

Aplicación de calmodulina como capacitador espermático

MD Arellano Carillo,* A Borrego,* E Soto Canales,* R Rivas Cáceres*

RESUMEN

Objetivo: mostrar el comportamiento de los espermatozoides humanos expuestos a calmodulina (CaM) y a otros factores, como ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES), adenosín trifosfato (ATP) y voltajes.

Material y método: la muestra fue de tres pacientes con cinco días de abstinencia sexual. Se utilizaron una cámara de Makler (obtenida de Invitrogen®), un amplificador de patch clamp EPC 7 (HEKA Elektronik) y un sistema de adquisición analógico-digital de 12 bits (Indec Systems), así como ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES), adenosín trifosfato (ATP) y calmodulina (CaM), obtenidos de Sigma-Aldrich. Las muestras en fresco se refrigeraron a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, se realizó la espermatobioscopia directa (EBD) utilizando los criterios de la Organización Mundial de la Salud (1999) y teniendo en cuenta el volumen de la muestra, el número de espermatozoides que contenía cada mililitro y el porcentaje de espermatozoides con movilidad, y ésta se clasificó así: A) movimiento progresivo rápido, B) movimiento progresivo lento, C) *in situ*, y D) sin movimiento.

Resultados: las muestras perdieron movimiento después de permanecer 24 horas en refrigeración; se cuantificaron 42 X 10⁶ espermatozoides sin movimiento. Se utilizó un mililitro de solución de HEPES y los espermatozoides recuperaron el movimiento (B + C) en 80%. La utilización de CaM (1 µg/µL) y ATP (1 mM) también activó a los espermatozoides, ya que 90 a 100% de éstos recuperaron el movimiento (A + B). En el grupo control hubo pérdida de movimiento a las ocho horas; con CaM el movimiento se perdió aproximadamente a los 20 min, y las moléculas de CaM y ATP se asociaron al parecer, ya que ambas moléculas se encuentran implicadas en mantener el equilibrio de Ca²⁺, lo cual confirió mayor tiempo de movimiento espermático (aproximadamente 20 horas). En el grupo control (tratamiento 1) los espermatozoides perdieron movimiento debido a que durante 24 horas permanecieron a 4°C. Con HEPES (tratamiento 2) el movimiento de los espermatozoides aumentó. Con la utilización de CaM-ATP (tratamiento 3) se observó que el movimiento espermático fue superior al tratamiento 1 (grupo control) y al tratamiento 2 (con HEPES).

Conclusión: con la calmodulina (CaM) el movimiento se pierde a los 20 min. Con la utilización de HEPES el movimiento de los espermatozoides aumentó por los fosfatos que contiene. CaM y ATP mostraron asociación, lo que le confirió mayor tiempo de movimiento progresivo (A + B) al espermatozoide, y cuando los espermatozoides fueron sometidos a diferentes estímulos eléctricos, se detectó que el movimiento espermático descende cuando se aplican mayores estímulos eléctricos, probablemente por alteración de las proteínas voltaje dependientes, que son importantes para la capacitación espermática. La apertura de los canales de Ca²⁺ de la membrana plasmática, dependientes de CaM y ATP, probablemente promueve la capacitación espermática. Con los resultados de este trabajo la calmodulina (CaM) puede establecerse como una nueva técnica de reproducción asistida en inseminación artificial en humanos.

Palabras clave: calmodulina (CaM), calcio (Ca²⁺), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES), adenosín trifosfato (ATP).

ABSTRACT

Objective: To show the behavior of human sperm exposed to calmodulin (CaM) and other factors, such as 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES), adenosine triphosphate (ATP) and voltages.

Material and method: The sample was obtained from three patients with five days of sexual abstinence. We used a Makler chamber (obtained from Invitrogen®), a patch clamp amplifier EPC 7 (HEKA Elektronik) and an analog-digital acquisition of 12 bits (Indec Systems) and 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES), adenosine triphosphate (ATP) and calmodulin (CaM), obtained from Sigma-Aldrich. The samples were refrigerated fresh at 4°C for 24 hours. Subsequently, semen samples was performed directly (EBD) using the criteria of the World Health Organization (1999) and taking into account the volume of the sample, the number of sperm contained in each milliliter and the percentage of sperm motility and it was classified as follows: A) rapid progressive movement, B) slow progressive motion, C) *in situ*, and D) without movement.

