H89 más bien se dio en sentido contrario, esto es, estimuló a los CCDV, en consecuencia, la activación de la PKA más bien pudo haber inhibido a los CCDV. La ausencia del efecto inhibitorio del H89 hace suponer que la activación de los CCDV por papaverina se da por vías alternativas, que podrían ser tres: 1) que los canales se estimulen directamente por el AMPc, 2) que en realidad los canales se están estimulando por GMPc y efectores de éste, y no por el AMPc, en virtud de que la acción de la papaverina es inespecífica, y 3) que se esté generando una vía alterna, la del EPAC (EPAC, Exchange Proteins Activated by AMPc). A este respecto, se ha propuesto que la EPAC, que es una familia de factores de intercambio de nucleótidos de guanina regulados por AMPc, media transducción de señales celulares importantes independientes de la activación de la PKA. Recientemente Branham y cols identificaron la presencia de EPAC en el espermatozoide humano y proponen que la vía del EPAC disparada por el AMPc esta involucrada en la cascada de eventos que conducen a la reacción acrosomal, incluyendo la fusión de la membrana acrosomal con la membrana plasmática del espermatozoide (Branham, *et al*, 2006; Holz, *et al*, 2006). Es muy sugerente el hecho de que esta vía sea necesaria para la RA y que a la vez pudiera estimular los CCDV, que han sido postulados en el disparo de la RA inducida por el inductor natural, la ZP3. En un estudio más específico, estudiando los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T en células cromafines de rata, se encontró que el AMPc aumenta la expresión de CCDV tipo T sin alterar la expresión y características de otros canales y que este efecto es imitado cuando se tratan a la células con un agonista de EPAC, sugiriendo la existencia de un reclutamiento de canales tipo T dependiente de EPAC (Novara, *et al*, 2004).

Cabe mencionar que los parámetros medidos durante el estudio y la regulación de los CCDV con papaverina como son el aumento en el pHi y el aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el reposo tampoco fueron sensibles al H89, confirmando que su regulación siguió una vía alterna a la activación de la PKA. Para el caso del pHi, el H89 no produjo alcalinización por sí solo, por lo que su regulación es aún más compleja. Para el mecanismo de regulación del pHi, se ha planteado la existencia de un intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Aitken, *et al*, 1998) y al transporte de  $\text{HCO}_3^-$  como alcalinizante *per se*.

Se considera que la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el reposo y el pHi son centrales en el proceso de capacitación espermática; un sistema de regulación por AMPc independiente de PKA podría dar datos sobre el mecanismo de regulación fisiológica.

Hasta ahora no ha sido posible tipificar el o los CCDV que se abren durante la despolarización inducida con  $\text{K}^+$ , las evidencias farmacológicas no han sido suficientes para establecer que tipo de canales participan en la respuesta. Pero existen evidencias inmunocitoquímicas que sugieren que los espermatozoides humanos tienen CCDV tipo T. La única corriente que se ha detectado en un espermatozoide casi maduro, con gota citoplásmica, es el Catsper1, una forma peculiar de CCDV identificado inicialmente en ratón y que se requiere para la hiperactivación, la motilidad y la fertilidad en esta especie (Kirichok, *et al*, 2006; Ren, *et al*, 2001). Tanto el Catsper1 (Quill, *et al*, 2003) como el canal T (Fraire-Zamora and González-Martínez, 2004) identificado en células espermatogénicas de ratón y humano se estimulan por alcalinización del pHi por lo que es razonable suponer que participarían en las respuestas obtenidas por despolarización con  $\text{K}^+$ , aunque en mucho menor magnitud el canal T (ya que se inactiva en milisegundos y el aumento en el calcio inducido por despolarización se lleva en segundos). Es importante señalar que estos canales se encuentran principalmente en el flagelo e interactúan de manera tal que la presencia del Catsper inhibe al canal T (Zhang, *et al*, 2006). La importancia funcional de este fenómeno se desconoce, aunque cabría especular si la estimulación de los canales y la sensibilidad al pHi reportados, en esta tesis, involucran de alguna manera la interacción de los dos canales.

A este respecto existe evidencia bioquímica (por transferencia de energía de resonancia fluorescente –FRET por sus siglas en inglés) y otras

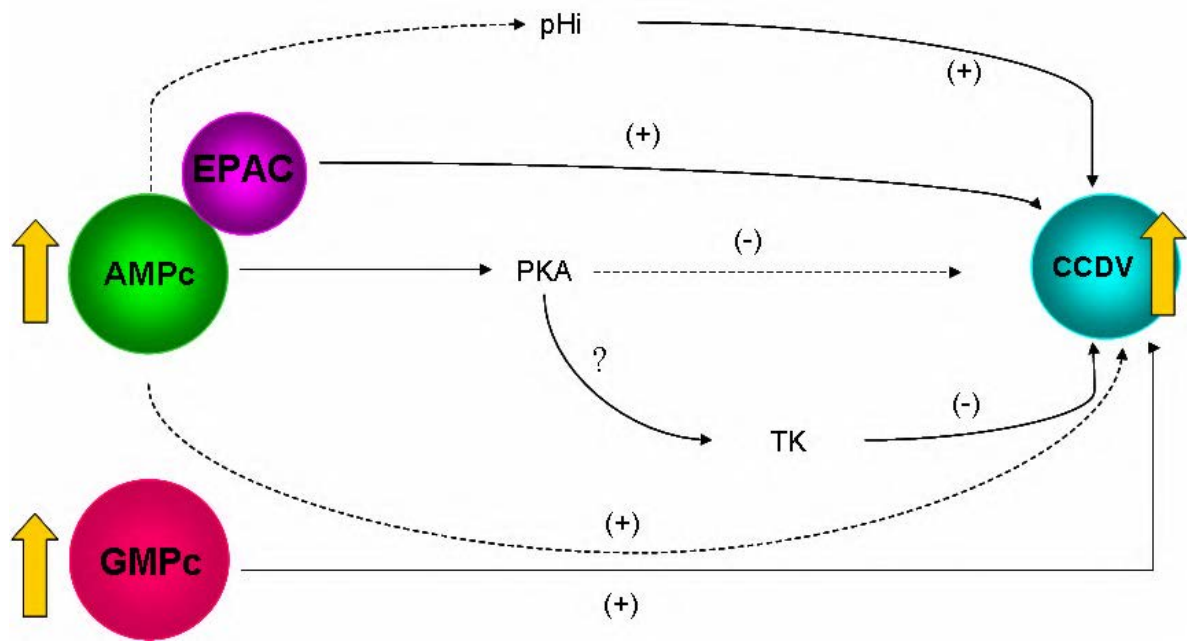


técnicas) (Zhang, *et al*, 2006) que indica que tanto el canal T como Catsper se encuentran íntimamente unidos y como consecuencia la corriente T, medidas en sistemas de expresión, se reduce notablemente.

