



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

*"EFECTO INHIBITORIO DEL MIBEFRADIL EN EL
INFLUJO DE CALCIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE
EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO".*

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:
ALARCÓN KENELL FERNANDO ISRAEL



DIRECTOR: DR. MARCO TULIO GONZÁLEZ MARTÍNEZ
ASESORA: DRA. CONSUELO RUBIO PÓO

ELABORADA EN EL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM





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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres (Ruperto y Hortencia), por todo ese esfuerzo que hicieron por mi, por convertirme en un hombre de bien y darme no solo una carrera, si no una vida.

A mis hermanitos (Anabel, Oscar y Fabián), por ser tan comprensivos, a su lado tengo tantos recuerdos niños traviesos.

A mi familia por darme tantas enseñanzas en la vida, gracias abueluchis.

A Tania por mostrarme el verdadero amor, y acompañarme en esos instantes tan lindos.

Al Dr. Marco Tulio por brindarme la confianza y apoyo que tanto he necesitado, por aceptarme como su alumno y por sus enseñanzas.

A Víctor por su invaluable ayuda en el desarrollo de esta tesis y por la amistad que me ha brindado y a todos en el laboratorio de biomembranas

Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

TEMA	PÁG.
1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	4
4.1 Estructura del espermatozoide	4
4.2 Motilidad e hiperactivación	7
4.3 Capacitación	8
4.4 Reacción acrosomal	9
4.5 Papel del calcio en la función del espermatozoide	
Humano	11
4.6 Canales de calcio dependiente de voltaje en el	
Espermatozoide humano	12
4.7 Efecto del mibefradil en los CCDV del espermatozoide	
Humano	14
5. HIPOTESIS	17

1. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico
BCECF-AM: 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y 6)-carboxifluoresceína, acetoximetil éster
BSA: albúmina sérica bovina
CaCl₂: Cloruro de calcio
CCDV: Canales de calcio dependientes de voltaje
DiSC3(5): Yoduro de 3,3'-diisopropiltiocarbocianina
DMSO: Dimetilsulfóxido
E: potencial de Nernst
EGTA: Etilenglicol-bis(□-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra-acetato
f_{380f}: Fluorescencia excitada a 380 libre de sodio
f_{380b}: Fluorescencia excitada a 380 unida a sodio
f_{340f}: Fluorescencia excitada a 340 libre de sodio
f_{340b}: Fluorescencia excitada a 340 unida a sodio
fura FF-AM: fura FF acetoximetil ester.
HEPES: N-(2-hidroxiethyl)piperizina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)
H-HSM: Medio de Hepes para espermatozoide humano
Hz: Hertz
KCl: Cloruro de potasio
Kd: Constante de disociación
Mg₂Cl: Cloruro de magnesio
MI-HSM: Medio intracelular para espermatozoide humano
mm: Milímetros
mM: Milimolar
mL: Mililitros
μL: Microlitros
μm: Micrómetros
μM: Micromolar
mV: Milivolts
n: Número de experimentos (uno por cada individuo).
NaCl: Cloruro de sodio
NaH₂PO₄: Fosfato ácido de sodio
Na_i: Sodio intracelular
NaOH: Hidróxido de sodio
nM: Nanomolar
nm: nanómetros
PTI: Photon Technology International
Percoll: Sílica recubierta de polivinilpirrolidona coloidal
pHi: pH intracelular.
RA: Reacción acrosomal
rpm: Revoluciones por minuto
SBFI-AM: Acetoximetil éster de isoftalato de benzofurano
SBFI-Na: Isoftalato de benzofurano unido a sodio
SOC: Canales de calcio operados por vaciamiento de posas internas
TRIZMA: Tris(hidroximetil)aminometano
ZP3: Glicoproteína de la zona pelúcida 3.

2. RESUMEN.

En el laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM se llevó a cabo el estudio del efecto inhibitorio del mibefradil en la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje en el espermatozoide humano, utilizando técnicas de fluorescencia, durante el periodo comprendido entre Junio del 2006 a Enero del 2007. La determinación de los mecanismos de entrada de calcio al interior del espermatozoide es importante ya que desempeña un papel determinante en las funciones celulares como la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosomal. En este sentido, se ha observado que el espermatozoide presenta una entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), siendo esencial esta entrada en las funciones del espermatozoide. En el presente estudio investigamos, en muestras de espermatozoides de seis donadores sanos de 20 a 35 años de edad, el efecto inhibitorio que tiene el mibefradil en la entrada de calcio al interior del espermatozoide y parte de la caracterización de dicho efecto. Para ello, se montó una técnica para medir calcio intracelular con un indicador fluorescente. La concentración de calcio intracelular, el potencial de membrana y el pH_i se detectaron con los indicadores fluorescentes fura ff, diSC3(5) y el BCECF, respectivamente. Se indujo despolarización en estas células en presencia de valinomicina, un ionóforo de K que fija el potencial de membrana al potencial de equilibrio de potasio (potencial de Nernst de K) y se indujo despolarización de -71 -30 mV con K. La entrada de calcio resultante se detectó como un incremento en el calcio intracelular. El mibefradil produjo un bloqueo total a una concentración de 10 μ M. Este bloqueo fue reversible, se produjo en condiciones de activación

exclusivamente de CCDV tipo T y en los que se activan los T y los L. El bloqueo se produjo con una IC50 de 2.01 μM y siguió un comportamiento monoexponencial. El pHi no se alteró durante el bloqueo. Estos resultados indicaron que la entrada de calcio dependiente de voltaje la produce un solo tipo de canal de calcio, posiblemente un canal de calcio tipo T.

3. INTRODUCCIÓN.

La aparición de la reproducción sexual causó una enorme ventaja adaptativa y evolutiva en la generación de nuevos individuos los cuales adquirieron características genéticas heredadas de ambos progenitores, para establecerse con mayor facilidad al medio ambiente. Este proceso biológico denominado fertilización requirió la fusión de una célula germinal madura femenina y una masculina: el óvulo y el espermatozoide.

En el hombre, bajo la influencia de la FSH (hormona folículo estimulante) y de los andrógenos intra-testiculares, en los túbulos seminíferos tiene lugar la espermatogénesis. Este proceso que consiste en la división sucesiva de una célula progenitora (espermatogonia) da lugar a una serie de cambios morfológicos y de reorganización de organelos que lleva a la formación de los espermátocitos primarios (figura 1). Estas células entran en la primera división meiótica ocasionando la formación de los llamados espermátocitos secundarios. Estas células experimentan una segunda división meiótica que lleva a la formación de las espermátidas haploides. De aquí, se lleva a cabo otro fenómeno llamado espermiogénesis, en donde las espermátidas eliminan todos los componentes celulares no requeridos para la fertilización,

desarrollando finalmente un espermatozoide haploide y morfológicamente maduro con una forma hidrodinámica.

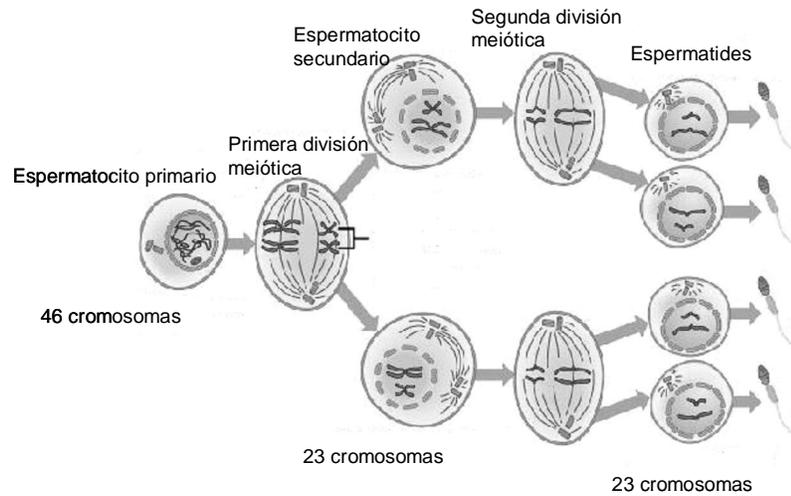


Figura 1. Espermatogénesis, el espermatocito primario con 46 cromosomas sufre una primera división meiótica para dar lugar a dos espermatocitos con 23 pares de cromosomas, estos a su vez sufren una segunda división meiótica para dar lugar a 4 espermatidas con 23 cromosomas cada una, estas espermatidas madurarán para dar lugar a la formación de los espermatozoides. Figura tomada de www.bioatividades.hpg.ig.com.

4. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

4.1 Estructura del espermatozoide

El espermatozoide se compone de una cola o flagelo, el cual tiene un arreglo axonemal de "9+2" (arreglo en el cual la estructura del flagelo en su parte más interna está constituida de nueve pares de microtúbulos que rodean a un par central de microtúbulos), común de eucariontes; una pieza media o cuello, donde se localizan las mitocondrias; y la cabeza que alberga dos centríolos, un núcleo muy compactado y el acrosoma.