Results: Samples movement lost after 24 hours under refrigeration, were measured 42 X 10⁶ sperm without movement. One milliliter of HEPES solution was used and recovered sperm movement (B + C) in 80%. The use of CaM (1 mg/µL) and ATP (1 mM) also activated the sperm, as 90 to 100% of these recovered movement (A + B). In the control group there was lost of movement at the hour 8, with CaM motion was lost approximately in 20 min, and molecules CaM and ATP are apparently associated because both molecules are involved in maintaining the balance of Ca²⁺, which conferred more sperm movement time (approximately 20 hours). In the control group (treatment 1) sperm lost movement because they remained for 24 hours at 4°C. With HEPES (treatment 2) sperm movement increased. With the use of CaM-ATP (treatment 3) sperm movement was superior to treatment 1 (control group) and treatment 2 (with HEPES).

Conclusion: With calmodulin (CaM) the motion is lost after 20 min. With the use of HEPES sperm movement increased by phosphates in it. CaM and ATP showed an association, which gave him more time progressive movement (A + B) sperm, and when the sperm were submitted to different electrical stimuli, sperm movement down when higher electrical stimulation is applied, probably by alteration of voltage-dependent proteins that are important for sperm capacitation. The opening of ATP- and CaM-dependent Ca^{2+} channels of the plasma membrane probably promotes sperm capacitation. With the results of this work calmodulin (CaM) can be established as a new technique of assisted reproduction in artificial insemination in humans.

Key words: calmodulin (CaM), calcium (Ca^{2+}), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES), adenosine triphosphate (ATP).

El proceso de capacitación del espermatozoide, un requisito indispensable para que ocurra la fecundación en mamíferos, es un proceso dinámico y complejo que ocurre normalmente en el tubo genital femenino y que modifica, entre otros muchos fenómenos, las propiedades de la membrana plasmática, lo cual le confiere al espermatozoide la capacidad de responder a estímulos externos y de desencadenar la reacción acrosomal y la subsecuente penetración al óvulo. La albúmina sérica desempeña una función determinante en los cambios membranales que ocurren en los espermatozoides durante la capacitación; también se ha demostrado que ésta incrementa la llamada “corriente de ventana” en las células espermatogénicas del ratón; es decir, el influjo de Ca^{2+} que normalmente se observa durante el reposo.¹ En contraposición a este efecto estimulador, se ha visto que cuando el β -estradiol se aplica en las concentraciones micromolares inhibe significativamente en dichas células la actividad de canales de Ca^{2+} . Estos resultados sugieren que la albúmina y el estradiol podrían tener una función importante en la regulación de canales de Ca^{2+} en las células espermato-

togénicas y, asimismo, pudieran ser importantes en el proceso de capacitación espermática.¹ Además de los cambios que ocurren en el Ca^{2+} , uno de los eventos centrales en el proceso de capacitación es el desarrollo de una hiperpolarización de la membrana plasmática, hiperpolarización que se asocia con eflujo de K^+ .²⁻⁴ Estudios electrofisiológicos en células espermatogénicas han resultado de enorme utilidad para establecer la funcionalidad de la capacitación del espermatozoide. Hagiwara y Kawa⁵ inicialmente demostraron que la corriente de Ca^{2+} aumentaba durante la espermatogénesis, mientras que la corriente de K^+ disminuía. Algunos estudios han sugerido la existencia de un tipo adicional de canales de K^+ activado por ATP y sensible a caribdotoxina (CTX).⁶ Este tipo de corriente también puede activarse por ionóforos de Ca^{2+} , lo que sugiere que se trata de una corriente a través de canales de K^+ activados por Ca^{2+} . En general, cualquier agente que cause entrada de Ca^{2+} dentro del acrosoma del espermatozoide y que cause un incremento en el pH ocasionará capacitación espermática.⁷ La calmodulina (CaM) también está implicada en la regulación de flujos de Ca^{2+} a través de las membranas.⁸ La CaM ejerce su acción a través de la activación de la ATPasa de Ca^{2+} ,⁹ enzima localizada en la región posacrosomal de la cabeza espermática. La función de esta enzima es mantener bajas las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} mediante el bombeo de este catión al exterior celular; en la actualidad se ha identificado la existencia de la enzima PMCA4b en el espermatozoide humano, enzima que desempeña una función importante en la hiperactividad, movilidad y fertilidad del espermatozoide;¹⁰ esta enzima es activada por CaM, entre otras proteínas. El objetivo de este trabajo es mostrar el comportamiento de los espermatozoides humanos expuestos a CaM y a otros factores, como HEPES, ATP y voltajes.

