



Efecto inducido por la eliminación de calcio en la movilidad del espermatozoide humano capacitado

RESUMEN

Objetivo: evaluar el efecto inducido por eliminación de calcio en la movilidad del espermatozoide humano.

Material y método: estudio prospectivo, efectuado con muestras de semen obtenidas de 12 pacientes normoespéricos con 3-6 días de abstinencia sexual, obtenidas en el Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana, Hospital Ángeles, México, DF. El efecto de eliminar el calcio del medio se realizó con ácido tetraacético de etilenglicol, un quelante de Ca^{2+} . Para observar el efecto en la movilidad de espermatozoides humanos se realizaron varias pruebas; el calcio externo se redujo de 2.5 a 68 nM con la adición de 3.5 mM de EGTA.

Resultados: se observó una reducción lenta del porcentaje de espermatozoides móviles que llega casi a cero, pero es reversible. El efecto de la remoción de Ca^{2+} del medio en la movilidad de los espermatozoides es mejor en espermatozoides no capacitados que en espermatozoides capacitados.

Conclusiones: el calcio es importante para activar y mantener la movilidad en los espermatozoides capacitados y su ausencia tiene mayor repercusión en la movilidad progresiva, principal parámetro a tomar en cuenta en la capacitación espermática y es esencial para que el espermatozoide logre llegar al ovocito y se realice la fecundación.

Key words: espermatozoide humano capacitado, movilidad, calcio.

Paloma Neri-Vidaurre¹
Liliana Martínez-Pérez²
Alberto Vielma-Valdez¹
Ranferi Gaona-Arreola¹
Claudio Serviere-Zaragoza¹
Víctor Torres-Flores²

¹Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana, Hospital Ángeles México.

²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.

Effect induced by calcium elimination on the capacitated human sperm mobility

ABSTRACT

Objective: To assess the effect induced by calcium elimination on human sperm mobility.

Material and method: A prospective study was done with samples of semen obtained from 12 normosperm patients with 3-6 days of sexual abstinence, obtained at Specialized Center in Sterility and Human Reproduction, Hospital Angeles, Mexico City. The effect of elimination calcium was done with tetraacetic acid of etilenglicol, a Ca^{2+} chelant. For observing the effect on mobility of human sperm several tests were done; external calcium was reduced from 2.5 to 68 nM with the addition of 3mM of EGTA.

Results: It was observed a slow reduction in the percentage of mobile sperm that almost reached 0, but it was reversible; recovery was better

Recibido: 22 de septiembre 2014

Aceptado: 12 de noviembre 2014

Correspondencia

Dra. Paloma Neri Vidaurre
Agrarismo 208, 1er piso, torre A
11800 México, DF

Este artículo debe citarse como

Neri-Vidaurre P, Martínez-Pérez L, Vielma-Valdez A, Gaona-Arreola R y col. Efecto inducido por la eliminación de calcio en la movilidad del espermatozoide humano capacitado. Reproducción (Méjico) 2015;7:124-132.



in not-capacitated sperm than in capacitated ones. The effect of removal of Ca^{2+} of media on mobility of sperm was better in not-capacitated sperm than in capacitated ones.

Conclusions: Calcium is important to activate and maintain capacitated sperm mobility and its absence has higher effect on progressive mobility, main parameter to consider in sperm capacitation and is essential for sperm reach ovocyte and fecundation takes place.

Key words: capacitated human sperm, mobility, calcium.

ANTECEDENTES

El espermatozoide humano es incapaz de fertilizar un ovocito inmediatamente después de la eyaculación; los espermatozoides adquieren su capacidad fecundante a través de un proceso llamado capacitación espermática mientras están en el aparato genital femenino. Este complejo proceso permite al espermatozoide aumentar su movilidad para realizar la reacción acrosomal en respuesta a las glucoproteínas de la ZP3 de la zona pelúcida del ovocito.¹

La capacitación espermática es un proceso dependiente de calcio (Ca^{2+}) y está relacionado con una cascada de cambios bioquímicos. Es posible reproducir este proceso *in vitro* al separar los espermatozoides del plasma seminal y resuspendiéndolos en medio fisiológico.^{1,2}