En la cabeza del espermatozoide se encuentra el núcleo que ocupa la mayor parte de ella, en el núcleo se encuentra la información genética paterna. El acrosoma es una estructura localizada en el extremo apical, la constituye una vesícula rodeada por una membrana acrosomal externa cerca de la membrana plasmática de la cabeza y una membrana acrosomal interna sobre la membrana nuclear (figura 2). En el acrosoma se encuentran las enzimas hidrolíticas que, en su momento, se encargan de degradar la zona pelúcida del óvulo. La parte intermedia es la que une el flagelo con la cabeza, en esta se encuentran las mitocondrias, que aportan energía al espermatozoide. El flagelo es el responsable del movimiento del espermatozoide, en el se encuentra contenido el axonema, que es la estructura encargada del movimiento flagelar. Esta última estructura está formada por microtúbulos que se agrupan en pares o dobletes, se distribuyen en un doblete central y nueve dobletes periféricos, el clásico arreglo "9+2". El flagelo a su vez se divide en dos partes, la primera la parte principal del flagelo de ~ 45 μm de largo y la pieza o parte terminal de ~ 2 μm de largo.

En los mamíferos, antes de realizarse la fecundación, se llevan a cabo fenómenos que inician con la liberación del óvulo y su viaje a través del oviducto y, por otro lado, con el viaje que realiza el espermatozoide eyaculado hasta alcanzar el óvulo. El espermatozoide debe cumplir con varios requisitos que le permitirán fecundar. El espermatozoide eyaculado y depositado en el tracto genital femenino no es capaz de fecundar, antes debe de presentar una serie de cambios bioquímicos que afectan profundamente su motilidad, hiperactivándola, y le permite, en horas, la capacidad de responder a estímulos generados por la hembra produciéndole la exocitosis del acrosoma, a este evento se le conoce como reacción acrosomal. A los procesos bioquímicos que le permiten al espermatozoide la capacidad de presentar reacción acrosomal fisiológica se le denomina capacitación [5].



Figura 2. Estructura de un espermatozoide maduro, se observan las 3 piezas principales, la cabeza que contiene el acrosoma y el núcleo; la pieza media que corresponde al cuello del espermatozoide y contiene mitocondrias y la cola que se divide en dos segmentos: la pieza principal de la cola y la pieza terminal. Figura tomada de Solomon y cols.

La hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosomal son prerequisites absolutos para que el espermatozoide pueda fecundar al óvulo. Las bases moleculares de estos tres fenómenos involucran la activación de mecanismos de transporte de calcio [5, 8]. Como se observará más adelante, el estudio de estos mecanismos constituyen parte central de esta tesis.

4.2. Motilidad e hiperactivación.

Los espermatozoides de mamífero se desarrollan en los túbulos seminíferos, en donde terminan su maduración y son almacenados en el epidídimo, aquí tienen un movimiento flagelar muy débil y se dice que son inactivos [21]; cuando entran en contacto con el plasma seminal, son eyaculados y depositados en el tracto genital femenino, los espermatozoides cambian su patrón de movimiento e inician un desplazamiento vigoroso con trayectoria casi lineal [21]. Con el tiempo (en horas) el espermatozoide alcanza un movimiento flagelar aún más vigoroso que juega un papel muy importante en el desplazamiento efectivo a través del mucus cérvico-uterino. Esta aceleración de la motilidad, denominada por Yanagimachi hiperactivación [42] y es absolutamente necesaria para que el espermatozoide pueda penetrar la zona pelúcida, una cubierta extracelular que rodea al ovocito [42]. La hiperactivación de la motilidad requiere de calcio extracelular y un mantenimiento adecuado del pH intracelular [12].

4.3. Capacitación.

La capacitación es un proceso complejo que al parecer iniciar por un eflujo de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides [6]. Este eflujo es lento y favorecido experimentalmente por la albúmina sérica bovina (BSA), constituyente esencial del medio de capacitación in vitro de los espermatozoides. La extrusión de colesterol de la membrana trae como consecuencia un aumento en su fluidez y, por un proceso que aún no se ha definido, la activación de una adenilato ciclasa. Esta enzima eleva, también en horas, los niveles de AMPc y activa consecuentemente a la proteína cinasa A (PKA) [8,9]. La adenilato ciclasa del espermatozoide es soluble, y a diferencia de la membranal, es estimulada por iones calcio y por bicarbonato [10,11]. A este respecto, cabe mencionar que la capacitación requiere estrictamente de la presencia de calcio extracelular y es notablemente estimulada por el bicarbonato (ambos iones son componentes que se requieren en el medio de capacitación in vitro). El aumento en el AMPc, y/o la activación de la PKA, trae como consecuencia la activación de tirosina cinasas [11,12, 13]. La actividad de las tirosina cinasas también es esencial para la capacitación, ya que su inhibición por genisteina, previene la reacción acrosomal inducida fisiológicamente por progesterona o ZP3, lo cual constituye un “marcador funcional” de la capacitación.

Entre otros procesos bioquímicos, la capacitación del espermatozoide se acompaña de un aumento discreto en el calcio intracelular de reposo, y de una ligera alcalinización del pH intracelular [12, 32] (figura 3).

de la zona pelúcida, que en ratón se conoce como ZP3 [5] y por la progesterona, una hormona esteroide presente en el fluido folicular, que es liberada por las células de la granulosa que acompañan al óvulo [5]. Estos ligandos actúan sobre receptores membranales (aún no identificados plenamente) y como efecto tienen disparar rápidamente un influjo de calcio que, por lo observado en el efecto inductor de los ionóforos de calcio, induce la RA (figura 4).

Con base en el efecto inhibitorio de algunas dihidropiridinas (DHPs) sobre los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) y en la posterior inducción de la RA, se ha postulado la hipótesis que la ZP3 abre CCDV en el espermatozoide, involucrados en la liberación del contenido del acrosoma [5]. Sin embargo, este efecto ha sido puesto en duda en base a la ausencia de efecto de la dihidropiridina en el influjo de calcio dependiente de voltaje detectado en el espermatozoide humano (Linares-Hernández y col, 1998).

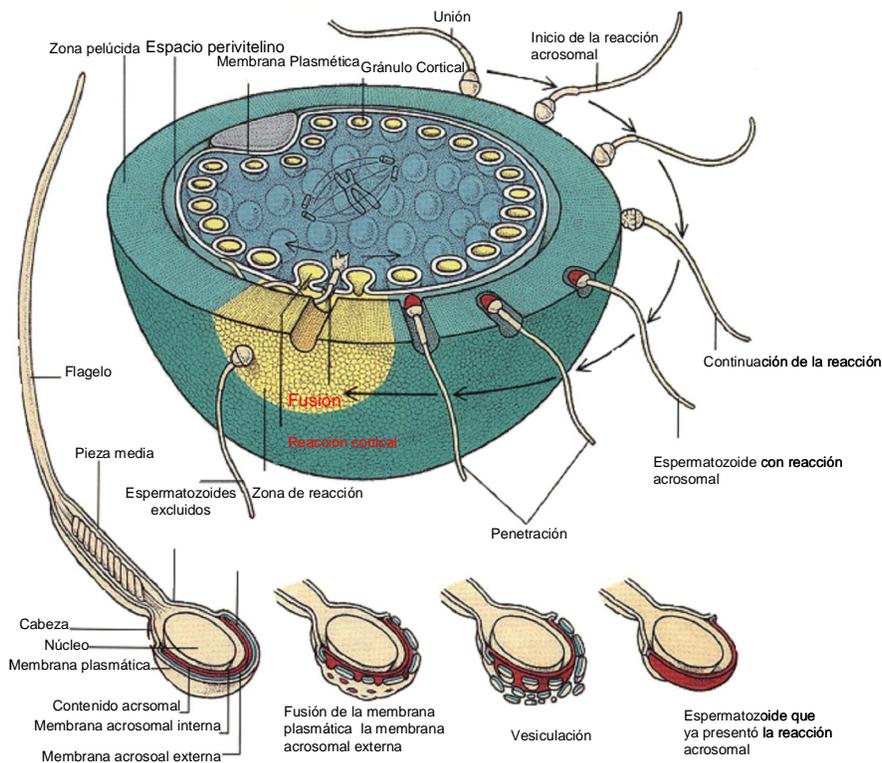


Figura 4. Procesos que ocurren durante la RA y como se asocian a la penetrabilidad del espermatozoide a la zona pelúcida. La RA se representa como la fusión de las membranas interna y externa del espermatozoide, la formación de vesícula, la excreción de enzimas líticas y la exposición de una membrana nueva que sirve para fusionarse con la membrana del óvulo. Como resultado se la introducción del espermatozoide al óvulo, se fusionan los gránulos corticales que secretan enzimas que alteran la zona pelúcida, “endureciéndola” (en amarillo), y no permitiendo el paso de más espermatozoides

4.5. Papel del calcio en la función del espermatozoide humano.

La participación del calcio intracelular es muy importante en la motilidad, capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide [36, 41, 42], y en todos ellos encontramos que se requiere un aumento súbito o moderado en el calcio interno para producir dichos fenómenos [42]. Por ejemplo, la hiperactivación requiere de rápidas entradas de calcio en el flagelo [42], así como la RA

requiere del incremento en el calcio interno que puede alcanzar concentraciones de hasta 5000-10000 nM en segundos [41]. En contraste el calcio intracelular aumenta unos 100 nM durante las 3-4 horas en que se lleva a cabo la capacitación [41]. El elemento común en estos procesos, es, la activación de sistemas de entrada de calcio en la membrana plasmática [41]. Entre estos sistemas los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) pueden tener un papel primordial.