* Departamento de Ciencias Básicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

Correspondencia: MD Arellano Carillo. Henry Dunant 4016, AP 1729-D, CP 32315, Ciudad Juárez, Chihuahua, México.
Recibido: agosto, 2011. Aceptado: octubre, 2011.

Este artículo debe citarse como: Arellano-Carillo MD, Borrego A, Soto-Canales E, Rivas-Cáceres R. Aplicación de calmodulina como capacitador espermático. Rev Mex Reprod 2011;4(2):86-91.

MATERIAL Y MÉTODO

La muestra fue de tres pacientes con cinco días de abstinencia sexual. Se utilizaron una cámara de Makler (obtenida de Invitrogen®), un amplificador de patch clamp EPC 7 (HEKA Elektronik) y un sistema de adquisición analógico-digital de 12 bits (Indec Systems), así como ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES), adenosín trifosfato (ATP) y calmodulina (CaM), obtenidos de Sigma-Aldrich.

Las muestras en fresco se refrigeraron a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, se realizó la espermatobioscopia directa utilizando los criterios de la Organización Mundial de la Salud (1999)¹¹ y teniendo en cuenta el volumen de la muestra, el número de espermatozoides que contenía cada mililitro y el porcentaje de espermatozoides con movilidad, y ésta se clasificó así: A) movimiento progresivo rápido, B) movimiento progresivo lento, C) *in situ*, y D) sin movimiento. Se consideró el número total de espermatozoides móviles útiles (A + B); estas características se tomaron en cuenta sólo para la movilidad espermática con HEPES a 20 mM, ATP a 1 mM, CaM a 1 µg/µL y diferentes voltajes (0.5, 3.0 y 5.0 mV). Posteriormente, se observó el comportamiento espermático en todas las variaciones.

RESULTADOS

Las muestras perdieron movimiento después de permanecer 24 horas en refrigeración; se cuantificaron 42 X 10⁶ espermatozoides sin movimiento. Se utilizó 1 mL de solución de HEPES y los espermatozoides recuperaron el movimiento (B + C) en 80%. La utilización de CaM (1 µg/µL) y ATP (1 mM) también activó a los espermatozoides, ya que 90 a 100% de éstos recuperaron el movimiento (A + B).

En la Figura 1 se muestra cómo se movieron los espermatozoides en relación con diferentes tiempos. En el grupo control hubo pérdida de movimiento a las ocho horas (Figura 1A); con CaM el movimiento se perdió aproximadamente a los 20 min (Figura 1B), y las moléculas de CaM y ATP se asociaron al parecer, ya que ambas moléculas se encuentran implicadas en mantener el equilibrio de Ca²⁺, lo cual confirió mayor tiempo de movimiento espermático (aproximadamente

20 horas [Figura 1C]). La pérdida de enzimas reguladoras del equilibrio de Ca²⁺ causa pérdida de movilidad y fertilidad, las cuales son necesarias para atravesar el tubo genital femenino.¹²

En la Figura 2 se observó que en el grupo control (tratamiento 1) los espermatozoides perdieron movimiento debido a que durante 24 horas permanecieron a 4°C. Con HEPES (tratamiento 2) el movimiento de los espermatozoides aumentó debido a que la solución de HEPES contiene fosfatos que ayudan a la formación de ATP y que permiten el movimiento debido a la hidrólisis de ATP. Con la utilización de CaM-ATP (tratamiento 3) se observó que el movimiento espermático fue superior al tratamiento 1 (grupo control) y al tratamiento 2 (con HEPES).

En la Figura 3 se muestra cómo se movieron los espermatozoides al ser estimulados con diferentes soluciones (HEPES y CaM-ATP) y estímulos eléctricos (0.5, 3.0 y 5.0 mV). El grupo control mostró movimiento nulo debido a que los espermatozoides estuvieron refrigerados durante 24 horas a 4°C (○); con HEPES y estímulos eléctricos mostraron movimiento de 80%, lo cual fue un comportamiento similar al que se obtuvo con HEPES en las Figuras 1A y 1B; sin embargo, con estímulos mayores de voltaje (3.0 y 5.0 mV) el movimiento espermático descendió. Con CaM-ATP se produjo un fenómeno de aumento (entre 90 y 100%) en el movimiento espermático, aunque el movimiento descendió cuando se incrementó el voltaje (3.0-5.0 mV).

