



Sensibilidad de los canales de calcio dependientes de voltaje al pH intracelular en el espermatozoide humano capacitado. Efecto modulador del AMPc

Paloma del Carmen Neri Vidaurri,* Víctor Torres Flores,** †Marco Tulio González Martínez**

RESUMEN

Antecedentes: durante su camino hacia el ovocito, el espermatozoide aumenta su motilidad, hiperactivándola e iniciando la capacitación espermática que implica la vía AC/AMPc/PKA y, por medio de la zona pelúcida 3 del óvulo, sobreviene la reacción acrosómica. Estos fenómenos requieren mecanismos dependientes de transporte de calcio. A través de técnicas ópticas se han detectado canales de calcio dependientes de voltaje que 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 intracelular.

Objetivos: examinar el efecto de incrementar el AMPc intracelular con el inhibidor de fosfodiesterasas papaverina, y cuantificar el aumento de la concentración del calcio intracelular inducido con progesterona.

Material y métodos: se realizó un estudio prospectivo con muestras de semen de sujetos normoespérmicos. Se investigó el efecto del AMPc sobre los canales de calcio dependientes de voltaje y su sensibilidad al pH intracelular en el espermatozoide humano bajo dos enfoques: 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. Las muestras capacitadas y no capacitadas se trataron con fura-ff (detector de calcio) o con BCECF (detector de pH intracelular). Para elevar el AMPc en espermatozoides no capacitados se usó papaverina, 0.5 mM cinco minutos.

Resultados: la cantidad de AMPc se duplicó durante la capacitación y la exposición con papaverina cuadruplicó los valores (de 1.1 ± 0.4 a 5.2 ± 0.7 pmol/ 10^7) con respecto de los espermatozoides no capacitados y por arriba de la pentoxifilina. En el espermatozoide capacitado la sensibilidad aumentó alrededor de siete veces.

Conclusiones: los canales de calcio dependientes de voltaje en el espermatozoide humano son sensibles a factores asociados con la capacitación, como el pH intracelular y el AMPc, favoreciendo la permeación a calcio. Este mecanismo explica por qué sólo los espermatozoides capacitados contactan la zona pelúcida del óvulo y muestran reacción acrosomal, evento en el que los canales de calcio dependientes de voltaje juegan un papel central como mecanismo de entrada de calcio.

Palabras clave: AMPc, canales de calcio dependientes de voltaje, papaverina, pentoxifilina.

ABSTRACT

Background: During their journey through the uterine tract, mammalian sperm increases its motility, beginning sperm capacitation, that involves the activation of the AC/cAMP/PKA pathway, and the acrosome reaction induced by egg-pellucid zone. These phenomena require calcium transport mechanisms among them; voltage-dependent calcium channels (VDCC) have been involved as calcium entry mechanism. These channels are highly stimulated during the sperm capacitation progesterone and by intracellular pH alkalization.

Objective: To investigate the effect of increasing intracellular AMPc with phosphodiesterase inhibitor papaverin, and to quantify the increased intracellular calcium level induced by progesterone.

Material and methods: A prospective study was done with semen samples from normosperm subjects. The effect of cAMP on VDCC was investigated, as well as their sensitivity to intracellular pH in human spermatozoid under two approaches: 1) the induction of cAMP increase in non capacitated sperm and 2) the use of capacitated sperm which naturally produces increased levels of cAMP as compared with non capacitated cells. Samples were loaded with fura ff or with BCECF (a intracellular pH detector). To increase the intracellular AMPc content in non-capacitated sperm, papaverine was used, 0.5 mM incubated 5 minutes.

Results: cAMP content increased 2-fold during capacitation and papaverin exposure increased 4-fold (from 1.1 ± 0.4 to 5.2 ± 0.7 pmol/ 10^7) with regard to non-capacitated and was higher than pentoxifiline's. In capacitated sperm sensitivity increased near 7-fold.

Conclusions: Human sperm voltage-dependent calcium channels are sensitive to regulators associated to sperm capacitation, that is, the intracellular pH alkalization and AMPc content, favoring the calcium influx. These phenomena may be physiologically relevant since only capacitated sperm is capable to undergo the acrosome reaction induced by pellucid zone 3, an event that requires the activation of voltage-dependent calcium channels as a major mechanism of calcium entry.