El calcio es indispensable en el espermatozoide humano ya que, como se menciona arriba, su presencia en el medio externo es requerida en la hiperactivación, en la capacitación y en la reacción acrosomal. Un aumento del calcio intracelular es necesario en cada uno de los fenómenos mencionados, y el descubrir los mecanismos de entrada del calcio al interior del espermatozoide humano es central para el entendimiento de la fisiología de la reproducción. Consecuentemente, los mecanismos de entrada de calcio al interior de los espermatozoides, son posibles blancos farmacológicos para el control de la fecundación.

4.6 Canales de calcio dependientes de voltaje en el espermatozoide humano.

Debido al tamaño y forma de los espermatozoides es muy difícil el empleo de técnicas electrofisiológicas para estudiar a los CCDV [4]. De manera alternativa, se han utilizado células espermatogénicas para detectar estos y otros canales, extrapolando los resultados al funcionamiento del espermatozoide maduro. Los únicos CCDV que se han detectado en células espermatogénicas de ratón son los canales LVA (tipo T) [5]. Debido a que el

espermatozoide maduro no parece sintetizar proteínas, se ha propuesto que este canal debe estar presente en las células maduras [41]. Como quiera que sea, el hecho de que la RA sea inhibida por bloqueadores de CCDV tipo T, ha llevado a la hipótesis de que este canal sirve como la vía de permeabilidad de calcio que debe abrirse durante la RA inducida por la ZP3 [5, 41]. Asimismo, estudios recientes han mostrado la presencia de un canal de calcio dependiente de voltaje en el flagelo del espermatozoide maduro, el catsper. Este canal es un heterotetrámero que no se parece a ningún otro y constituye un nuevo tipo de canal de calcio, su función es la de proporcionar calcio a través del flagelo e inducir la hiperactivación arriba descrita (Qi y cols, PNAS 2007).

Por otro lado, en el espermatozoide maduro la utilización de colorantes sensibles al potencial de membrana y detectores de fluorescencia para calcio han permitido estimar, de manera indirecta, la presencia de CCDV funcionales. En el espermatozoide humano se ha encontrado que una despolarización con potasio, en presencia del ionóforo valinomicina, produce incrementos transitorios en el calcio intracelular [18]. Este influjo de calcio dependiente de voltaje es insensible a los bloqueadores orgánicos de CCDV como son el verapamil y las dihidropiridinas, pero sensible a níquel [4, 6]. Estos presuntos canales permanecen abiertos por 90 segundos en medio sin calcio y son estimulados notablemente por la alcalinización pH intracelular [12, 32]. La evidencia sugiere que el influjo de calcio dependiente de voltaje se debe a la activación de CCDV, aún cuando no ha sido fácil su clasificación dado su insensibilidad a bloqueadores orgánicos y a su tiempo de apertura aparentemente largo [13]. Podría tratarse incluso del CatSper [41]. Es posible

que la señal sea resultado de la apertura de estos canales, esto es, *catsper*, el tipo R (resistente a bloqueadores) e incluso, de manera minoritaria (por su rapidísima inactivación), del tipo t.

Recientes investigaciones han demostrado que los CCDV del espermatozoide humano aumentan su permeabilidad a calcio durante la capacitación [11]. También se estimula su apertura por la acción de la progesterona [5]. Esto nos ha llevado a plantear la hipótesis de que la capacitación y la progesterona afectan al canal de manera que aumentan varias veces su probabilidad de apertura, así, al entrar en contacto con la zona pelúcida, específicamente la ZP3, el influjo de calcio que induce esta glicoproteína se vería enormemente potenciado, ya que moviliza calcio activando CCDV [13, 25, 30]. Consecuentemente, se posibilitaría o aseguraría una rápida inducción de la RA.

4.7. Efecto del mibefradil en los CCDV del espermatozoide humano

Se ha establecido un posible efecto inhibitorio del mibefradil sobre el transporte de calcio inducido por despolarización con KCl en los espermatozoides humanos. El mibefradil es un derivado de la tetralina con un peso molecular de 568.56 g/mol (figura 5), cuyo efecto es bloquear los canales de calcio de tipo T en células excitables. Es un fármaco de los llamados “bloqueadores de canal de calcio”, utilizado en el tratamiento de la hipertensión, angina de pecho y algunas otras arritmias cardíacas. El efecto inhibitorio se debe a que realiza un bloqueo directo y reversible sobre estos canales de calcio en el rango

micromolar (15). En las células espermatogénicas de ratón, el mibefradil bloquea los canales de calcio tipo T y la reacción acrosomal inducida con extractos de zona pelúcida; en espermatozoides maduros humanos, se ha observado un bloqueo selectivo sobre la inducción de entrada de calcio inducido por bsa-manosa, un posible análogo de la ZP3, pero no bloquea la entrada de calcio inducida por la progesterona. En este mismo estudio, se encontró que el mibefradil inhibe la entrada de calcio inducida con KCl, y de aquí, por lo que se apoyó la hipótesis de que este fármaco bloquea efectivamente los CCDV en espermatozoides maduros (5).

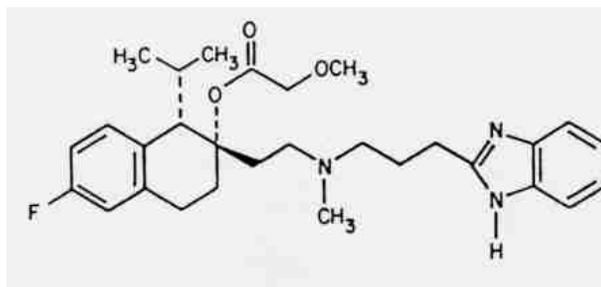


Figura 5. Estructura química del mibefradil.

Es importante resaltar que el efecto del mibefradil en los CCDV en el espermatozoide humano se reportó utilizando una sola dosis (10 μM) y sin el uso de el ionóforo de potasio valinomicina. Este ionóforo es muy importante en el ensayo ya que el potencial de membrana en el espermatozoide solo depende parcialmente de potasio, no se comporta como un electrodo de potasio como en las células excitables. En el espermatozoide, la valinomicina hace que el potencial de membrana dependa principalmente de potasio de manera que su presencia permite despolarizar la membrana con K de manera más o menos cuantitativa (Linares-Hernández y cols, 1998). Asimismo, la adición de valinomicina hiperpolariza a los espermatozoides de un potencia de

-45 mV a alrededor de -70 mV. Lo cual remueve la inactivación de los CCDV y con ellos hacerlos susceptibles a activarlos por despolarización. Por otra parte, tampoco se consideró que el mibefradil pudiera tener efectos sobre el potencial de membrana que afectara el influjo de calcio inducido por despolarización, a este respecto, es importante señalar que se ha reportado que el mibefradil inhibe canales de K (Czirjak G, Enyedi P). Tampoco se determinó en que medida 60 mM de potasio despolarizó las células (Blackmore 1999) (figura 6), ni si el efecto fue reversible. Otro efecto a considerar es si el mibefradil afecta el pH intracelular ya que los CCDV en el espermatozoide son extremadamente sensibles a este y se inhiben a pH ácido (Neri-Vidaurre y cols, 2006).

Dada la importancia de contar con un inhibidor de los CCDV encontrado en el espermatozoide, decidimos plantear en la presente tesis estudiar con mayor profundidad el efecto de este inhibidor en los CCDV en el espermatozoide humano.

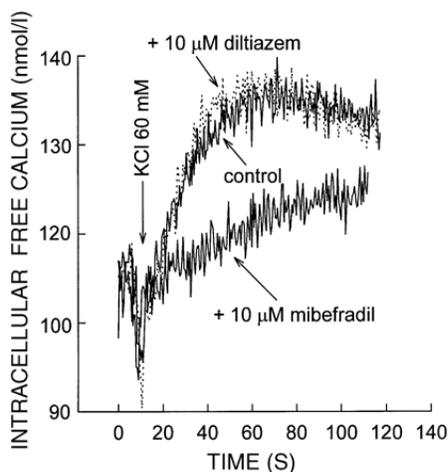


Figura 6. Efecto del mibefradil sobre el influjo de calcio inducido por 60 mM de KCl. Se muestra también el efecto del diltiazem. Imagen tomada del artículo de (Blackmore 1999)

5. HIPÓTESIS

El mibefradil bloquea el influjo de calcio dependiente de voltaje por mecanismos directos sobre el canal de calcio.