En resumen, en esta tesis se demuestra que los CCDV en el espermatozoide humano es altamente modulable por efectores asociados a la capacitación como el pHi y el AMPc. Esto le confiere a los CCDV un incremento notable en la sensibilidad al pHi que sugieren cambios conformacionales que favorecen la permeación a  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a despolarización. La relevancia fisiológica de estos hallazgos estriba en el hecho de que el espermatozoide capacitado, al entrar en contacto con la ZP del óvulo, presenta la RA, evento en el que los CCDV juegan un papel central como mecanismo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## VIII CONCLUSIONES:

1. El fura-ff muestra un margen de sensibilidad (micromolar) adecuado para el estudio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en espermatozoides capacitados.
2. En el espermatozoide capacitado la sensibilidad de los CCDV al pHi esta aumentado 7 veces y la capacidad amortiguadora disminuye en comparación con el espermatozoide no capacitado.
3. En el espermatozoide no capacitado la papaverina aumenta la motilidad espermática, bloqueable con H89, y cuadruplica los niveles de AMPc.
4. En el espermatozoide no capacitado la papaverina estimula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV y aumenta la sensibilidad de los CCDV al pHi aunque a menor magnitud que la observada en los espermatozoides capacitados (no tratados con papaverina).
5. En el espermatozoide no capacitado la papaverina estimula los CCDV por un mecanismo independiente de la activación de la PKA. Por el contrario, la activación de la PKA parece inhibirlos (fig. 21)
6. La papaverina alcaliniza el pHi y eleva el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, con respecto al control por mecanismos independientes de la activación de la PKA. También disminuye la capacidad amortiguadora de los espermatozoides no capacitados a valores encontrados en el espermatozoide capacitado.



Modelo propuesto de la posible regulación de los CCDV en el espermatozoide humano por la papaverina. Al incrementar el AMPc por efecto de la papaverina, aumenta la actividad de los CCDV. Observamos que esta activación está acompañada por un aumento en el pH<sub>i</sub> pero que esta activación fue independiente de la activación de PKA y TK. De manera que podrían existir otros mecanismos de activación al aumentar el AMPc por efecto de la papaverina, como podrían ser las proteínas EPAC que actúan independientemente de la activación de PKA o también la participación de GMPc que podría directamente estar aumentando la actividad de los CCDV.

## IX BIBLIOGRAFÍA

- Adeoya-Osiguwa and L Fraser. Fertilization promoting peptide and adenosine acting as first messenger regulate cAMP production and consequent protein tyrosine phosphorylation in a capacitation-dependent manner. *Mol Reprod and Devel.* 2000. 57: 384-392
- Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M and D S Irvine. A novel signal transduction cascade in capacitating characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated phosphorylation. *Journal of Cell Science.* 1998. 111:645-656.
- Aitken R J, Wang Y F, Liu J, Best F and D Richardson. The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int. J. Androl.* 1983. 6:180-193.
- Arnoult C, Zeng Y and H Florman. ZP3-dependant activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell Biol.* 1996. 134: 636-645.
- Bajpai M and G Doncel. Involment of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reproduction.* 2003. 126:183-195.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C and G Forti. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodeling pathways. *Frontiers in Bioscience* 1. 1996. August 15. d189-205.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M and G Forti. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front. In Biosc* 5. 2000. Nov 1. 110-123.

- Banerjee M and M Chowdhury. Induction of capacitation in human spermatozoa in Vitro by an endometrial sialic acid-binding protein. *Hum Reprod.* 1995. 10:3147-3153.
- Banerjee M and M Chowdhury. Localization of a 25kDa human sperm surface protein: its role in in vitro human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod.* 1997. 3:109-114.
- Bedford JM. Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis. 1975. En: Greep R, Hamilton DW, Eds. *Handbook of Physiology. Endocrinology V, section 7.* Waverley Press Inc, Baltimore, 303-317 pp.
- Bjorn S and K Tasken. Specificity in the cAMP signaling pathway, differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front in Biosc.* 5. 2000 August 1. d678-693.
- Blackmore PF and S Eisoldt. The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-type calcium channels in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 1999. 5:498–506.
- Branham MT, Mayorga LS and CN Tomes. Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein Kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *The Journal of Biological Chemistry.* March 31. 2006. 281(13):8656–8666,
- Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cel Endoc.* 2002. 187: 139-144
- Breitbart H, Cohen G and S Rubinstein. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosomal reaction. *Reproduction.* 2005. 129: 263-268.

- Brewis I, Moore H, Fraser L, Holt W, Baldi E, Luconi M, Gadella B, Ford C and R Harrison. Molecular mechanisms during sperm capacitation. *Hum Fert.* Dec. 2005; 8 (4): 253-261.
- Calogero A, Fishel S, Hall J, Ferrara E, Vicari E, Green S, Hunter A, Burrillo N, Thornton S and R D'Agata. Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Human Reproduction.* 1998. 13 (4): 911–915
- Carlson E, Westenbroek E, Quill T, Dejian R, Clapham E, Hille B, Garbers L and F Babcock. *Catsper1* required for evoked  $Ca^{2+}$  entry and control of flagellar function in sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. 100: 14864-14868.
- Chiu P, Man-Kin C, Heng-Yan T, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Kai-Fai L and W Yeung. Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *The J of Biol Chem.* 2005. 280 (27). Issue July 8: 25580-25589.
- Cross N. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 1998. 59:7-11.
- Cross N L and P Razy-Faulkner. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod.* 1997. 56:1169-1174.
- Darszon A, Acevedo J, Galindo B, Hernández-González E, Nishigaki T, Treviño C, Wood C and C Beltran. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduc. Review.* 2006. 131:977-988
- Darszon A, Beltrán C, Felix R, Nishigaki T and C Treviño. Review. Ion transport in sperm signaling. *Development Biol.* 2001. 240:1-14.

- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T and F Espinoza. Ion channels in sperm physiology. *Physiol. Rev.* 1999 79 481-510.
- De Jonge C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update.* 2005. 11(3):205-214.
- Felix R. Molecular physiology and pathology of  $\text{Ca}^{2+}$ -conducting channels in the plasma membrane of mammalian sperm. *Reproduction. Review.* 2005.129:251-262.
- Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C and C O'Toole. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels<sup>1</sup>. *Biology of Reprod.* 1998. 59:12–16
- Fraire-Zamora J J and M T González-Martínez. Effect of intracellular pH on depolarization-evoked calcium influx in human sperm. *Am. J. Physiol, Cell Physiology.* 2004. 287: C1688-C1696.
- Gadella B and R Gestel. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Animal Reprod Science.* 2004. 82-83:307-319.
- Garbers D. L. Molecular basis of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* 1992. 58:719-742.
- González-Martínez MT, Galindo BE, De La Torre L, Zapata O, Rodríguez E, Florman HM and A Darszon. A Sustained increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is required for the acrosome reaction in sea urchin sperm. *Developmental Biology.* 2001. 236:220–229.
- González-Martínez MT, Bonilla-Hernández MA and AM Guzman-Grenfell. Stimulation of voltage-dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm. *Archives in Biochemistry and Biophysics.* 2002. 408: 205-210.

- Gilbert S. *Developmental Biology*. 2003. Seventh Edition. Sinauer Associates, Inc.
- Grizard G, Sion B, Jouanel P, Benoit P and D Boucher. Cholesterol, phospholipids and markers of the function of the accessory sex gland in the semen of men with hipercholesterolaemia. *Int J Androl*. 1995. 18:151-156
- Grynkiewicz G, Poenie M and Y Tiesen. A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem*. 1985. 260: 3440-3450.
- Guzmán-Grenfell AM and MT González-Martínez. Lack of voltaje-dependent calcium channel opening during the calcium influx induced by progesterona in human sperm. Effect of calcium channel deactivation and inactivation. *J. Androl*. 2004. 25: 117-122.
- Hicks JJ, Pedron N and A Rosato. Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens, and follicular fluid. *Fertil. Steril*. 1972. 23:886–893.
- Holz G, Kang G, Harbeck M, Roe M and O Chepurny. Cell physiology of cAMP sensor Epac. *Journal of Physiology*. Sep 2006. 21: 2-26
- Hoskins DD, Hall ML and Munsterman D. Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. *Biol Reprod*. 1975. Sep 13 (2): 168-176
- Jagannathan S, Publicover S and C Barratt. Voltage-operated calcium channels in male germ cells. Review. *Reproduction*. 2002. 123:203-215.
- Ji-Hong L, Yang L, Zheng-Guo C, YE Zhang-Qun. Influences of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate and forskolin on human sperm motility *in vitro*. *Asian J Androl*. 2003. Jun 5: 113-115.



- Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders K and W Yan. Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility. Papers in Press. Published on March 7, 2007 as DOI:10.1095/biolreprod.107.060186
- Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CL and SJ Publicover SJ. Calcium signaling in human spermatozoa: a specialized “toolkit” of channels, transporters and stores. Hum Reprod Update. 2006. May-Jun. 12(3):253-67.
- Kaufman DS, Goligorsky MS, Nord EP and ML Graber. Perturbation of cell pH regulation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in renal epithelial cells. Arch. Biochem. Biophys. 1993. 302: 245–254.
- Kim JA, Park JY, Kang HW, Huh SU, Jeong SW, Lee JH. Augmentation of Cav3.2 T-type calcium channel activity by cAMP-dependent protein kinase A. J Pharmacol Exp Ther. 2006 Jul. 318(1):230-7.
- Kirichok Y, Navarro B and D Clapham. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. Nature. February 2006. Vol 439 (9): 738-740.
- Lamirande E, Leclerc P and C Gagnon. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. Mol Hum Reprod. 1997. 3 (3):175-194.
- Lefièvre L, Jha K, Lamirande E, Visconti P and C Gagnon. Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. Journal of Andrology. Oct 2002. 23(5): 709-715.

- Linares-Hernández L, Guzman-Grenfell AM, Hicks-Gomez JJ and MT González Martínez. Voltaje dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrana potencial. *Biochim. Biophys Acta*. 1998. 1362:1-12.
- Litvin T, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J and L Levin. Kinetic Properties of “Soluble” Adenylyl Cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem*. 2003. 278(18). Issue May 2: 15922–15926,
- Luconi M, Porazzi P, Ferruzzi P, Marchiani G, Forti G and E Baldi. Tyrosine phosphorylation of the kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenylyl cyclase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate. *Biol of Reprod*. 2005. 72: 22-32.
- Martínez-Zaguilán R, Parnami J and G Martinez. Mag-Fura-2 (Furaptra) Exhibits both Low ( $\mu\text{M}$ ) and High (nM) Affinity for  $\text{Ca}^{2+}$ . *Cellular Physiology and Biochemistry*. 1998. 8:158-174
- Morisawa M. Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zool. Sci*. 1994. 11:647-662
- Morisawa M and K Ishida. Short-term changes in levels of cyclic AMP, adenylyl cyclase, and phosphodiesterase during the initiation of sperm motility in rainbow trout. *J. Exp. Zool*. 1987. 242: 199-204.
- Mortimer S, Swan A and D Mortimer. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998. 13 (8):2139-2146.
- Mujica A, Moreno-Rodriguez R, Naciff J, Neri L and JS Tash. Glucosa regulation of guinea-pig sperm motility. *J Reprod Fert*. 1991. May 92 (1): 75-87.

- Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Giancippoli A and E Carbone. Exposure to cAMP and  $\beta$ -adrenergic stimulation recruits  $Ca_v3$  T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J Physiol.* 2004. 558(2): 433-449
- O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, and RA Steinhardt and HM Florman.  $Ca(2+)$  entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell.* 2000.11:1571–1584.
- Okamura N, Tanbaa M, Fukuda A, Sugita Y and T Nagaib. Forskolin stimulates porcine sperm capacitation by increasing calcium uptake. February 1993. 316 (3): 283-286
- OMS. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. 2001. Edit. Médica Panamericana. 4ta edición. España.152 pp.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE and DLGarbers. Hyperactivated sperm motility driven by *Catsper2* is required for fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. 100:14869–14874.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson A, Hsu S, Shi Q, Tilly J and D Clapham. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 2001 Oct. 413(11):603-609.
- Robaire B and L Hermo. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions, and their regulation. 1988 En: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction.* 2a. Ed. Raven Press Ltd, New York, 999-1080 pp.

- Rupasri A, Devi U, Shivaji S and PB Seshagiri. Pentoxifylline-stimulates capacitation and acrosome reaction in hamster spermatozoa: involvement of intracellular signaling molecules. *Mol Hum Reprod.* 1999. 5 (7): 618-629
- Santi C, Darszon A and A Cruz-Hernández. A dihydropyridine-sensitive T-type  $Ca^{2+}$  current is the main  $Ca^{2+}$  current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am. J. Physiol.* 1996. 271: C1583-C1593
- Tesarik J, Moos J and C Mendoza. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology.* 1993. 133: 328-335.
- Treviño CL, Felix R, Castellano LE, Gutierrez C, Rodríguez D, Pacheco J, Lopez-Gonzalez I, Gomora JC, Tsutsumi V, Hernandez-Cruz A, Fiordeliso T, Scaling AL, and A Darszon. Expresión and differential cell distribution of low-threshold  $Ca(2+)$  channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett.* 2004. 563:87–92.
- Urner F and D Sakkas. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction.* 2003. 125:17-26.
- Visconti PE, Johnson LR, Oyaski M, Fornes M, Moss SB, Gerton GL and Kopf GS. Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev Biol.* 1997. 192:351–363.
- Visconti P and G Kopf. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 1998. 59: 1-6
- Visconti P, Stewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf G and J Tezo'n. Roles of Bicarbonate, cAMP, and Protein Tyrosine Phosphorylation on Capacitation and the Spontaneous Acrosome Reaction of Hamster Sperm. *Biology of Reprod.* 1999. 61:76–84

- Wennemuth G, Carlson AE, Harper AJ and D Babcock. Bicarbonate actions on flagellar and Ca<sup>2+</sup>-channel responses: initial events in sperm activation. *Development*. 2003. 130: 1317-1326.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In *Physiology of Reproduction*, Knobil E and Neils D. Eds. Raven Press, NY. pp 189-217.
- Yanagimachi R. and N. Usui. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of ginea pig spermatozoa. *Ex. Cell Res*. 1974. 89:161-174
- Zhang D, Chen J, Saraf A, Cassar S, Han P, Rogers J, Brioni J, Sullivan J and M Gopalakrishnan. Association of Catsper1 or -2 with Ca<sub>v</sub>3.3. leads to suppression of T-type calcium channel activity. *Journal of Biol Chemistry*. 2006 August 4. 281(31): 22332-22341.

## A remarkable increase in the pHi sensitivity of voltage-dependent calcium channels occurs in human sperm incubated in capacitating conditions

Paloma del Carmen Neri-Vidaurre, Víctor Torres-Flores, Marco T. González-Martínez \*

*Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, Apartado Postal 70-297 México, D.F., México*

Received 8 February 2006

Available online 28 February 2006

### Abstract

Human sperm are endowed with voltage-dependent calcium channels (VDCC) that produce increases in  $[Ca^{2+}]_i$  in response to depolarization with KCl. These channels are stimulated during “capacitation”, a complex biochemical process, accompanied by a slight pHi alkalization, that sperm must accomplish to acquire the ability to fertilize the egg. The stimulation can be explained in part by the fact that in non-capacitated sperm, calcium influx through VDCC is stimulated by pHi alkalization in the range of pHi observed during capacitation. In this work, we explored the effect of pHi on VDCC in capacitated sperm loaded with fura ff. Strikingly, the pHi sensitivity of VDCC increased ~7-fold when sperm was capacitated, as compared with non-capacitated sperm. This finding suggests that the pHi sensitivity of VDCC can be modulated during capacitation so that a combined effect of pHi alkalization and biochemical regulation enhances calcium influx through these channels.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Human sperm; Capacitation; Intracellular pH; Intracellular calcium; Fura ff; VDCC

In sperm of mammalian species, the modulation of the intracellular calcium concentration  $[Ca^{2+}]_i$  is fundamental to understand the mechanism involved in specific aspects of sperm physiology, such as the so-called “capacitation” and the subsequent acrosome reaction (AR) [1]. Capacitation is a calcium-dependent process that occurs in hours in the female genital tract, or in vitro in defined media, and is related to a myriad of biochemical changes [2]. These changes result in outstanding increases in cAMP content and the ensuing PKA activation [3], and in an increase in tyrosine kinase activity [4]. During the process, there is also a small but consistent alkalization of the intracellular pH (pHi) of ~0.15 pHi units [5]. Once capacitated, sperm is capable to respond to ZP3, an egg zona pellucida glycoprotein, increasing the  $[Ca^{2+}]_i$  transiently and consequently

undergoing the AR, a process that permits sperm to cross the zona pellucida and fuse the egg.