Key words: cAMP, voltage-dependent calcium channels, papaverine, pentoxifiline.

En el espermatozoide humano, la modulación de la concentración del calcio intracelular es fundamental para entender los mecanismos relacionados con aspectos específicos de la fisiología del espermatozoide, como la capacitación espermática y la reacción acrosomal.¹

La capacitación espermática es un proceso dependiente de calcio que, en condiciones normales, ocurre en el aparato genital femenino y está relacionado con una cascada de cambios bioquímicos.² Estos cambios comprenden un incremento en la concentración de AMPc intracelular, el cual desencadena la activación de la enzima proteína-quinasa-A (PKA),³ y un incremento en la actividad de la proteína-tirosina-quinasa (PTK).⁴ Durante el proceso también hay una ligera pero consistente alcalinización del pH intracelular de aproximadamente 0.14 unidades⁵ (figura 1).

Una vez que está capacitado el espermatozoide es capaz de responder a los receptores de la zona pelúcida, incrementar la concentración de calcio intracelular

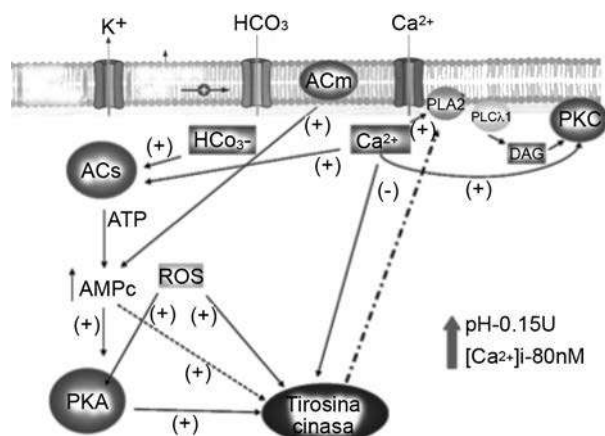


Figura 1. Principales eventos de transducción de señales durante la capacitación *in vitro* del espermatozoide de ratón (modificado de Baldi, 1996).

* Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana, Hospital Ángeles, México.

** Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, México, DF.

Correspondencia: Dra. Paloma del Carmen Neri Vidaurri. Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana. Hospital Ángeles, México. Agrarismo 208, 1^{er} piso, Torre A, int. 102, cononia Escandón, CP 11800, México, DF. Correo electrónico:

y, por tanto, inducir la reacción acrosomal, un proceso que permite al espermatozoide cruzar la zona pelúcida y fusionarse con el oolema del ovocito.

Los mecanismos de entrada de calcio inducidos por la fusión del espermatozoide con los receptores de la zona pelúcida son muy estudiados en espermatozoide de ratón, en donde se ha demostrado que se produce un flujo iónico que origina una despolarización y un pico de calcio en milisegundos en espermatozoides capacitados y, consecuentemente, la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje tipo T.^{6,7}

A través de estudios realizados en el espermatozoide humano, nuestro laboratorio ha detectado la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje que podrían tener un papel muy similar al encontrado en el espermatozoide de ratón.⁸

Dichos canales se detectaron en espermatozoides no capacitados incubados con el marcador fluorescente fura-2, en los cuales se observó: incremento en el influjo de calcio intracelular inducido por una despolarización con potasio,⁷ una inactivación en 90 seg en medio libre de calcio y una hiperestimulación de su actividad al alcalinizar el pH intracelular y al llevar a cabo la capacitación espermática.⁷⁻⁹ De manera que los canales de calcio dependientes de voltaje se estimulan durante la capacitación espermática y al alcalinizar el pH intracelular.

De acuerdo con la sensibilidad que muestran los canales de calcio dependientes de voltaje al pH en el espermatozoide humano capacitado, éstos podrían contribuir en alrededor de 30% de la estimulación total observada en este proceso.¹⁰ Esto sugiere que, además de la alcalinización del pH intracelular, existen otros reguladores bioquímicos que se activan durante la capacitación espermática, los cuales modifican los canales al incrementar aún más la permeación al calcio.

palnevi@ceerh.com

Recibido: enero, 2009. Aceptado: febrero, 2009.