6. OBJETIVOS

- ↪ Realizar una curva dosis-efecto de mibefradil sobre el influjo de calcio dependiente de voltaje en el espermatozoide humano
- ↪ Determinar si el mibefradil: a) altera el potencial de membrana en estudios simultáneos de potencial de membrana y calcio intracelular, y si esto altera la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje y b) si su bloqueo se relaciona a cambios en el pHi.
- ↪ Determinar si el efecto del mibefradil es reversible.
- ↪ Determinar el efecto de mibefradil en el influjo de calcio dependiente de voltaje inducido de -71 mV a -30 mV (para determinar efecto específicamente sobre lo que sería un CCDV tipo T) y el inducido de -30 a -15 mV (para determinar sobre canales de bajo umbral: L, N o P)

7. METODOLOGÍA

7.1. Colecta y purificación de los espermatozoides.

Se utilizó semen humano obtenido de un grupo de 5 donadores sanos (entre 18 y 25 años de edad). Las características de selección fueron las utilizadas en el protocolo de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Mediante espermatabioscopía se seleccionaron aquellas muestras con las siguientes características de normalidad: color de semen blanco grisáceo, tiempo de licuefacción de 20-60 minutos a temperatura ambiente, volumen de 2-5 mL, pH de 7.2-7.8, movilidad y viabilidad \geq al 60%, ausencia de aglutinación y concentración de leucocitos no mayor a 10^6 /mL [41].

El semen se incubó a 37 °C, 30 min para reducir su viscosidad y, subsecuentemente, los espermatozoides se separaron por gradientes isotónicos de densidad discontinuos de percoll de acuerdo a Suárez y cols [42]. El semen se colocó sobre un gradiente formado por 1 mL de percoll al 75% y 1 mL de Percoll al 50% (ambos amortiguados a pH 7.4 con HEPES 10 mM, NaCl 150 mM) y fue centrifugado a 300 X g, 20 min. La pastilla de espermatozoides (encontrada al fondo de la fase de Percoll al 75%) fue separada y lavada dos veces por centrifugación a 300 g, 10 min, en medio HHSM (NaCl 117.5 mM, KCl 8.6 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 0.49 mM, NaH₂PO₄ 0.3 mM, glucosa 2 mM, Na-piruvato 0.25 mM, Na-lactato 25 mM, HEPES 25 mM, pH 7.5).

7.2. Incorporación de fura-FF-AM y BCECF-AM a los espermatozoides.

Después de la última centrifugación, las células se resuspendieron en 1 mL de HSM-H y se cargaron con 3 μM de fura-FF-AM o 1 μM BCECF-AM (acetoximetil éster), para determinar la concentración de calcio intracelular o pHi, incubándolas durante 40 minutos a 37° C. Posteriormente, se separó la pastilla por centrifugación a 300 X g durante 5 minutos para eliminar el excedente del colorante no incorporado, y finalmente la muestra se incubó entre 5 y 10 minutos en medio HSM antes de cada registro.

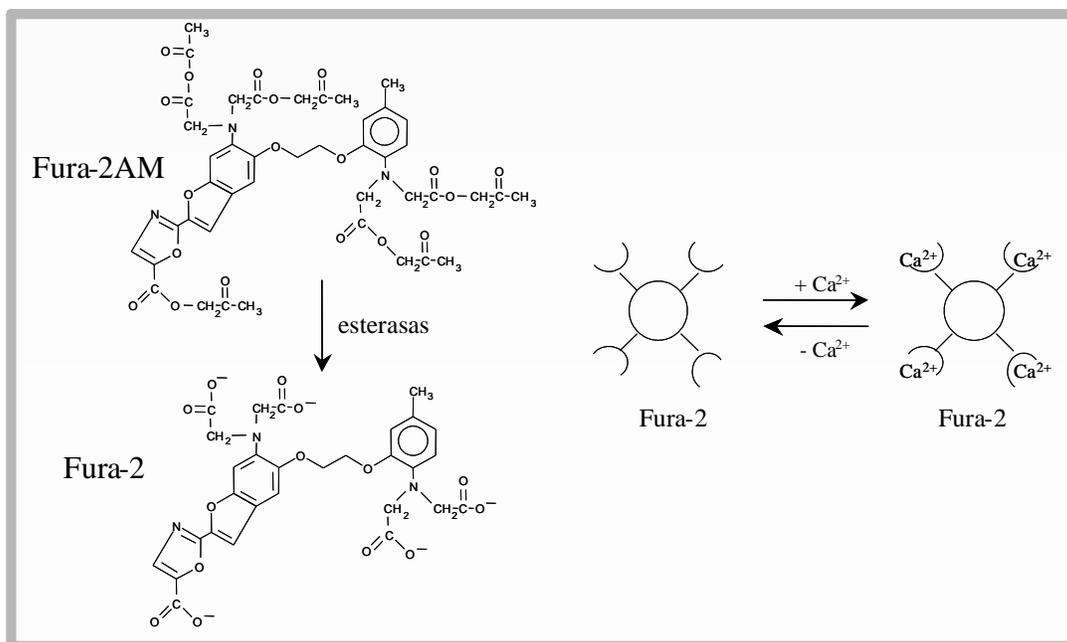


Figura 7. Estructura del fura-2 AM y el fura-2 activado. La presencia de esterasas intracelulares catalizan la formación de fura 2 (impermeable) a partir del fura 2-AM. Representación del proceso de unión calcio-fura que tiene una Kd de 260 nM. Figura tomada de Guzmán. En este trabajo se utilizó un análogo del fura 2, el fura ff que tiene una afinidad por el calcio de 5.5 μM .

7.3. Detección simultánea y calibración, de calcio intracelular y potencial de membrana. Detección y calibración del pHi.

Para detectar el potencial de membrana y el calcio intracelular simultáneamente, se utilizó el colorante sensible a potencial de membrana,

yoduro de diisopropiltiodicarbocianina ($\text{diSC}_3(5)$), 500 nM, un compuesto catiónico fluorescente capaz de introducirse electroforéticamente a la célula siguiendo un potencial negativo formando agregados no fluorescentes en el interior, lo que hace su distribución, y su fluorescencia, dependiente del potencial de membrana. El $\text{diSC}_3(5)$ tiene una excitación a 600 nm y una emisión a 670 nm, tiene la ventaja de no interferir con la fluorescencia del fura-2. El $\text{diSC}_3(5)$ (500 nM) se agregó a la celda de fluorescencia 5 segundos después de depositar los espermatozoides en medio HSM-H adicionado con bicarbonato 5 mM, realizando inmediatamente después los registros simultáneos.

El detector fura-ff, cambia sus propiedades espectroscópicas al unirse al Ca^{2+} . Esto hace que al unir calcio aumente su fluorescencia (detectada a 488 nm) cuando se excita a 340 y la disminuya cuando se excita a 380 nm. En su forma de acetoximetil éster (fura-ff AM), se introduce al interior celular, donde la acción de esterasas lo hidrolizan a su forma de compuesto impermeable, fura-FF, comportándose como un detector intracelular de calcio [43] (figura 8).

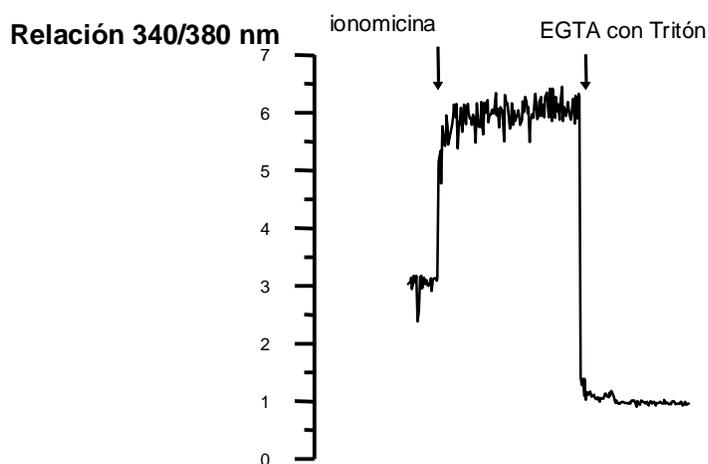


Figura 9. Registro de calibración con fura-ff. Los registros de la razón 340/380 nm se calibraron agregando ionomicina 2 μM para obtener el valor de R_{max} , y posteriormente EGTA 6mM con o sin Tritón X100 al 0.1% (v/v) para obtener el valor de R_{min} . La adición de tritón permite una rápida obtención de R_{min} .

La fluorescencia se midió con un espectrofluorómetro de Photon Technology International Inc (PTI). Este equipo está formado por una caja protegida de entradas de luz, a excepción de cuatro aperturas, dos para la excitación de la muestra y dos para coleccionar la fluorescencia emitida; en el centro tiene un portacelda con agitación magnética constante y la temperatura se regula a través de un baño de incubación. La emisión de señales fue amplificada y analizada por dos fotomultiplicadores (FMs) colocados uno frente al otro a 90° con respecto a una fuente de excitación de Xenón. El fura-ff AM se excitó a 340 y 380 nm con un monocromador automático del sistema PTI; la cianina se excitó con una fuente de luz adicional de haluro (tri-lite, WPI) con un filtro de 600 nm (Hansatech Instruments). Esta fuente adicional de luz se colocó frente a la fuente de luz de Xenón del sistema PTI. Ambos registros de fluorescencia, esto es, la lectura de relación 340/380 nm de fura-ff y el de la cianina, fueron detectadas simultáneamente a 90° con respecto de sus fuentes de luz. Los registros simultáneos se obtuvieron a una frecuencia de 0.85 Hz y los datos fueron colectados y digitalizados con la interfase computarizada del PTI (figura 9).