En presencia de bicarbonato (HCO_3^-) y albúmina sérica humana (HSA), que permite la extrusión de colesterol de la membrana celular del espermatozoide permitiendo el transporte de iones, se activa una proteína adenilato ciclase soluble (ACs), también dependiente de Ca^{2+} ³ y, en consecuencia, se produce adenosín monofosfato cíclico a partir de adenosín trifosfato, que a su vez activa una proteína-cinasa-A (pKA). Con esto, el espermatozoide desarrolla una movilidad "hiperactivada", caracterizada por un movimien-

to flagelar vigoroso y amplio, que en medios de cultivo no viscosos se observa una "figura de ocho".⁴ Esto confiere un desplazamiento más efectivo, impulsado por las dineínas, que utilizan la energía de la hidrólisis del adenosín trifosfato para el deslizamiento de los microtúbulos, y evita que el espermatozoide quede atrapado en las criptas uterinas y la adhesión con las células del epitelio uterino, además de facilitar la capacidad de penetrar por las células de la granulosa y corona radiada que rodean al ovocito (Mortimer y col., 1998).

El flujo de iones a través de la membrana celular juega un papel fundamental en la fisiología en todas las células (desde bacterias hasta neuronas), y el espermatozoide no es la excepción. En la actualidad, la mayor parte de la investigación en la fisiología espermática está encaminada a comprender cómo los canales iónicos regulan los eventos relacionados con el proceso de la fecundación, debido a que son instrumentos de diálogo entre el espermatozoide, su medio ambiente y el ovocito. En particular, Ca^{2+} es un segundo mensajero que participa en la regulación de varios procesos fisiológicos del espermatozoide, como la capacitación, la movilidad y la reacción acrosomal.⁵

En la hiperactivación, para su iniciación y mantenimiento se requiere el Ca^{2+} externo, porque

regula directamente los componentes del axonema del flagelo del espermatozoide⁶ e implica la participación de canales de calcio atípicos, denominados Catsper1-4, que únicamente están presentes a lo largo del flagelo de los espermatozoides y son moderadamente dependientes de voltaje.^{4,7-9} La importancia de la hiperactivación es tal, que los ratones con genes inactivados para el gen del Catsper, aun cuando generan espermatozoides de manera normal, son incapaces de hiperactivarse, imposibilitando a los espermatozoides llegar al ovocito, y volviendo a los ratones machos infériles.¹⁰

Un incremento en el Ca^{2+} intraflagelar produce un influjo de Ca^{2+} a través de los canales Catsper1-4, que puede estar asociado con un movimiento flagelar intenso, típico de la hiperactivación. En contraparte, en ausencia de Ca^{2+} externo, los espermatozoides de ratón,⁴ hamster¹¹ y humano decrementan su movilidad.¹² Sin embargo, los espermatozoides desmembrados son capaces de nadar en ausencia de calcio externo.¹¹

Hoy día, los mecanismos de transporte de calcio que establecen la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el reposo no se conocen a detalle, ni los mecanismos que hacen que éste se eleve durante la capacitación.¹³ Por tanto, es evidente que para comprender las bases moleculares de la capacitación y de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos, es necesario estudiar los sistemas de transporte iónico que regulan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Por ello, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto inducido por la eliminación de calcio en la movilidad del espermatozoide humano; partimos del supuesto de que en el espermatozoide humano capacitado, la remoción de Ca^{2+} del medio de cultivo provoca descenso de la movilidad.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo, con muestras de semen obtenidas de 12 pacientes normoespérmeicos con 3-6 días de abstinencia sexual, bajo con-

sentimiento informado, obtenidas en el Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana, Hospital Ángeles, México, DF.