Este artículo debe citarse como: Neri VPC, Torres FV, González MMT. Sensibilidad de los canales de calcio dependientes del voltaje al pH intracelular en el espermatozoide humano capacitado. Efecto modulador del AMPc. Rev Mex Reprod 2009;1(3):102-8.

La versión completa de este artículo también está disponible en: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

OBJETIVO

Al considerar lo anterior, examinamos el efecto de incrementar el AMPc intracelular con el inhibidor de fosfodiesterasas papaverina durante 5 min en espermatozoides no capacitados a una concentración de 0.5 mM (concentración seleccionada con un bioensayo) y se cuantificó el aumento del calcio intracelular inducido con progesterona, una hormona que se encuentra de manera natural en el aparato femenino y que participa en la capacitación espermática y la reacción acrosomal.

MATERIAL Y METODO

Se realizó un estudio prospectivo con muestras de semen de pacientes normoespérmicos (previa autorización del consentimiento informado), obtenidas en el laboratorio de andrología del Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana del Hospital Ángeles, México, DF.

Se utilizó el marcador fluorescente fura ff-AM (Molecular Probes) que permite la detección de calcio intracelular y BCECF (Sigma Aldrich) para la medición del pH intracelular, y un medio para espermatozoides con buffer de HEPES (H-HSM) diseñado por Suárez y col.⁷ El medio de capacitación fue el mismo, a excepción que el HEPES se sustituyó por 25 mM de NaHCO_3 y 3 mg/mL de HSA (Sigma, fraction V) [figura 2].

Para medir el aumento del AMPc, los espermatozoides se obtuvieron previa centrifugación en gradientes de percoll y se incubaron 40 min con 5 μM de fura ff-AM. Al término de la incubación se retiró el exceso

del marcador mediante lavado y cada muestra se dividió en tres grupos experimentales con aproximadamente 100×10^6 espermatozoides/mL: a) espermatozoides incubados con 0.5 mM de papaverina, b) espermatozoides sin papaverina y c) espermatozoides capacitados sin papaverina. Todos incubados a 37 °C (figura 3). Para la alcalinización progresiva del medio de cultivo se utilizaron diferentes concentraciones de NH_4Cl y al mismo tiempo se registró su efecto en los tres grupos experimentales de espermatozoides.

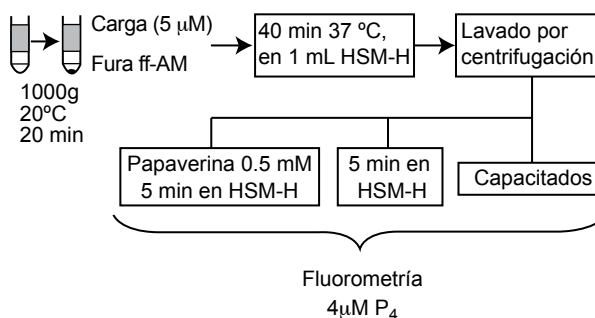


Figura 3. Diseño experimental para la medición del AMPc.

Para corroborar el efecto de la papaverina sobre el aumento del AMPc, éste se midió con el equipo de inmunoensayo para AMPc EIA (Zymed Laboratories) [figura 4].

RESULTADOS

La fluorescencia se detectó a 488 nm, los valores se convirtieron a valores de calcio intracelular con la ecuación de Grynkiewicz. Los resultados se reportaron como el promedio \pm desviación estándar. Los grupos se compararon por ANOVA o *t* pareada. Los resultados $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

La figura 5 muestra el efecto del pH intracelular sobre la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje de espermatozoides capacitados y no capacitados, en la capacitación espermática produce una estimulación de la entrada de calcio dependiente del voltaje que dependió de la concentración de NH_4Cl , se duplicó aproximadamente con 10 mM de NH_4Cl . La capacitación de las mismas células produjo una estimulación notable de los canales de calcio dependientes de voltaje y una potenciación alrededor de

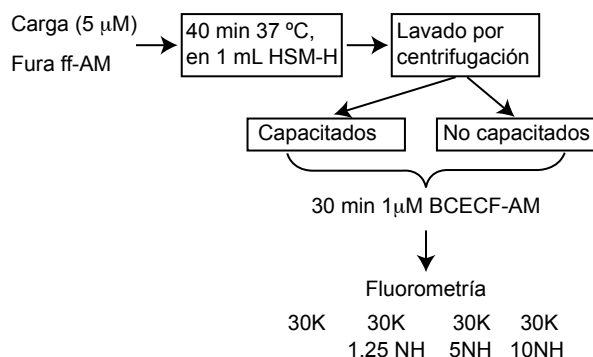


Figura 2. Diseño experimental para la detección de calcio.