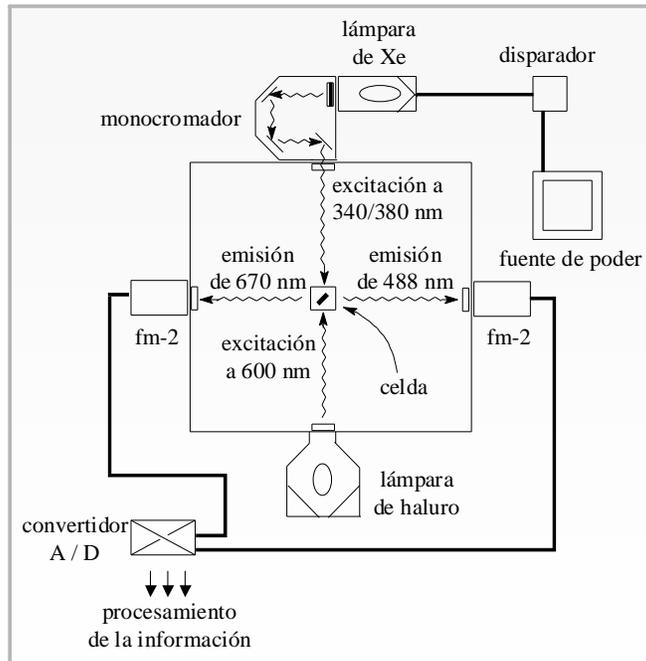


Figura 9. Esquema del sistema de detección simultánea de calcio (emisión a 488 nm) y potencial de membrana (emisión a 670 nm) utilizado en el presente trabajo. El equipo de PTI tiene dos fotomultiplicadores y una lámpara adicional de haluro que permite hacer una irradiación adicional con el filtro correspondiente. Figura tomada de Guzmán.

Los registros de calcio se calibraron según Linares-Hernández y cols [37], con la ecuación de Grynkiewicz:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d (R - R_{min}) / (R_{max} - R) (F_{380} / F_{b380})$$

el valor de relación máxima (Rmax) de la razón 340/380 y el de fluorescencia unida a 380 nm de excitación (Fb380) se obtuvieron a partir de la saturación del

calcio intracelular por la adición de 1 μ M del ionóforo de calcio ionomicina; la relación mínima (R_{min}) y la fluorescencia libre, o en ausencia de calcio, a 380 nm de excitación (F_{380}) se consiguieron después de agregar, primero, Tritón X100 al 0.1% (v/v), y posteriormente EGTA 6 mM. La constante de disociación del fluoróforo ($K_d = 224$ nM) fue obtenida de Grynkiewicz et al [43]. La adición de Tritón X100 fue necesaria para obtener una rápida R_{min} (figura 9), ya que, por razones que desconocemos, la disminución de calcio interno inducido solamente con EGTA produce una disminución extremadamente lenta, aún cuando los valores de fluorescencia llegan a la misma R_{min} .

Para calibrar el potencial de membrana se consideró que el valor de fluorescencia de la cianina en medio con valinomicina fue -71 mV. Este valor lo tomamos del potencial de Nernst (E):

$$E = -61.56 \text{ mV} \log [K_i]/[K_e]$$

Donde $[K_i]$ es la concentración de K intracelular, = 120 mM; y $[K_e]$ es la concentración de potasio extracelular del medio. Los tres valores de potencial estudiados son entonces el de reposo en el que el K extracelular es = 8.6 mM (-71 mV), 8.6 mM KCl del medio + 30 mM KCl añadido (38.6 mM = -30 mV) y + 30 mM KCl adicional (68.6 mM KCl = -15 mV).

La detección de fluorescencia de BCECF se realizó a 550 nm excitando alternadamente a 439 (longitud insensible) u 500 nm (longitud sensible). Los valores de la relación 500/430 se calibraron de la siguiente manera. Se añadió a la muestra tritón X-100 para liberar el colorante, elevando la "ratio" a los

valores correspondientes a el pH del medio, posteriormente se hicieron 3 adiciones sucesivas de HCl (5 μ l, 100 mM) y se compararon los valores disminuidos de "ratio" con los de el pH detectado con un electrodo convencional. Los valores de fluorescencia se convirtieron a pH con el software del equipo de PTI. En Resultados se presenta el efecto del mibefradil con una calibración al final del registro.

7.4. Detección del influjo de calcio dependiente de voltaje.

Los espermatozoides purificados por gradientes de percoll (alrededor de 50-100 millones) y cargados con fura ff, se incubaron en 25 mL de HHSM a 36 °C. De ahí se tomaron alícuotas de 2.5 mL y se centrifugaron a 300 g, 5 minutos en una centrífuga clínica a temperatura ambiente. El pellet con los espermatozoides se añadió a la celda de fluorescencia con 2.5 mL de HHSM, bajo agitación magnética constante y a 36 °C. Inmediatamente después de añadir las células se inició el registro de fluorescencia con las condiciones que se indican en el apartado de arriba. En caso de medir simultáneamente el potencial de membrana se dejó equilibrar la cianina por 3-4 minutos, tiempo en el cual se añadió la 1 μ M valinomicina, un minuto después se añadió KCl 30 mM, condición en la que se disparó el influjo de calcio dependiente de voltaje. Se mantuvo el registro un minuto más y concluyó el experimento En registros en los que se probó el mibefradil, se añadió el inhibidor un minuto antes de la valinomicina. Al final del grupo de experimentos con muestras de cada donador, se realizó la calibración como se describe arriba.

8. RESULTADOS

La figura 10 muestra el registro simultáneo de potencial de membrana y calcio intracelular en espermatozoides humanos incubados en medio HHSM. Observamos que la adición de mibefradil (10 μM) no alteró los valores de calcio intracelular en el reposo, pero sí produjo una hiperpolarización en el potencial de membrana. La adición de valinomicina, como era de esperarse, indujo una hiperpolarización del potencial de membrana de alrededor de -71 mV. Un minuto después añadimos 30 mM de KCl que despolarizó la membrana a -31 mV. Esto produjo un influjo de calcio transitorio que alcanzó un pico de alrededor de 4 μM en segundos y llegó a valores casi basales en 1 minuto. En presencia de mibefradil este pico de inhibió casi totalmente. El mibefradil no alteró por sí mismo los cambios inducidos en el potencial de membrana necesarios para disparar el influjo de calcio dependiente de voltaje por lo que podemos concluir que la acción del mibefradil ocurrió por bloqueo directo del canal de calcio.

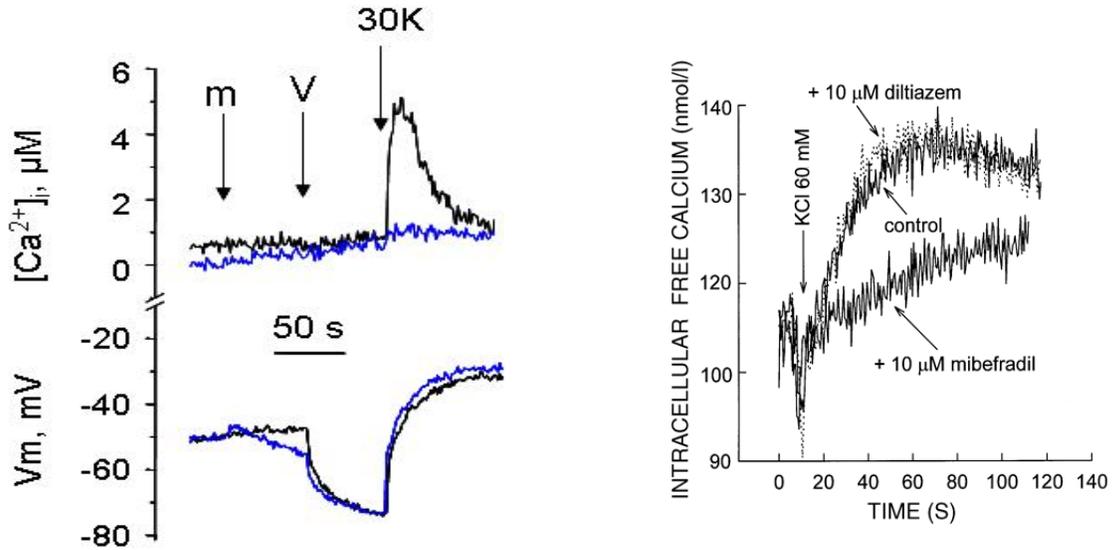


Figura 10. Efecto de 10 μM de mibefradil. El trazo en color negro es el control con adiciones de 1 μM de valinomicina al minuto 1, y KCl a los 2 minutos. El trazo en color azul corresponde al registro con mibefradil adicionado a los 30 s. En la parte de abajo se muestra el registro simultáneo de potencial de membrana. La figura de la derecha es el experimento publicado por Blackmore (ver el texto) que incluyo con el propósito de comparar las señales ópticas

La condición de disparo del canal de calcio, hasta -31 mV de despolarización, permite preferencialmente medir la activación del canal de calcio tipo T. Para medir el canal L, requerimos despolarizar a valores menos negativos que -31 mV. Con el objeto de estudiar si el efecto de mibefradil sobre el influjo a valores donde se activa el canal L, usamos un protocolo de doble pulso: una despolarización de -71 mV a -30 mV, en el que se activaría el T y luego se inactivaría (que explica el cambio transitorio) y de ahí una despolarización hasta -15 mV (donde se activaría el L). Observamos que el pulso de -30 a -15 mV produjo un pico adicional de calcio que sería atribuido a la activación de un canal L. Interesantemente, este último pico también fue

bloqueado por el mibefradil. Este resultado fue inesperado ya que el mibefradil no bloquea canales L (figura 11).