The calcium entry mechanisms induced by ZP3 have been extensively studied in mouse sperm. ZP3 would trigger a still unidentified ionic flux that would produce depolarization in capacitated sperm and consequently, gating of T-type voltage-dependent calcium channels (VDCC), which have been detected by patch clamp in mouse spermatocytes [6,7]. The gating of the T-type VDCC would produce a transient (milliseconds) peak of calcium in the micromolar range detected in mag-fura loaded capacitated mouse sperm [8]. In seconds, ZP3 would stimulate IP3 production that would empty the calcium content of the acrosome and hence, activate store-operated calcium channels [9] present in the plasma membrane near to the acrosome. As a result, a small but sustained  $[Ca^{2+}]_i$  increase would be established causing AR.

In human sperm, we have detected putative VDCC [10] that would reasonably play the role of the T-type VDCC

\* Corresponding author. Fax: +5255 5616 1489.

E-mail address: [tuliog@servidor.unam.mx](mailto:tuliog@servidor.unam.mx) (M.T. González-Martínez).

proposed for mouse sperm. These channels have been functionally detected in fura 2-loaded sperm via the increase in intracellular calcium induced by potassium depolarization in the presence of the potassium ionophore valinomycin [10]. These putative channels are insensitive to nifedipine [10], but sensitive to mibefradil [11] and nickel [10,12]. Furthermore, they inactivate in  $\sim 90$  s in calcium deprived medium [10] and are stimulated by pHi alkalization in a narrow range of pHi [12]. The calcium influx through these channels are stimulated during sperm capacitation, a phenomenon that may have an important physiological significance [12,13]. This stimulation may be explained in part by the alkalization observed in human sperm during capacitation. Indeed, according to the pHi sensitivity of human sperm VDCC, the increase in pHi alkalization observed during capacitation (of  $\sim 0.15$  pHi units) would contribute to  $\sim 30\%$  of the stimulation observed during this process [12]. This suggests that besides the pHi alkalization, other biochemical regulators that activate during capacitation may modify the channels so that the calcium permeation increases.

In this work, we examined the pHi sensitivity of VDCC of human sperm incubated in capacitating medium. To do this, we loaded the cells with fura ff, a low affinity calcium detector that allowed to detect reliable intracellular calcium increases that occurred in the micromolar range. We report that small pHi alkalization pulses remarkably stimulated VDCC in capacitated sperm and that the pHi-sensitivity of these channels increased nearly 7-fold, as compared with non-capacitated cells. This effect suggests that biochemical regulators activated during capacitation act on VDCC producing an increase in their sensitivity to pHi in human sperm.

## Materials and methods

**Materials and media.** Fura ff-AM was obtained from Molecular probes. The other reagents were obtained from SIGMA. Hepes-buffered human sperm medium (H-HSM), originally proposed by Suarez et al. [14], had the following composition (in mM): NaCl 117.5, KCl 8.6, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, MgCl<sub>2</sub> 0.49, Na-pyruvate 0.3, Na-lactate 19, glucose 2, and 25 Hepes-Na (pH 7.6). Capacitating medium (cap-HSM) had the same salt composition except that Hepes was lowered to 15 mM and it was supplemented with 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 3 mg/ml BSA (Sigma, fraction V). The pH was adjusted to 7.6 with NaOH.

**Sperm purification, dye loading and capacitation.** Human semen was obtained from a panel of seven, 18–31-year-old, donors. Sperm purification was performed using Percoll gradients according to [14]. For intracellular calcium measurements, purified sperm ( $0.6\text{--}1.5 \times 10^8$  cells) were loaded with 5  $\mu\text{M}$  fura ff in 1 ml H-HSM medium at 36 °C for 40 min. The sample was washed by centrifugation and the cells scattered in disposable centrifuge tubes at  $\sim 1 \times 10^7$  cells in 3 ml of either H-HSM (for non-capacitated sperm) or cap-HSM (for capacitated sperm) and maintained at 36 °C. Sperm incubated in non-capacitating medium (H-HSM) were immediately used for fluorescence recordings. To capacitate, sperm diluted in cap-HSM were incubated for 4 h at 36 °C.

To detect pHi, fura ff-loaded sperm were loaded with 1  $\mu\text{M}$  BCECF-AM for 30 min. For pHi measurements in non-capacitated sperm, BCECF-AM was added during sperm incubation with fura ff-AM, 10 min after starting incubation with fura ff-AM. As for capacitated cells, BCECF-AM was added during capacitation of fura ff-loaded sperm, 30 min before completing the 4 h incubation time in cap-HSM medium.

**Measurement and calibration of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .** An aliquot of fura ff-loaded sperm (containing  $\sim 1 \times 10^7$  cells), incubated either in capacitating or in non-capacitating medium, was centrifuged and the pellet added to the fluorescence cell containing 2.5 ml H-HSM, supplemented with 5 mM NaHCO<sub>3</sub> [12], at 36 °C and under constant magnetic stirring. Fluorescence was measured with a PTI fluorometer (Photon technology International) with a 488 nm optical interference filter, exciting alternately at 340 and 380 nm with the PTI monochromator. Ratios 340/380 were acquired and digitalized at 0.86 Hz. The ratios were converted to intracellular calcium concentration by using the Grynkiewicz equation [15], using a  $K_d = 5.5 \mu\text{M}$  (value provided by the manufacturer, Molecular probes).

**Measurement and calibration of pHi.** Sperm loaded with BCECF and fura ff were poured into the fluorescence cell following the procedure described for intracellular calcium measurements. The fluorescence was detected at 550 nm, exciting alternately at 500 and 439 nm. Calibration was performed according to [12]. Briefly, at the end of each trace, 0.1% Triton X-100 was added to permeabilize the cells, increasing the ratio values to a value corresponding to pH 7.6 (the pH of the medium) (not shown). Then, the pH was acidified with different amounts of HCl and the measured pH values (determined with a conventional pH meter) were compared with the corresponding ratio values. These data were analyzed with the Felix software of PTI to convert ratios to pH values.