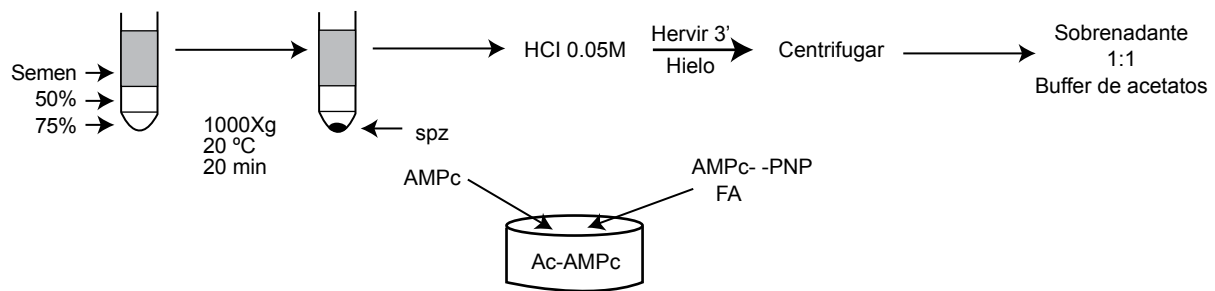


Figura 4. Metodología del equipo de inmunoensayo para AMPc EIA (Zymed Laboratories).

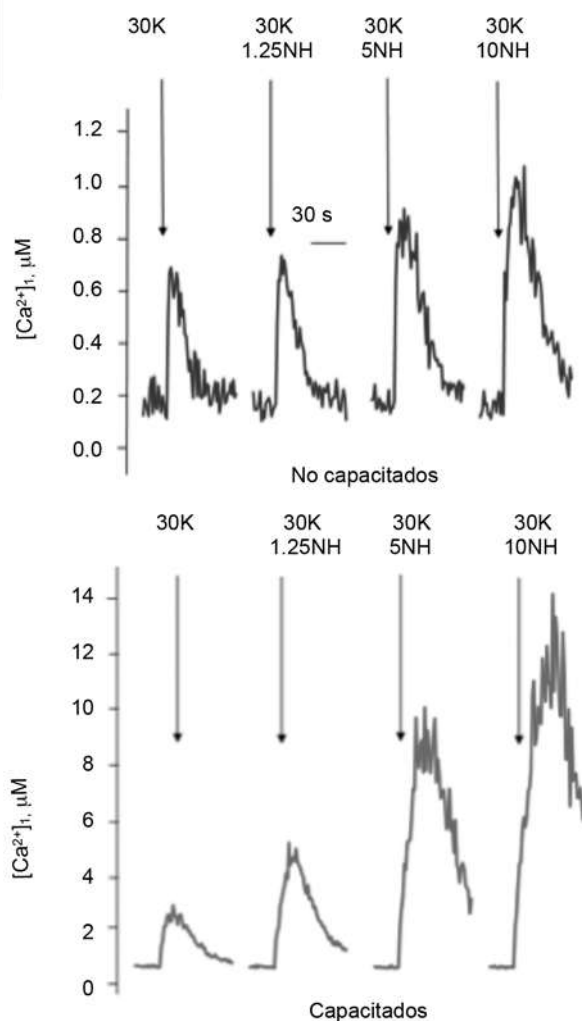


Figura 5. Efecto del NH_4Cl en el influjo de calcio: indujo una despolarización en espermatozoides no capacitados y en capacitados. En ambas condiciones fisiológicas la estimulación del influjo de calcio dependió de la cantidad de NH_4Cl adicionada.