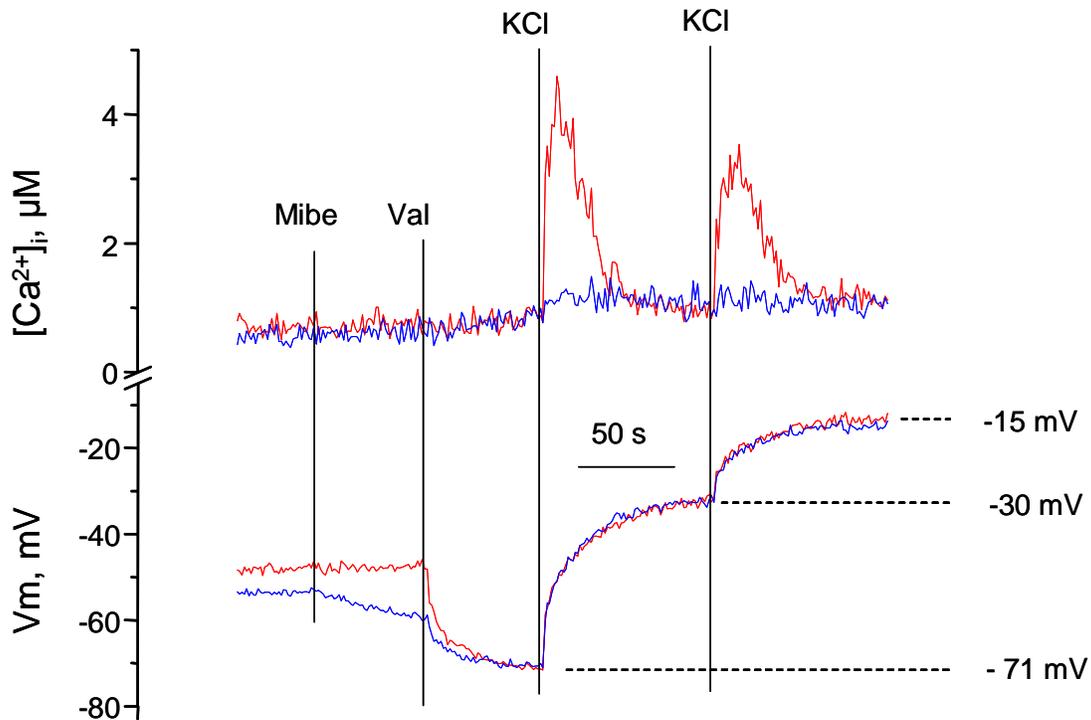


Figura 11. Efecto del mibefradil sobre la entrada de calcio inducida de -71 a -30 mV (condición de activación del canal T) y subsecuentemente de -30 a -15 mV. El mibefradil ($10 \mu M$) se añadió un minuto antes que la valinomicina ($1 \mu M$). Un minuto después se añadió 30 mM de KCl las veces indicadas para llevar el potencia a -30 y -15 mV. El trazo rojo corresponde al control y el trazo azul corresponde al registro con mibefradil.

La figura 12 muestra el efecto de diferentes concentraciones del mibefradil en la entrada de calcio dependiente de voltaje. Encontramos que la inhibición tuvo un comportamiento monoexponencial, ya que los datos se ajustaron a una ecuación de este tipo, con una concentración inhibitoria al 50 % (IC_{50}) de 2.01 micromolar. El hecho de que la inhibición siguió una línea mono exponencial sugirió que el mibefradil inhibió un solo sistema de transporte de calcio.

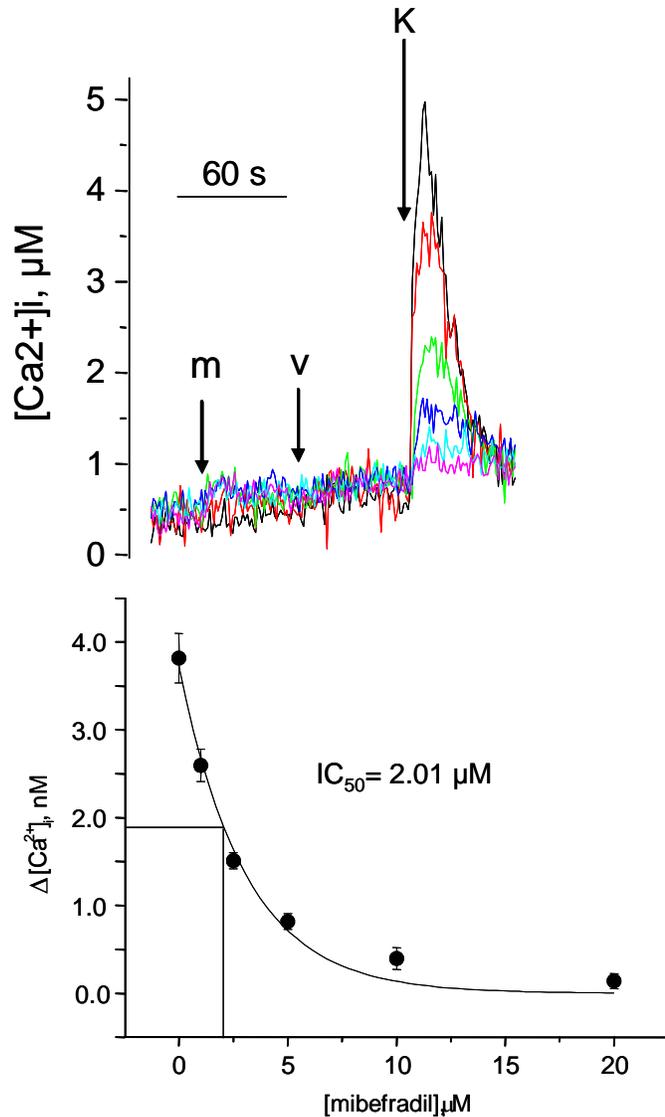


Figura 12. Curva dosis-efecto de mibefradil sobre el influjo de calcio dependiente de voltaje en el espermatozoide humano. Panel superior: efecto sobre el influjo de calcio a las concentraciones indicadas (en la curva dosis-respuesta) de mibefradil. Panel B Curva dosis-efecto. Se observa una caída exponencial. La curva continua corresponde a la ecuación monoexponencial $\Delta[Ca^{2+}] = 3.72 \exp - [mib]/3.02$, (corr= 0.98) (obtenida con el programa de Origin). $n = 5$ individuos, se. error estándar. En donde m corresponde a mibefradil, v a valinomicina y K a KCl.

En otros tipos celulares el bloqueo de las corrientes de calcio tipo T es reversible, esto es, no implica una unión covalente o daño irreversible al canal. Tomando en cuenta esto, investigamos si el efecto inhibitorio del mibefradil en el influjo de calcio dependiente de voltaje en el espermatozoide era inhibitorio.

La figura 13 muestra que, en efecto, el influjo de calcio fue reversible, esto es, el pico de calcio previamente inhibido por mibefradil y luego lavado en medio fresco por centrifugación, se recuperó casi a los niveles control. Este resultado demostró que el efecto inhibitorio del mibefradil sobre los canales de calcio dependientes de voltaje en el espermatozoide es irreversible.

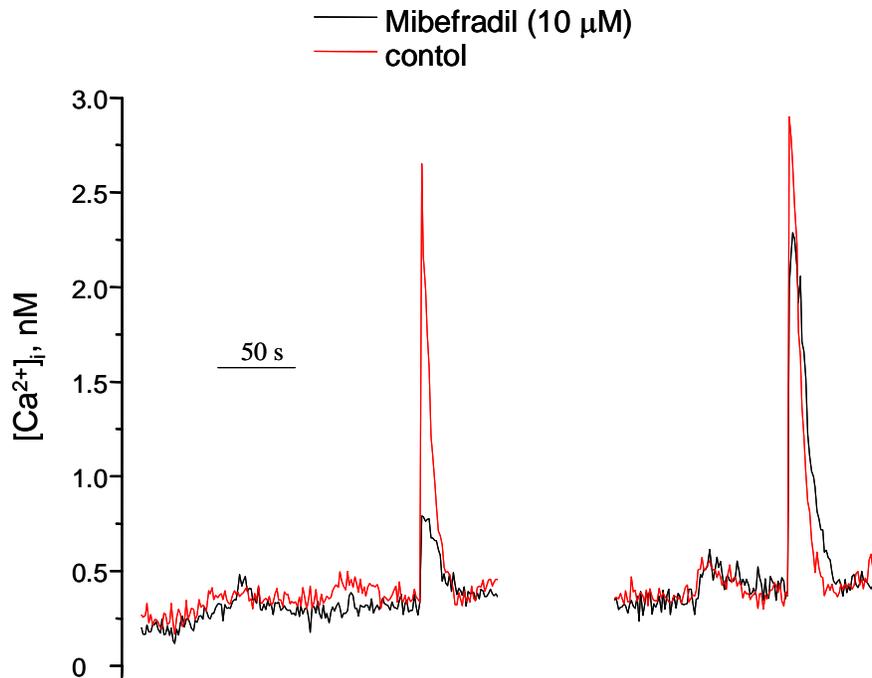


Figura 13. Reversibilidad del efecto del mibefradil. El trazo en color rojo corresponde al control, donde se realizan los pulsos de 1 µM de valinomicina y 30 mM de KCl. El trazo en color negro corresponde a la adición de mibefradil y el efecto de lavar las células por centrifugación que fueron expuestas a mibefradil y posteriormente, a la activación de los CCDV.