DISCUSIÓN

La calmodulina (CaM), una proteína intracelular cuya función más desempeñada es la unión a calcio, media la regulación de una gran variedad de enzimas. Su concentración varía entre 5 y 100 nM.¹³ Esta proteína se une de manera específica ($K_d = 4.2$ nM) a segmentos ricos en aminoácidos básicos;^{14,15} por tanto, la especificidad de la calmodulina (CaM) en las proteínas pudiera estar provocando la capacitación espermática o el aumento de la movilidad (A + B).

Investigaciones hechas por Muñoz-Garay y col.⁴ mostraron que las células espermáticas de ratón a voltajes hiperpolarizantes muestran corriente entrante inactivante de rápida activación y sensible al pH, cuya

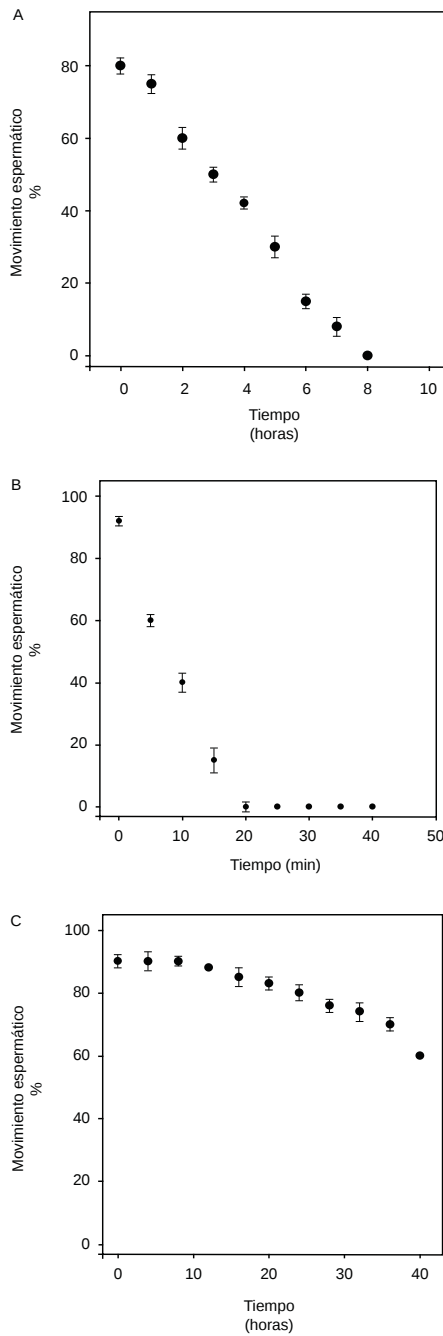


Figura 1. Movimiento espermático en el grupo control, en el grupo tratado con CaM y en el grupo tratado con CaM-ATP relacionado con el tiempo. A) Forma nativa espermática. B) Movilidad espermática que se produce con CaM, aunque el movimiento (A + B) disminuye aproximadamente a los 20 min. C) Movimiento espermático (A + B) que durante más de 20 horas se produce con CaM-ATP.

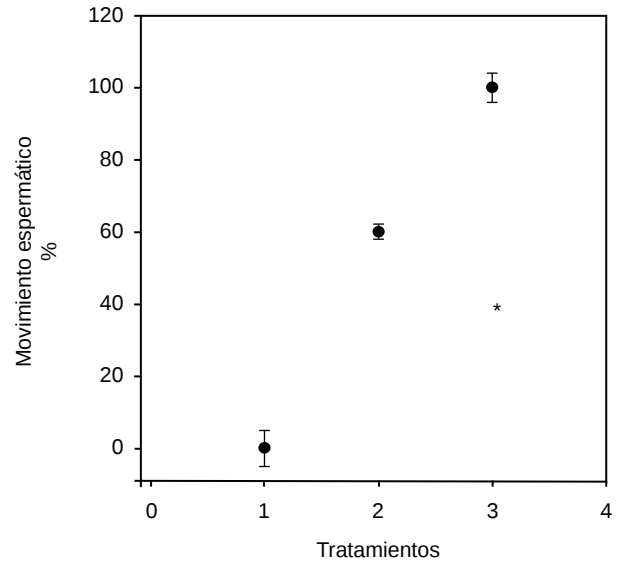


Figura 2. Movimiento espermático con HEPES y CaM-ATP. El grupo de tratamiento 1 muestra un control sin movimiento aparente. En el grupo tratado con HEPES (tratamiento 2) se observa una recuperación de movimiento de 60%. En el grupo tratado con CaM-ATP (tratamiento 3) se observa que el movimiento aumenta a 100% ($p < 0.0003^*$).