10 veces en su respuesta al NH_4Cl . Por ejemplo, en el no capacitado, la despolarización con 10 mM NH_4Cl produjo un $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ de $1.35 \pm 1 \mu\text{M}$, en tanto que en el espermatozoide capacitado el resultado fue de $8 \pm 2 \mu\text{M}$.

La figura 6 muestra el registro temporal de pH intracelular en células no capacitadas y capacitadas y sus respuestas a las diferentes concentraciones de NH_4Cl utilizadas. Como era de esperarse, el valor de pH intracelular en los espermatozoides capacitados fue más alcalino (6.80) respecto a los no capacitados (6.65). El NH_4Cl indujo en ambos grupos elevaciones cuasi instantáneas del pH intracelular; pero en el caso de los espermatozoides capacitados, éstas fueron más alcalinas.

El NH_4Cl produce una mayor alcalinización en los espermatozoides capacitados que en los no capacitados. El pH intracelular de reposo en espermatozoides capacitados (6.80 ± 0.02) fue 0.15 unidades más alcalino que el de los espermatozoides no capacitados (6.65 ± 0.03).

En la figura 7 se observa que, aun cuando la alcalinización del pH intracelular (pHi) en células capacitadas fue mayor, el influjo de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje es mucho mayor en las células capacitadas, con una tasa de incremento de $49 \mu\text{M}/\text{pHi}$, mientras que para los espermatozoides no capacitados fue de $6.7 \mu\text{M}/\text{pHi}$; esto es, la sensibilidad de los canales de calcio dependientes de voltaje al pH intracelular se incrementó alrededor de siete veces en condiciones de capacitación. Este resultado sugiere que cuando el espermatozoide se capacita, el pH intracelular modula de manera cualitativamente diferente los canales de calcio dependientes de voltaje e indica la posibilidad de que exista un modulador central en la capacitación; en este caso el AMPc pudiera intervenir en dicha estimulación.

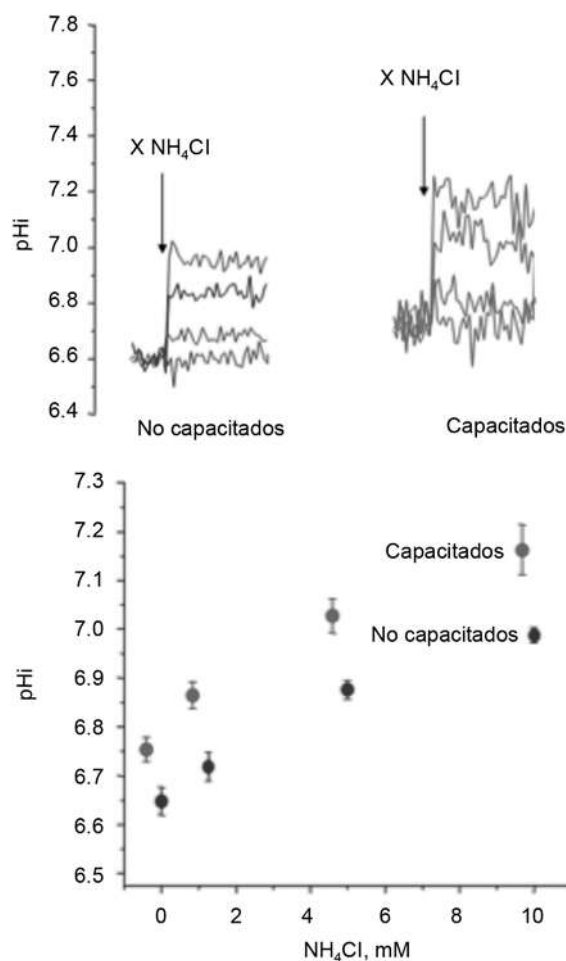


Figura 6. Efecto del NH_4Cl en el pH intracelular de espermatozoides no capacitados y capacitados. Se comparan los pH intracelulares alcanzados con las adiciones de NH_4Cl -KCl en espermatozoides no capacitados y capacitados.

Para corroborar la participación del AMPc sobre los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), en la figura 8 se observa el efecto de la exposición a papaverina en el influjo de calcio a través de los CCDV en: *a*) espermatozoides no capacitados, *b*) espermatozoides no capacitados + papaverina y *c*) espermatozoides capacitados. Se observó que la papaverina produce una notable estimulación en la entrada de calcio inducida por despolarización (adición de NH_4Cl).