Otro aspecto regulador de los CCDV de los espermatozoides humanos es su alta sensibilidad al pHi. Fraire-Zamora y González-Martínez (12), reportaron que los canales se estimulan en un rango muy estrecho de valores de pHi (6.7-7.1). Debido a esto decidimos investigar si el efecto inhibitorio del mibefradil podría deberse en parte a que el mibefradil tuviera efectos

acidificantes del pHi. La figura 14 muestra que la adición de el mibefradil no afectó en lo más mínimo el pHi de los espermatozoides. Estos resultados confirmaron que el efecto inhibitorio del mibefradil ocurrió por un bloqueo directo sobre el canal de calcio del espermatozoide (figura 14).

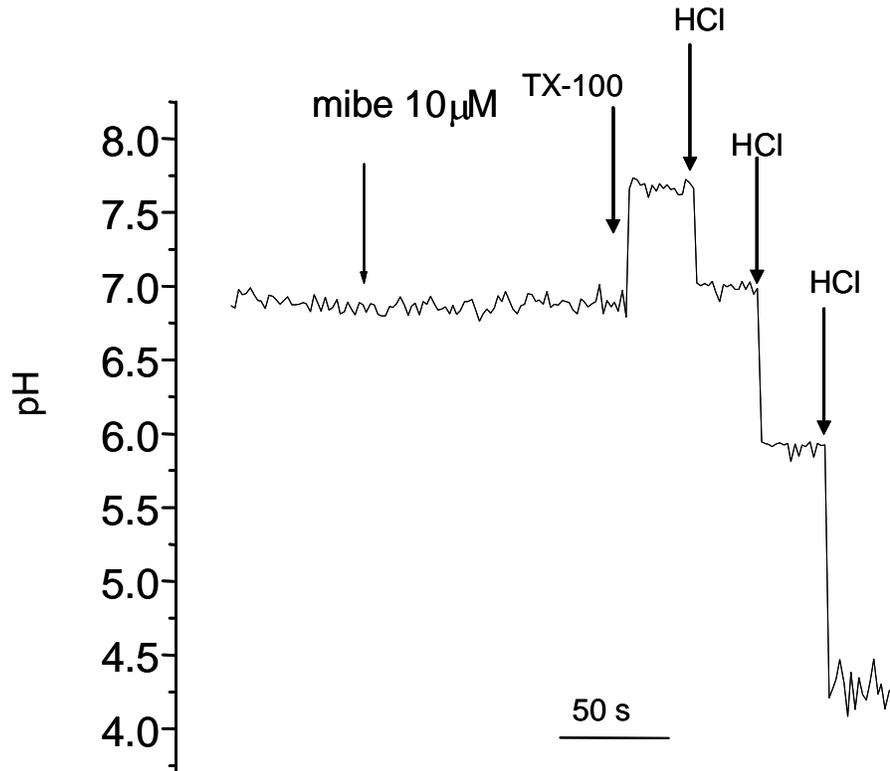


Figura 14. Efecto del mibefradil en el pH intracelular. El trazo corresponde al registro realizado con mibefradil, a los 60 s se adicionó 10 μM de mibefradil, a continuación se adicionó TX-100 0.1 % (tritón al 0.1 %) y se realizó la calibración con 3 adiciones de 5 μL HCl 0.5 M. Los valores de pH resultante se midieron con un electrodo convencional de pH y se compararon en la misma gráfica con los valores de relación 500/439.

9. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en la presente tesis indican que el canal de calcio dependiente de voltaje presente en el espermatozoide humano se bloquea por el mibefradil, esto indica que el canal presente es el tipo T. Cabe recordar que en el estudio previo hecho por Blackmore se mostró que el mibefradil bloquea la entrada de calcio inducida por KCl (figura 6), sin embargo, en ese estudio no se controlaron debidamente las condiciones para detectar estos canales, esto es, se hizo el experimento sin controlar el potencial de membrana de mantenimiento ni el grado de despolarización. En nuestro caso, este control se llevó a cabo con el ionóforo de K ionomicina, que permitió llevar el potencial de mantenimiento a valores de desactivación del canal (-71 mV) y poder activarlo a valores más precisos. Esto permitió tener trazos nítidos de aumento de calcio y poder evaluar con precisión el efecto de mibefradil. La comparación de los trazos obtenidos en este trabajo y los publicados por Blackmore (figura 6) ponen de manifiesto la necesidad de tener condiciones óptimas para obtener trazos que reflejen fehacientemente el influjo de calcio dependiente de voltaje en este tipo de células.

El efecto de mibefradil fue reversible y no involucró efectos en el pHi. Su efecto inhibitorio se presentó tanto en condiciones de apertura exclusivamente de CCDV tipo T, como en condiciones de apertura de el canal T + el canal L. Su efecto fue relativamente potente ($IC_{50} = 2.01 \mu M$) con una curva de inhibición monoexponencial, alcanzando valores de inhibición casi totales con $10 \mu M$.

La curva inhibitoria monoexponencial sugiere fuertemente que el mibefradil está inhibiendo un solo canal y el hecho de que no se haya inhibido

el canal en condiciones de apertura de un canal L apoya fuertemente la hipótesis de que ese único canal pudiera ser de tipo T. Esta hipótesis también está apoyada en el hecho de que el mibefradil inhibe al canal T en otros sistemas. Es importante notar que la entrada de calcio tiene una cinética de segundos y que esto es incompatible con la activación de un canal de calcio tipo T, que se inactiva en milisegundos. Es posible que las propiedades del canal de calcio tipo T se vean alteradas in vivo por el canal de calcio dependiente de voltaje *catsper*, ya que se ha demostrado que ambos tienen una fuerte interacción. Si bien en condiciones in vitro no se ha visto que *catsper* alargue el tiempo de apertura del canal, in vivo podría tener ese tipo de regulación.

Un aspecto importante que encontramos (figura 10) es que el mibefradil hiperpolariza la membrana plasmática. Esto no es tan inesperado ya que el mibefradil no es un fármaco tan específico. Además de bloquear canales de calcio tipo T, su acción principal, bloquea canales de calcio tipo L, canales de K de varios tipos y canales de sodio. La hiperpolarización debida al mibefradil podría deberse a un aumento en la apertura de canales de K, sin embargo este parece no ser el caso ya que en otros sistemas se ha visto que este bloqueador tiene efectos inhibitorios en este tipo de canales y su acción bloqueadora produciría despolarización. Existe la posibilidad de que bloquee canales de sodio y así se explique este efecto. El mecanismo por el cual el mibefradil induce hiperpolarización requiere estudiarse a futuro.

En resumen, este trabajo muestra que el mibefradil bloquea los canales de calcio dependientes de voltaje y su perfil de bloqueo, a juzgar por el comportamiento monoexponencial de la curva de inhibición, sugiere

fuertemente que el influjo lo produce la activación de un solo tipo de canal iónico, posiblemente el T, o un complejo aún por dilucidarse, entre catsper y canal T.

10. CONCLUSIONES:

1.- El mibefradil inhibe prácticamente de manera total la entrada de calcio dependiente de voltaje en el espermatozoide humano, con una IC50 de 2.01 μ M. Esta inhibición es reversible, y no involucra inhibición por acidificación del pHi. La curva de inhibición mono exponencial del mibefradil, así como su bloqueo casi total indica que el influjo de calcio dependiente del voltaje lo causa un solo tipo de canal de calcio (el tipo T) en el espermatozoide humano.

2.- El mibefradil causa una ligera hiperpolarización de la membrana del espermatozoide humano a través de un mecanismo aún por dilucidar.

11. PERSPECTIVAS:

En el presente estudio, observamos el efecto inhibitorio que tiene el mibefradil sobre los CCDV tipo T en el espermatozoide humano, cabe recordar que durante la capacitación y la reacción acrosomal hay un aumento del calcio intracelular, así que esto es lo que le da una importancia fundamental al estudio de los mecanismos por los cuales hay este aumento de calcio para dilucidar los mecanismos implicados en la biología de la reproducción.