Los espermatozoides se separaron del plasma seminal por centrifugación en un gradiente discontinuo de percoll isotónico 75/50% (ambos gradientes amortiguados a pH 7.4 con hepes 10 mM y NaCl 150 mM), 20 minutos a 300 g, en tubos cónicos de 15 mL.¹⁴

La movilidad espermática se evaluó en los diferentes parámetros analizados por el analizador automatizado de movilidad espermática (CASA) Hamilton-Thorn (Figura 1). Los espermatozoides se resuspendieron en medio capH-HSM (complementado con 25 mM de bicarbonato y 3 mg/mL de HSA) para evitar la adherencia de los espermatozoides a la cámara para el CASA (MicroCell) y preservar su movilidad. Se evaluaron 20 campos adquiridos a 60 Hz en campo



Figura 1. Sistema de análisis automatizado de movilidad espermática (CASA), de la marca Hamilton-Thorn.



oscuro, capturados con un objetivo 20 X a 37°C. De cada tratamiento se cuantificaron de dos a tres mil espermatozoides.

El efecto de eliminar calcio del medio se analizó con ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA), un quelante de Ca^{2+} . Para observar el efecto en la movilidad de espermatozoides humanos se realizaron varias pruebas: se añadieron 3.5 mM de EGTA al medio para disminuir el Ca^{2+} presente de 2.5 mM en el H-HSM a 68 nM. Debido a que la remoción de calcio con EGTA libera protones al medio de H-HSM, la solución concentrada de EGTA (500 mM) se preparó en ~2.2 M de NaOH. En este caso, la adición de 3.5 mM EGTA al H-HSM no cambia el pH (proceso importante para evitar la capacitación espermática y que enmascare los resultados).

La movilidad se determinó en función del tiempo de incubación con EGTA. Las muestras se dividieron en dos grupos: espermatozoides no capacitados (control) y espermatozoides capacita-

dos; cada grupo de estudio se subdividió a su vez en seis grupos, que fueron los diferentes tiempos de incubación con el EGTA, desde tres hasta 18 minutos. Los datos obtenidos se expresaron como medias \pm error estándar, analizados con prueba t de Student de dos colas. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

El efecto de la remoción de Ca^{2+} en espermatozoides no capacitados (control) a diferentes tiempos de incubación (cada 3 minutos) se comunica en la Figura 2; los demás parámetros analizados por el sistema de análisis CASA se muestran en la Figura 3.

El efecto de la remoción de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados a diferentes tiempos de incubación (cada 3 minutos) con EGTA se observa en la Figura 4; los demás parámetros analizados por el sistema de análisis CASA se muestran en la Figura 5.

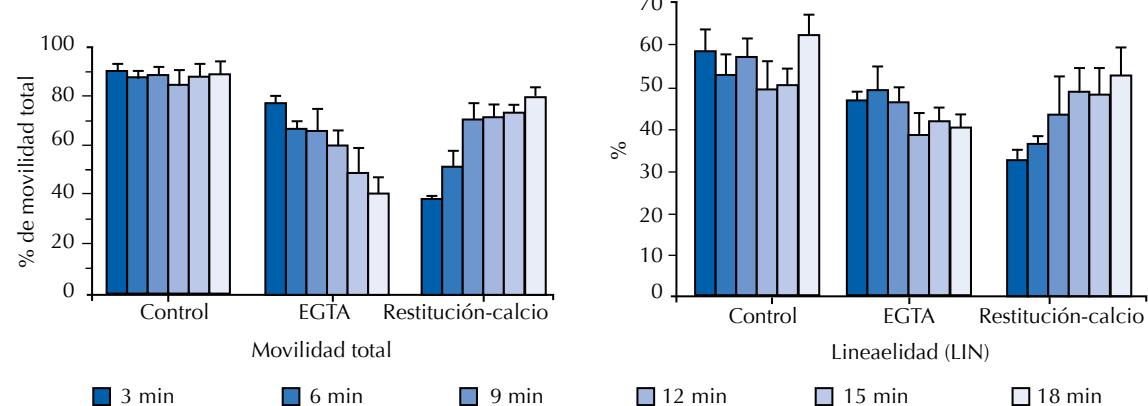


Figura 2. Efecto en la movilidad espermática de espermatozoides no capacitados. El calcio extracelular se redujo de 2.5 a 65 nM mediante la adición de 3.5 mM de ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA) y los espermatozoides se depositaron inmediatamente sobre una placa MicroCell a 37°C. De igual manera, se observa la recuperación del deterioro de la movilidad espermática inducida por la eliminación de calcio al restaurar el Ca^{2+} a 2.5 mM y agregar MgCl_2 3 mM. Los parámetros de movilidad se registraron cada minuto hasta que la movilidad disminuyó. Los registros son representativos de 12 muestras de semen diferentes.