La estimulación con papaverina aumentó significativamente el calcio intracelular en espermatozoides no

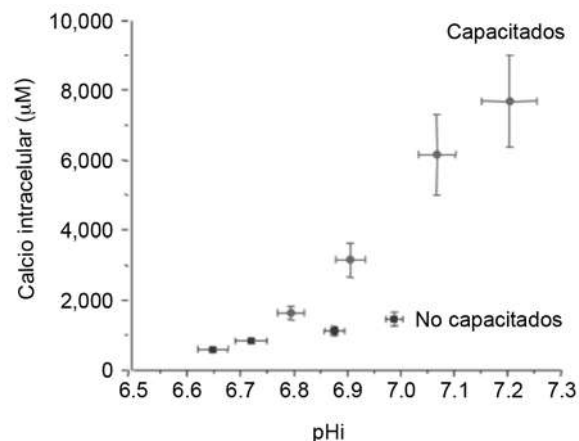


Figura 7. Influjo de calcio dependiente del voltaje en función del pH intracelular en espermatozoides humanos no capacitados y capacitados.

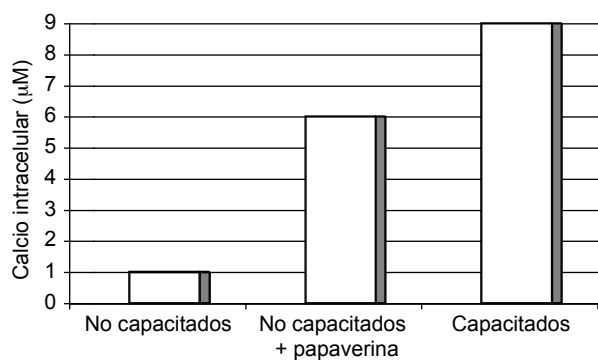


Figura 8. Efecto de la papaverina en el incremento del calcio intracelular inducido por progesterona. Los 5 min de incubación con papaverina aumentaron cinco veces el calcio en espermatozoides no capacitados (control), no capacitados + papaverina y capacitados.

capacitados; sin embargo, el influjo de calcio observado en los espermatozoides con papaverina capacitados es aún mayor.

El efecto de la papaverina se comparó con el de la pentoxifilina, un inhibidor ampliamente usado en la clínica. Fue interesante que la preincubación con pentoxifilina no incrementó el calcio tanto como la papaverina (figura 9).

Debido a estos hallazgos se cuantificó el contenido de AMPc en: *a*) espermatozoides no capacitados, *b*) espermatozoides no capacitados + papaverina, *c*)

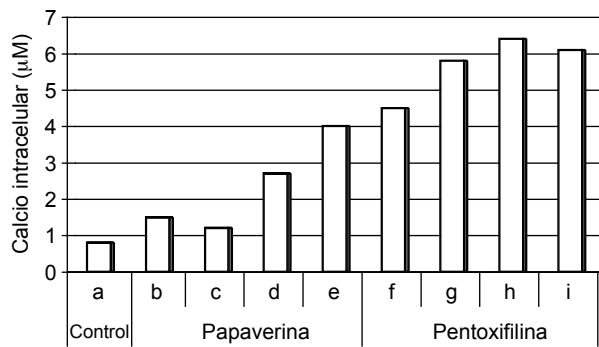


Figura 9. Efecto comparativo de la papaverina y la pentoxifilina en el aumento de calcio intracelular inducido por progesterona. Espermatozoides no capacitados se incubaron con pentoxifilina o papaverina.

a: control; b,f: 0.25 mM; c,g: 0.5 mM; d,h: 1.0 mM; e,i: 2.0 mM de papaverina y pentoxifilina.

espermatozoides no capacitados + pentoxifilina y d) espermatozoides capacitados.

Con base en los resultados anteriores, la cantidad de AMPc se duplicó durante la capacitación y la exposición con papaverina cuadruplicó los valores (de 1.1 ± 0.4 a 5.2 ± 0.7 pmol/ 10^7) con respecto de los espermatozoides no capacitados y por arriba de la pentoxifilina (figura 10).