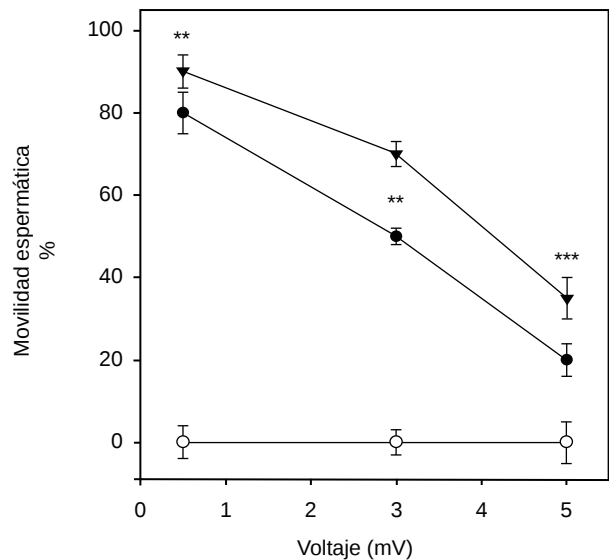


Figura 3. Movimiento espermático con HEPES, CaM-ATP y diferentes estímulos de voltaje (0.5, 3.0 y 5.0 mV). El grupo control (○), el grupo con HEPES (●) y el grupo con CaM-ATP (▼) * $p < 0.0582$, ** $p < 0.0014$, *** $p < 0.0001$.

magnitud –que depende del K^+ externo– se bloquea con concentraciones micromolares de Cs^+ y Ba^{2+} . La existencia de este tipo de canales abre la posibilidad de que sean precisamente los canales de K^+ rectificadores entrantes los que determinen el potencial de reposo en las células espermatogénicas y en los espermatozoides maduros. Además, el cambio de pH_i que ocurre durante la capacitación podría activar estos canales e influir de manera importante en el desarrollo de este proceso;⁷ antes de la capacitación, el pH_i en el espermatozoide es relativamente ácido, lo que contribuye a prevenir el estado capacitado, a prolongar la viabilidad de las células durante su estancia en el epidídimo y a inhibir la reproducción asistida espontánea,² mientras que durante la capacitación espermática ocurre un incremento en el pH_i (mayor de 0.2 unidades) como resultado de la activación de los dos sistemas intercambiadores de protones,² lo que podría aumentar aproximadamente de 0.5 a 3 veces la probabilidad de apertura de los canales rectificadores entrantes.¹⁶ De esta manera, se ha propuesto que en condiciones fisiológicas el incremento del pH_i durante la capacitación podría activar los canales de K^+ rectificadores entrantes, lo que permitiría un eflujo de iones de K^+ , llevaría el potencial de reposo del espermatozoide hacia el potencial de equilibrio para este ion e hiperpolarizaría consecuentemente la membrana plasmática de las células.⁴

Con objeto de conocer la participación de la calmodulina (CaM) en la capacitación, se estudió la influencia de dos inhibidores de la calmodulina, W7 y calmidazolium (CZ), en la capacitación; la consecuencia de este efecto sería una concentración de Ca^{2+} menor de la necesaria para el proceso de capacitación;¹⁷ en la Figura 1C la movilidad (A + B) se incrementó debido a que el Ca^{2+} extracelular aumentó.

El aumento de las concentraciones de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) activa la proteína cinasa A (PKA) y se incrementa la fluidez de la membrana plasmática, lo cual es una característica de la capacitación.¹⁸

La posibilidad del gasto de energía se ha considerado en presencia de calmodulina (CaM) y en ausencia de adenosín trifosfato (ATP); esto se considera porque en la Figura 1B el espermatozoide duró 20 min en movimiento y porque con HEPES (Figura 1A) el espermatozoide duró ocho horas en movimiento; sin embargo, se muestra

que con CaM-ATP el espermatozoide duró más tiempo en movimiento, ya que el tiempo fue aproximadamente de 20 horas (Figura 1C).