**Assessment of voltage-dependent calcium influx.** Voltage-dependent calcium influx was triggered by adding 30 mM KCl, 1 min after the potassium ionophore valinomycin (0.8  $\mu\text{M}$ ). Valinomycin makes the membrane potential mainly dependent on potassium permeability and, according to the Nernst potential for K distribution, brings the membrane potential from resting  $\sim -40$  mV to  $\sim -71$  mV [10]. Addition of 30 mM KCl depolarizes the membrane to  $\sim -30$  mV and induces a transient calcium influx. The difference of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  at the peak minus resting was considered calcium influx through VDCC [12].

## Results

The effect of intracellular alkalization on the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase induced by depolarization, from  $\sim -71$  to  $\sim -30$  mV, in non-capacitated and capacitated sperm is shown in Fig. 1. In non-capacitated cells, at physiological pHi (no ammonium added), the calcium influx induced by depolarization was easily detected in spite of the fact that the  $K_d$  of fura ff-calcium complex ( $K_d = 5.5 \mu\text{M}$ ) is 20-fold higher as compared with fura 2 ( $K_d = 260$  nM), the calcium detector that we have previously used [10,12,13]. The voltage-dependent calcium influx detected with fura ff was  $1.18 \pm 0.14 \mu\text{M}$ , a value that was much higher than that detected in fura 2-loaded cells (close to  $0.35 \mu\text{M}$ ) [12]. Furthermore, the stimulation of the intracellular calcium increase induced by depolarization in capacitated cells was also higher than expected (Figs. 1A and B). In previous experiments made with fura 2-loaded cells, the estimated stimulation reached values around  $0.6\text{--}0.9 \mu\text{M}$  [12,13] whereas that in experiments reported here in fura ff-loaded cells the calcium influx was  $4.89 \pm 0.53 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ , SE). These discrepancies may reflect that  $K_d$  values for fura ff and/or fura 2 within sperm are inaccurate. However, the use of fura ff evidently improved the measurement at high intracellular calcium values (micromolar range) and also provided reasonable calibration values at a low range  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Given that the results obtained with fura ff were qualitatively similar to those obtained with fura 2, we considered convenient to continue the use of fura ff to detect the effect of pHi alkalization in capacitated sperm.

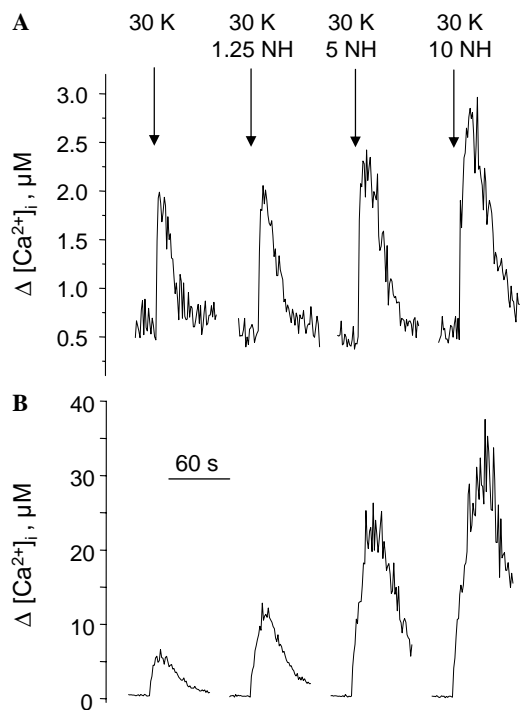


Fig. 1. Effect of ammonium on the calcium influx induced by depolarization in both non-capacitated (A) and capacitated (B) human sperm. Fura ff-loaded sperm were poured in 2.5 ml H-HSM supplemented with 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , thermostated at  $36^\circ\text{C}$  and under constant magnetic stirring. The sample was incubated for 1 min to allow stabilization and then  $0.8\ \mu\text{M}$  valinomycin was added to make the membrane potential sensitive to potassium (not shown in trace). One minute later, voltage-dependent calcium influx (from  $\sim -71$  to  $\sim -30$  mV) was triggered with 30 mM KCl (K) or 30 mM KCl + 1.25, 5.0, or 10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (NH), as indicated. The traces are representative of five different human sperm samples (see statistics in Fig. 3). The series of traces, both in non-capacitated and capacitated cells, were performed in a lapse of time of  $\sim 25$  min.

The effect of pHi on sperm VDCC was compared by co-adding, 1 min after valinomycin, 30 mM KCl plus either 1.25, 5.0, or 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . These concentrations site on the nearly linear relationship between voltage-dependent calcium influx and pHi (that has an apparent  $\text{pK}_a \sim 7.00$ ) observed in non-capacitated sperm [12]. In non-capacitated cells, the stimulation of the calcium influx depended on the ammonium added and was nearly duplicated by the addition of 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , an effect that was consistent with previous experiments made with fura 2-loaded cells [12] (Fig. 1A). Strikingly, in capacitated sperm the effect of identical amounts of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  produced a marked over stimulation of the voltage-dependent calcium influx (Fig. 1B).

To compare the effect of pHi alkalization on the voltage-dependent calcium influx in capacitated and non-capacitated sperm, we determined the effect of ammonium on the pHi on both group of cells. Figs. 2A and B show that ammonium produced a higher alkalization in capacitated cells as compared with non-capacitated cells. This effect could be related to the fact that, in agreement with previous studies [5,12], the resting pHi in capacitated cells ( $6.80 \pm 0.02$ ,  $n = 5$  SE) was