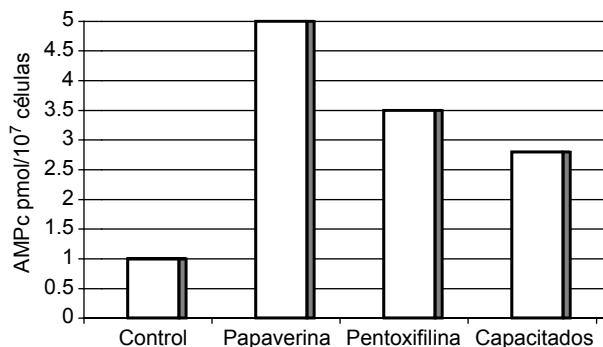


Figura 10. Cuantificación de la concentración de AMPc en espermatozoides no capacitados (control), expuestos a papaverina, a pentoxifilina y capacitados.

CONCLUSIONES

Aunque los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) se han identificado sólo en espermatozoides de ratón, las evidencias sugieren la existencia de CCDV

tipo T en el espermatozoide humano.⁸ Estudios recientes mencionan que el espermatozoide de mamífero (ratón) tiene un canal llamado Catsper 1, una forma de canales de calcio dependientes de voltaje requerido para adquirir la motilidad⁹ y también se ha relacionado con astenozoospermia en el espermatozoide humano.¹⁰

Se ha sugerido que reguladores bioquímicos tales como AMPc, proteína-quinasa-A (PKA) o proteína-tirosina-quinasa (PTK), los cuales incrementan su actividad durante la capacitación espermática,³ podrían producir cambios en los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) como resultado del incremento observado en la sensibilidad al pH intracelular. Dada la participación de los CCDV en la reacción acrosomal inducida, principalmente por la zona pelúcida,⁵ consideramos que el incremento de la sensibilidad al pH intracelular de los CCDV, reportado en este trabajo, puede ser el mecanismo por el cual la zona pelúcida induce la reacción acrosomal sólo en espermatozoides capacitados. Se observó que una ligera alcalinización del pH intracelular estimula de manera potencial la apertura de los CCDV en espermatozoides humanos capacitados alrededor de siete veces, es decir, la sensibilidad de los CCDV al pH intracelular depende de las condiciones fisiológicas de la célula.

En este trabajo también demostramos que una ligera exposición (5 min) de los espermatozoides humanos no capacitados con 0.5 mM de papaverina incrementó el contenido de AMPc, observado en el aumento de calcio intracelular, con concentraciones más altas que las obtenidas con pentoxifilina.

Consideramos realizar a futuro bioensayos con espermatozoides no capacitados incubados con papaverina para la inseminación de ovocitos de mamíferos inferiores, para que posteriormente se use también la papaverina en pacientes con astenozoospermia o biopsia testicular con fines de reproducción asistida, en donde generalmente se usa pentoxifilina con tiempos más largos de incubación; para así no sólo disminuir ese tiempo, sino también incrementar con mayor efectividad su movilidad aumentando con certeza las concentraciones de calcio intracelular, que en el espermatozoide humano es fundamental en los mecanismos implicados en la capacitación espermática, y sobre todo en la reacción acrosomal.

REFERENCIAS

1. Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Treviño CL, et al. Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* 2005;243:79-172.
2. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G. Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J Reprod Immunol* 2002;53:121-31.
3. Luconi M, Porazzi I, Ferruzzi P, Marchiani S, et al. 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* 2005;72:22-32.
5. Cross N, Razy-Faulkner P. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod* 1997;56:1169-74.
6. Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, et al. 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)* 1999;96:6757-62.
7. Suarez SS, Wolf DP, Meizel S. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 1986;14:107-21.
8. Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, et al. CatSper1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:14864-8.
9. Schuhmann K, Voelker C, Höfer GF, Pflügelmeier H, et al. Essential role of the beta subunit in modulation of C-class L-type Ca^{2+} channels by intracellular pH. *FEBS Lett* 1997;408:75-80.
10. Fraire-Zamora JJ, González-Martínez MT. Effect of intracellular pH on depolarization-evoked calcium influx in human sperm. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 2004;287:1688-96.