CONCLUSIÓN

Con la calmodulina (CaM) el movimiento se pierde a los 20 min. Con la utilización de HEPES el movimiento de los espermatozoides aumentó debido a que la solución de HEPES contiene fosfatos que ayudan a la formación de ATP y que permiten el movimiento debido a la hidrólisis de ATP. CaM y ATP mostraron asociación, lo que le confirió mayor tiempo de movimiento progresivo (A + B) al espermatozoide.

Una vez sometidos los espermatozoides a diferentes estímulos eléctricos, en el grupo control no hubo ningún movimiento aparente debido a que los espermatozoides estuvieron refrigerados durante 24 horas a 4°C. Con HEPES se observó una recuperación de movimiento de 80% debido a la existencia de fosfatos, los cuales permiten a la célula la formación de ATP mediante enzimas cinasas, incluidas las ATPasas de Ca^{2+} dependientes de ATP; sin embargo, a mayores estímulos eléctricos el movimiento espermático descendió, probablemente por alteración de las proteínas voltaje dependientes, que son importantes para la capacitación espermática. Sin embargo, con CaM-ATP y con voltajes de 5.0 mV el movimiento espermático aumentó entre 90 y 100%, lo cual indica que el movimiento espermático está regulado por factores químicos (CaM y HEPES) y no por factores físicos (voltaje), como los estímulos eléctricos que se utilizaron. Por tanto, la apertura de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática, dependientes de CaM y ATP, probablemente promueve la capacitación espermática. Con los resultados de este trabajo la calmodulina (CaM) puede establecerse como una nueva técnica de reproducción asistida en inseminación artificial en humanos.

REFERENCIAS

1. Espinosa F, López-González I, Muñoz-Garay C, Felix R, et al. Dual regulation of the T-type Ca^{2+} current by serum albumin and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells. *FEBS Lett* 2000;475:251-256.

2. Zeng Y, Clark EN, Florman HM. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 1995;171(2):554-563.
3. Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. Ion channels in sperm physiology. *Physiological Reviews* 1999;79(2):481-510.
4. Muñoz-Garay C, De la Vega-Beltrán JL, Delgado R, Labarca P, et al. Inwardly rectifying K⁺ channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol* 2001;234:261-274.
5. Hagiwara S, Kawa K. Calcium and potassium currents in spermatogenic cells dissociated from rat seminiferous tubules. *J Physiol* 1984;356:135-149.
6. Chan HC, Wu WL, Sun YP, Leung PS, et al. Expression of sperm Ca²⁺-activated K⁺ channels in *Xenopus* oocytes and their modulation by extracellular ATP. *FEBS Lett* 1998;438(3):177-182.
7. First NL, Parrish JL. Sperm maturation and *in vitro* fertilization. 11th Intern Congr. Anim Reprod AI 1988;5:160-168.
8. Peterson RN, Ashraf M, Russell LD. Effect of calmodulin antagonists on CA²⁺ uptake by boar spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;114(1):28-33.
9. Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR. Evidence for Ca⁽²⁺⁾-dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm. *Mol Reprod Dev* 1996;44(1):111-120.
10. Shelly K, Aravindan R, Martin-DeLeon, P. Localization of human sperm PMCA4b which is required for normal motility in mouse sperm. *FASEB J* 2010;24:699.10.a.
11. OMS. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. 4ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 1999;74.
12. Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, et al. Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem* 2004;279(32):33742-33750.
13. Grand RJ, Perry SV, Weeks RA. Troponin C-like proteins (calmodulins) from mammalian smooth muscle and other tissues. *Biochem J* 1979;177:521-529.
14. Vorherr T, Chiesi M, Schwaller R, Carafoli E. Regulation of the calcium ion pump of sarcoplasmic reticulum: reversible inhibition by phospholamban and by the calmodulin binding domain of the plasma membrane calcium ion pump. *Biochemistry* 1992;31(2):371-376.
15. Falchetto R, Vorherr T, Carafoli E. The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci* 1992;1(12):1613-1621.
16. Qu Z, Zhu G, Yang Z, Cui N, et al. Identification of a critical motif responsible for gating of Kir2.3 channel by intracellular protons. *J Biol Chem* 1999;274(20):13783-13789.
17. Colás C, Cebrián-Pérez JA, Muñoz-Blanco T. Identificación de calmodulina e implicación en la capacitación de espermatozoides ovinos. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
18. Visconti P, Moore G, Bailey J, Leclerc P, et al. Capacitation of mouse spermatozoa II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995;121:1139-1150.