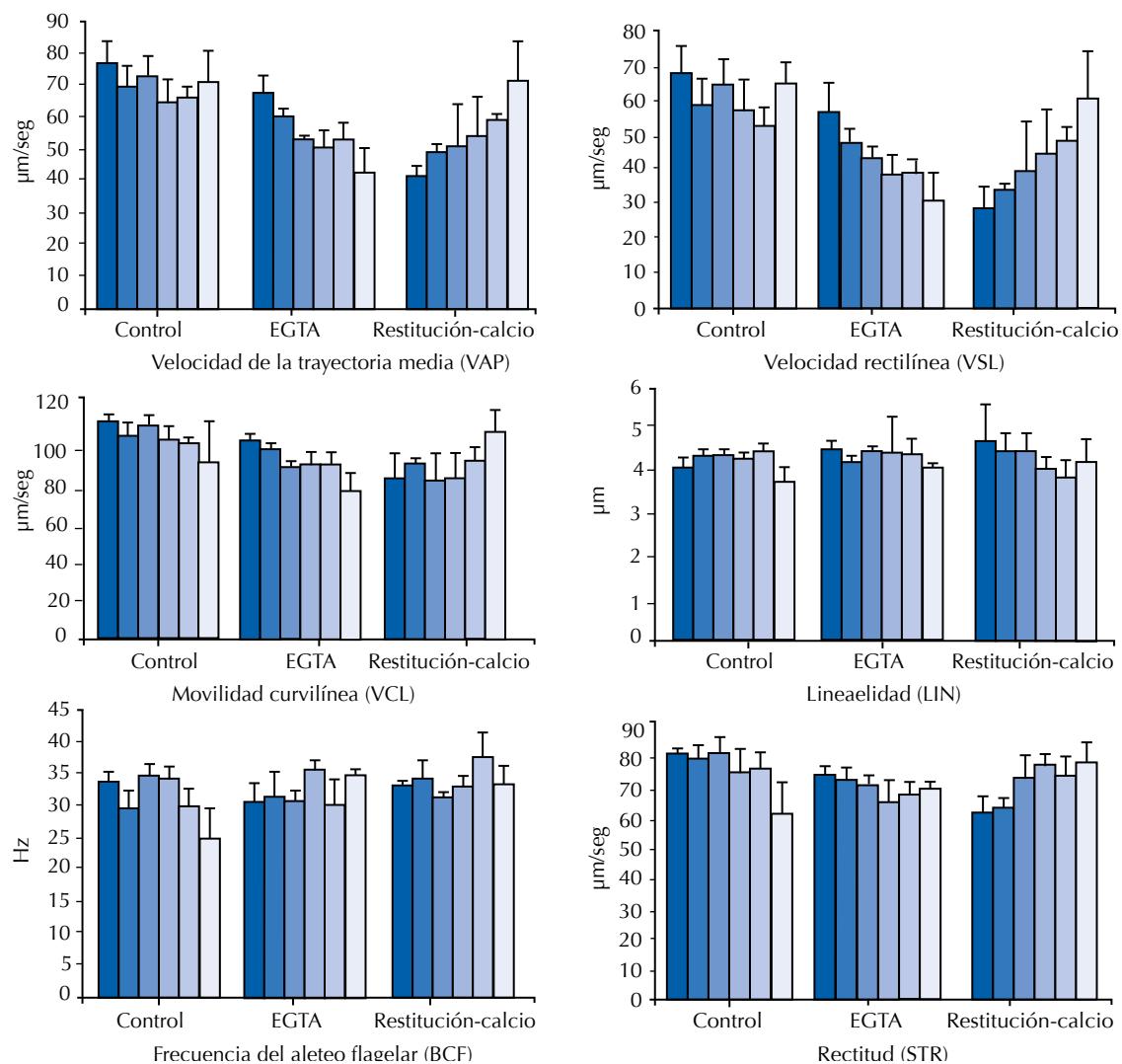


Figura 3. Efecto en la movilidad espermática de espermatozoides no capacitados por la remoción de Ca^{2+} con ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA), en el medio de cultivo, en los diferentes parámetros analizados por el sistema CASA. El efecto del EGTA se observa sobre todo en la velocidad media y rectilínea; en parámetros como desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batido (BCF) e índice de rectitud (STR) no se observa ningún efecto al quitar el Ca^{2+} del medio de cultivo.