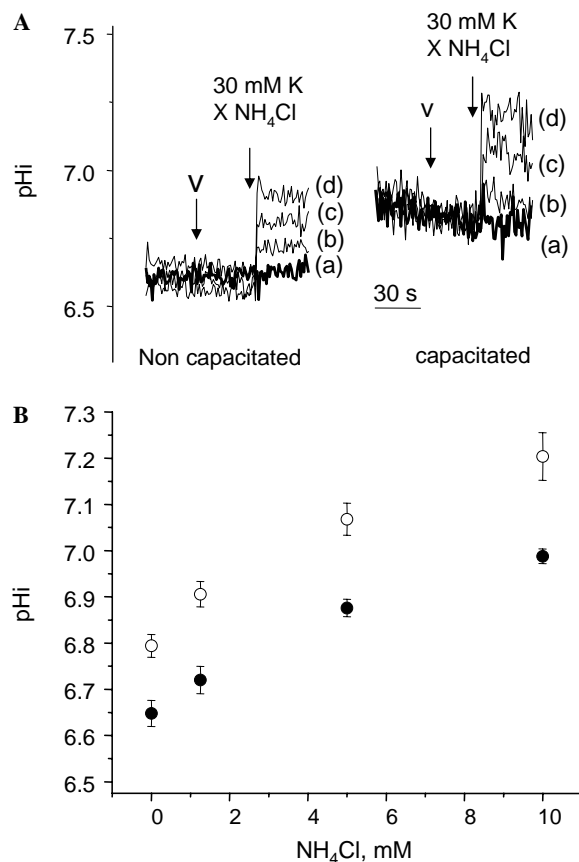


Fig. 2. Effect of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  on the pHi of non-capacitated and capacitated human sperm. Either non-capacitated or capacitated fura ff-loaded sperm were loaded with BCECF-AM as described in Materials and methods. Once washed, sperm pellets were poured in the fluorescence cell containing 2.5 ml H-HSM medium + 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ . In (A)  $0.8\ \mu\text{M}$  valinomycin followed by 30 mM KCl (traces a, in bold) or by mixtures of 30 mM KCl + 1.25 (traces b), 5.0 (traces c), or 10.0 mM (traces d)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was added to non-capacitated (traces at left) or capacitated (traces at right) human sperm. In (B) pHi reached upon  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -KCl additions as a function of  $[\text{NH}_4\text{Cl}]$  in non-capacitated (closed circles) and capacitated (open circles) human sperm. The pHi was the average of 30 s recording (A) collected after  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -KCl additions. All data are means  $\pm$  SE,  $n = 5$  individuals.

$0.15$  pHi units more alkaline than in non-capacitated cells ( $6.65 \pm 0.03$ ,  $n = 5$  SE). Fig. 3 shows the effect of pHi on VDCC of capacitated and non-capacitated sperm. The curves show that the effect of pHi on sperm VDCC is notably enhanced in sperm incubated in capacitating conditions. In capacitated cells, the voltage-dependent calcium influx over intracellular pHi was approximately  $\sim 49\ \mu\text{M}/\text{pHi}$  unit whereas that in non-capacitated sperm was  $\sim 6.7\ \mu\text{M}/\text{pHi}$  unit. Thus, in human sperm the sensitivity of VDCC to pHi increased nearly 7-fold after 4 h incubation in capacitating conditions.

## Discussion

Results presented here suggest that calcium influx through VDCC can be greatly potentiated by a combined effect of capacitation and pHi alkalization in human sperm.



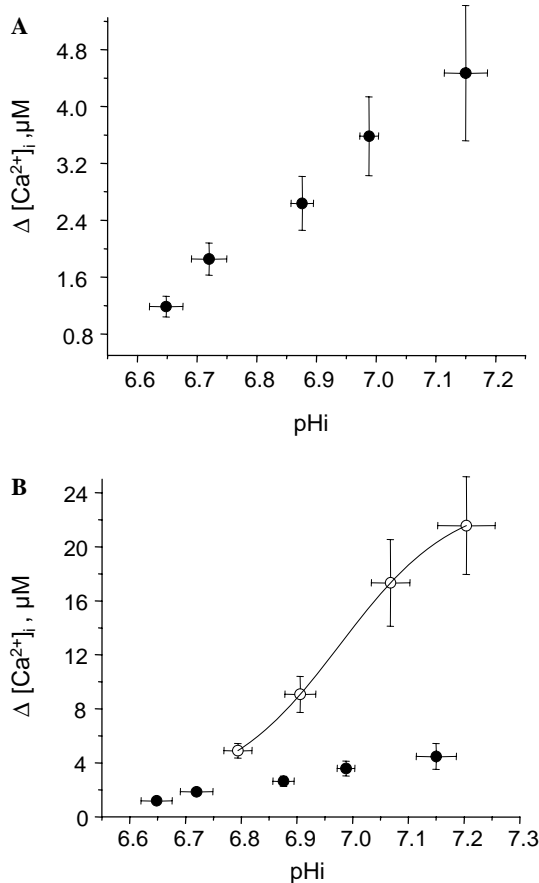


Fig. 3. Voltage-dependent calcium influx as a function of pHi in non-capacitated and capacitated human sperm loaded with fura ff. The  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  was obtained from the difference between the calcium peak induced by 30 mM KCl or by 30 mM KCl + 1.25, 5.0, or 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  minus resting  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  obtained from records depicted in Fig. 1. The pHi and  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  values were compared using samples of the same sperm donor. (A) Curve corresponding to non-capacitated sperm samples. An additional experiment (mean  $\pm$  SE,  $n = 4$ ), made with 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pHi  $\sim 7.15$ ), was included to the plot to better compare the effect of pHi on both groups of sperm (see next). The rest of data are means  $\pm$  SE with  $n = 5$  individuals. (B) Curve corresponding to the same samples incubated in capacitating conditions (open circles). Non-capacitated sperm values (closed circles) from (A) are included for comparison.

It is important to note that the type of the calcium channels gated during the  $K$ -induced depolarization has not been determined yet. Pharmacological evidence has not been sufficient to establish, undoubtedly, what kind of channels participate in the response. Nevertheless, immunochemical evidence suggests the presence of T-type VDCC in human sperm [16]. Furthermore, mammalian sperm are endowed with CatSper 1, a peculiar form of VDCC identified in mouse sperm that is required for hyperactivation of mouse sperm motility [17,18] and that is also related to motility deficiency of human sperm [19]. Thus, it is reasonable that the calcium influx induced by depolarization with potassium would activate these channels. It is important to note that T, N, and L-type VDCC, detected by patch clamp in other cells, are sensitive to pHi, stimulating their activity at alkaline values [20–24], an effect that may involve the

$\beta$  subunit (in L-type channels) [20]. Here, we show evidence that the pHi sensitivity of VDCC may depend on the physiological condition of the cell. It is possible that biochemical regulators, such as cAMP, PKA or tyrosine kinases, which increase during sperm capacitation [3,4], produce changes in these channels resulting in the observed increase in pHi sensitivity.