Es necesario un completo entendimiento de los mecanismos de entrada de calcio ya que los canales de calcio son un posible blanco farmacológico, por ello este estudio puede tener un gran impacto en el diseño de fármacos anticonceptivos que sean dirigidos específicamente para los canales de calcio.

Bibliografía.

- 1. Aczel S, Kurka B, Hering S.** Mechanism of voltage- and use-dependent block of class A Ca²⁺ channels by mibefradil. *British Journal Pharmacology*. 1998, 125 (3): 447-454.
- 2. Arnoult C, Villaz M, Florman HM.** Pharmacological properties of the T-type Ca²⁺ current of mouse spermatogenic cells. *Molecular Pharmacology*. 1998, 53(6): 1104-1111.
- 3. Benardeau A, Weissenburger J, Hondeghem L, Ertel E.** Effects of T-Type Ca²⁺ Channel Blocker Mibefradil on Repolarization of Guinea Pig, Dog, Monkey and Human Cardiac Tissue. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000; 292: 561-575.
- 4. Bertolesi G, Shi C, Elbaum L, Jollimore C, Rozemberg G, Barnes S, Kelly M.** The Ca²⁺ Channels Antagonist Mibefradil and Pimozide Inhibit Cell Growth via Different Cytotoxic Mechanisms. *Molecular Pharmacology*. 2002; 62: 210-219.
- 5. Blackmore PF, Eisoldt S.** The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-Type Calcium Channels in Human Spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. 1999; Vol. 5 No. 6: 498-506.

- 6. Chouabe C, Drici MD, Romey G, Barhanin J.** Effects of calcium channel blockers on cloned cardiac K⁺ channels IKr and IKs. *Therapie*. 2000 55:195-202.

- 7. Clozel JP, Ertel EA, Ertel SI.** Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker. *Journal Hypertension Supplement*. 1997;15(5):S17-25.

- 8. C.M. O'Toole, C. Arnoult, A. Darszon, R.A. Steinhardt and H.M. Florman.** Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction, *Mol. Biol. Cell*. **11** (2000), pp. 1571–1584.

- 9. Cui G, Okamoto T, Morikawa H.** Spontaneous Opening of T-Type Ca²⁺ Channels Contributes to the Irregular Firing of Dopamine Neurons in Neonatal Rats. *The Journal of Neurosciences*. 2004; 24(49): 11079-11087.

- 10. Czirjak G, Enyedi P.** Zinc and mercuric ions distinguish TRESK from the other two-pore-domain K⁺ channels. *Mol Pharmacol*. 2006 Mar;69(3):1024-32.

- 11. Darszon A, Acevedo J, Galindo B, Hernández-González E, Nishigaki T, Treviño C, Word C and Beltran C.** Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*. 2006; 131, 977-988.

12. Fraire Zamora JJ, Gonzalez Martínez M. Effect of Intracellular pH on Depolarization-Evoked Calcium Influx in Human Sperm. American Journal OF Physiology Cell Physiology. 2004; 287: C1688-C1696.

13. Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N, Mariot P. A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry?. Cell calcium. 2006, 39 (4); 357-366.

14. García M, Meizel S. Progesterone Mediated Calcium influx and Acrosome Reaction of Human Spermatozoa: Pharmacological Investigation of T-Type calcium Channels. Biology of Reproduction. 1999; 60: 102-109.

15. Gomora JC, Xu L, Enyeart JA, Enyeart JJ. Effect of mibefradil on voltage-dependent gating and kinetics of T-type Ca(2+) channels in cortisol-secreting cells. Journal Pharmacology. 2000, 292(1):96-103

16. Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 2003. Vol I, 10° Edición. Macgraw Hill.

17. Grynkiewicks G, Poenie M, Tiesen R Y. A New Generation of Calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. Journal of Biological Chemistry. 1985; 260:3440-3450.

18. Guzmán-Grenfell AM, González Martínez M. Lack of Voltage-Dependent Calcium Channel opening during Calcium Influx Induced by progesterone in

Human Sperm. Effect of Calcium Channel deactivation and inactivation. Asian Journal of Andrology. 2004; 25: 117-122.

19. Heady T, Gomora J, Macdonald T, Perez.Reyes E. Molecular Pharmacology of T-Type Ca^{+2} Channels. Journal of Pharmacology. 2001; 85:339-350.

20. Hermsmeyer K, Miyagawa K. Protein kinase C mechanism enhances vascular muscle relaxation by the Ca^{2+} antagonist, Ro 40-5967. Journal of Vascular Research. 1996; 33(1):71-77.

21. Ho. H. C., Suarez S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa. Function and regulation. Reproduction. 2001; 122: 519 – 526.

22. Huber I, Wappl E, Mitterdorfer J, Glossman H, Langer T, Striesnig J. Conserved Ca^{+2} -antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity dihydropyridine-binding domain. Biochem journal. 2000 (347); 829-836.

23. Jensen L, Salomonsson M, Jennsen B, Holstein-Rathlou N. Depolarization-Induced Calcium Influx in Rat Mesenteric Small Arterioles is Mediated Exclusively Via Mibefradil-Sensitive Calcium Channels. British Journal of Pharmacology. 2004; 142: 709-718.

- 24. Linares Hernández L, Guzmán-Grenfell AM, Hicks Gomez JJ, González Martínez M.** Voltage Dependent Calcium Influx in Human Sperm assessed by simultaneous optical detection of Intracellular Calcium and Membrane Potencial. *Biochimica et Biofisica Acta*.1998; 1372: 1-12.
- 25. Liu JH, Bijlenga P, Occhiodoro T, Fischer-Lougheed J, Bader CR, Bernheim L.** Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several Ca²⁺ and K⁺ currents in human fusion-competent myoblasts. *British Journal Pharmacology*. 1999, 126 (1): 245-250.
- 26. Lotshaw DP.** Role of membrane depolarization and T-type Ca²⁺ channels in angiotensin II and K⁺ stimulated aldosterone secretion. *Molecular cell endocrinology*. 2001; 175(1-2): 157-171.
- 27. Madle A, Linhartova K, Koza J.** Effect of T-Type Calcium Channel Blockade With Oral Mibefradil on the Electrophysiologic Properties of the Human Hearts. *Clinical Research*. 2001; 7(1): 74-77.
- 28. Massie BM.** Mibefradil: a selective T-type calcium antagonist. *American Journal Cardiology*. 1997;80(9A):231-321.
- 29. Massie BM, Chrysant SG, Jain A, Weir M, Weiss R, Korrin I.** Antihypertensive effects of mibefradil: a double-blind comparison with diltiazem CD. *Clinical Cardiology*. 1997, (6):562-568.

30. Martin R, Lee J, Cribbs L, Perez-Reyes E, Hanck D. Mibefradil Block of Cloned T-Type Calcium Channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000; 295:302-308.

31. McNulty MM, Hanck DA. Related Articles, Links State-dependent mibefradil block of Na⁺ channels. *Mol Pharmacol*. 2004 66:1652-61.

32. Neri-Vidaurre P, Víctor Torres-Flores and Marco T. González-Martínez. A remarkable increase in the pHi sensitivity of voltage-dependent calcium channels occurs in human sperm incubated in capacitating conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006; 346:105-109.

33. Patrat K, Serres K, Jouannet P. Induction of a Sodium Ion Influx by Progesterone in Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 2000; 62: 1380-1386.

34. Santi C, Cayabyab F, Sutton K, Snutch T. Differential Inhibition of T-Type calcium Channels by Neuroleptics. *The Journal of Neuroscience*. 2002; 22(2): 396-403.

35. Schuster A, Lacinova L, Klaubauer N, Ito H, Birnbaumer L and Hofmann F. The IVS6 segment of the L-type calcium channels is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *The embol journal*. 1996, 15 (10); 2365-2370.

- 36. Shi Yiu Lang, Bai Jun-Ping, Wang Wen-Ping.** Ion channels in human sperm membrane and contraceptive mechanisms of male antifertility compounds derived from Chinese traditional medicine. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2003; 24 (1):22-30.
- 37. Son WY, Lee JH, Han CT.** Acrosome reaction of human spermatozoa is mainly mediated by α_1H T-type calcium channels. *Molecular Journal Reproduction*. 2000, 6(10): 893-897.
- 38. Strogen PR, Bernard CE, Ou Y, Gibbons SJ, Farrugia G.** Effect of mibefradil on sodium and calcium currents. *American Journal Physiology*. 2005, 289(2); G249-G253.
- 39. Tanaka H, Shigenobu K.** Pathophysiological significance of the T-type channels: T-type Ca^{+2} channels and drug development. *Journal of pharmacology sciences*. 2005, 99: 214-220.
- 40. Wood C, Darszon A and Whitaker M.** Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *The Journal of cell biology*. 2003, 161 (1): 89-101.
- 41. Wood C, Nishigaki T, Furuta T, Baba S and Darszon A.** Real time analysis of the role of Ca^{+2} in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *The Journal of cell biology*. 2005, 169 (5): 725-731.

42. Yanimachi R., Usui N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation on guinea pig spermatozoa. *Ex. Cell. Res.* 1974; 89: 161 – 174.