Given the proposed participation of VDCC in the AR induced by the egg zona pellucida ZP3, we consider that the increase in pHi sensitivity of VDCC reported here may be significant in the mechanism by which ZP3 induces AR only in capacitated sperm.

### Acknowledgments

This work was supported by Grant IN213105 from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la D.G.A.P.A., UNAM.

### References

- [1] A. Darszon, T. Nishigaki, C. Wood, C.L. Trevino, R. Felix, C. Beltran, Calcium channels and  $\text{Ca}^{2+}$  fluctuations in sperm physiology, *Int. Rev. Cytol.* 243 (2005) 79–172.
- [2] E. Baldi, M. Luconi, L. Bonaccorsi, G. Forti, Signal transduction pathways in human spermatozoa, *J. Reprod. Immunol.* 53 (2002) 121–131.
- [3] M. Luconi, I. Porazzi, P. Ferruzzi, S. Marchiani, G. Forti, E. Baldi, Tyrosine phosphorylation of the a kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenylylase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate, *Biol. Reprod.* 72 (2005) 22–32.
- [4] J.E. Osheroff, P.E. Visconti, J.P. Valenzuela, A.J. Travis, J. Alvarez, G.S. Kopf, Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation, *Mol. Hum. Reprod.* 5 (1999) 1017–1026.
- [5] N.L. Cross, P. Razy-Faulkner, Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone, *Biol. Reprod.* 56 (1997) 1169–1174.
- [6] C.M. Santi, A. Darszon, A. Hernandez-Cruz, A dihydropyridine-sensitive T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current is the main  $\text{Ca}^{2+}$  current carrier in mouse primary spermatocytes, *Am. J. Physiol.* 271 (1996) C1583–C1593.
- [7] C. Arnoult, R.A. Cardullo, J.R. Lemos, H.M. Florman, Activation of mouse sperm T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by adhesion to the egg zona pellucida, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 13004–13009.
- [8] C. Arnoult, I.G. Kazam, P.E. Visconti, G.S. Kopf, M. Villaz, H.M. Florman, Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 6757–6762.
- [9] C.M. O’Toole, C. Arnoult, A. Darszon, R.A. Steinhardt, H.M. Florman,  $\text{Ca}^{2+}$  entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction, *Mol. Biol. Cell.* 11 (2000) 1571–1584.
- [10] L. Linares-Hernández, A.M. Guzman-Grenfell, J.J. Hicks-Gomez, M.T. González-Martínez, Voltage dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous detection of intracellular calcium and membrane potential, *Biochim. Biophys. Acta* 1372 (1998) 1–12.
- [11] P.F. Blackmore, S. Eisoldt, The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-type calcium channels in human spermatozoa, *Mol. Hum. Reprod.* 5 (1999) 498–506.
- [12] J.J. Fraire-Zamora, M.T. González-Martínez, Effect of intracellular pH on the depolarization-evoked calcium influx in human sperm, *Am. J. Physiol.* 287 (2004) C1688–C1696.

- [13] M.T. González-Martínez, M.A. Bonilla-Hernández, A.M. Guzmán-Grenfell, Stimulation of voltage dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm, *Arch. Biochem. Biophys.* 408 (2002) 205–210.
- [14] S.S. Suarez, D.P. Wolf, S. Meizel, Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid, *Gamete Res.* 14 (1986) 107–121.
- [15] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440–3450.
- [16] C.L. Trevino, R. Felix, L.E. Castellano, C. Gutierrez, D. Rodriguez, J. Pacheco, I. Lopez-Gonzalez, J.C. Gomora, V. Tsutsumi, A. Hernandez-Cruz, T. Fiordeliso, A.L. Scaling, A. Darszon, Expression and differential cell distribution of low-threshold  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mammalian male germ cells and sperm, *FEBS Lett.* 563 (2004) 87–92.
- [17] A.E. Carlson, R.E. Westenbroek, T. Quill, D. Ren, D.E. Clapham, B. Hille, D.L. Garbers, D.F. Babcock, CatSper1 required for evoked  $\text{Ca}^{2+}$  entry and control of flagellar function in sperm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 14864–14868.
- [18] T.A. Quill, S.A. Sugden, K.L. Rossi, L.K. Doolittle, R.E. Hammer, D.L. Garbers, Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 14869–14874.
- [19] P. Nikpoor, S.J. Mowla, M. Movahedin, S.A. Ziaee, T. Tiraihi, CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility, *Hum. Reprod.* 19 (2004) 124–128.
- [20] K. Schuhmann, C. Voelker, G.F. Hofer, H. Pflugelmeier, N. Klugbauer, F. Hofmann, C. Romanin, K. Groschner, Essential role of the beta subunit in modulation of C-class L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by intracellular pH, *FEBS Lett.* 408 (1997) 75–80.
- [21] L. Kiss, S.J. Korn, Modulation of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by intracellular pH in chick sensory neurons, *J. Neurophysiol.* 81 (1999) 1839–1847.
- [22] G.C. Tombaugh, G.G. Somjen, Differential sensitivity to intracellular pH among high and low-threshold  $\text{Ca}^{2+}$  currents in isolated rat CA1 neurons, *J. Neurophysiol.* 77 (1997) 639–653.
- [23] M. Yamakage, K.S. Lindeman, C.A. Hirshman, T.L. Croxton, Intracellular pH regulates voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in porcine tracheal smooth muscle cells, *Am. J. Physiol.* 268 (1995) L642–L646.
- [24] C.M. Santi, T. Santos, A. Hernández-Cruz, A. Darszon, Properties of a novel pH-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  permeation pathway present in germ cells with possible roles in spermiogenesis and mature sperm function, *J. Gen. Physiol.* 112 (1998) 33–53.