DISCUSIÓN

Se comunica el efecto de la remoción de Ca^{2+} del medio en la movilidad de los espermatozoides. El calcio externo se redujo de 2.5 a 68 nM con la

adicción de 3.5 mM de EGTA. Este procedimiento resulta en una reducción lenta del porcentaje de espermatozoides móviles que llega casi a cero, pero es reversible; la recuperación es mejor en espermatozoides no capacitados que en esper-

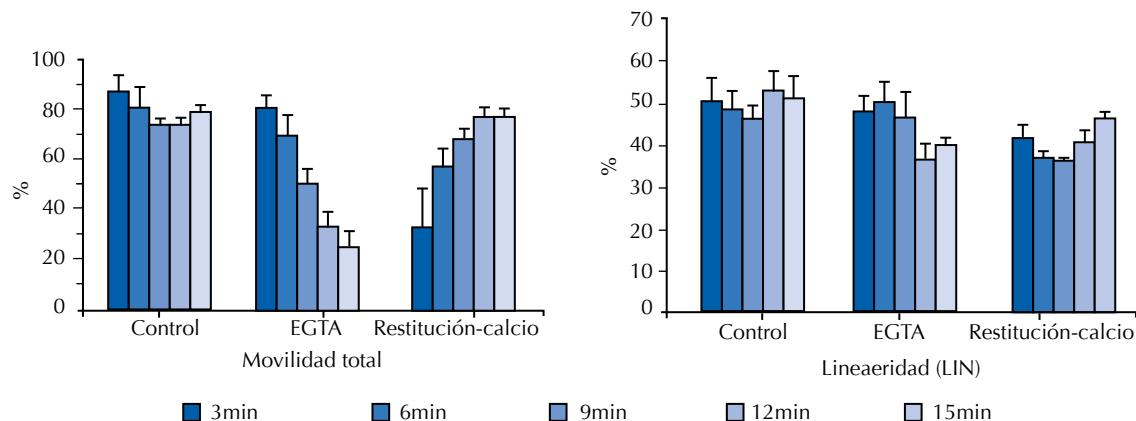


Figura 4. Efecto de la eliminación de calcio en la movilidad espermática en espermatozoides capacitados. El calcio extracelular se redujo de 2.5 a 65 nM mediante la adición de 3.5 mM de ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA) y los espermatozoides inmediatamente se depositaron sobre una placa MicroCell a 37°C. Los parámetros de movilidad se registraron cada minuto hasta que la movilidad disminuyó. De igual manera, se observa la recuperación del deterioro de la movilidad espermática inducido por la eliminación de calcio al restaurar el Ca^{2+} a 2.5 mM al agregar MgCl_2 3 mM. La movilidad se registró cada minuto hasta que se recuperó a concentraciones cercanas al control. Se observa mayor efecto en la pérdida de la movilidad que en los espermatozoides no capacitados. Los registros son representativos de 12 de muestras de semen diferentes.

matozoides capacitados. El tiempo de exposición necesario para reducir 50% la población móvil en la cámara ($t_{1/2}$) fue de $t_{1/2} = 6.8 \pm 1.8$ minutos ($n=6$, \pm error estándar). El valor de $t_{1/2}$ es muy variable: de 2.4 a 14 minutos. En el medio que contiene calcio, la movilidad del espermatozoide se mantuvo alta, casi sin cambios durante el mismo periodo dentro de la cámara. Al tiempo $t_{1/2}$, la movilidad de los espermatozoides control disminuyó en promedio sólo $2.5 \pm 1.8\%$ (8% de disminución máxima y 3% de aumento máximo).

Debido a que la falta de calcio externo es la causa de la despolarización dependiente de Na^+ , que puede prevenirse con magnesio en concentraciones milimolares o por la reducción de sodio externo, era conveniente analizar si la disminución de la movilidad de los espermatozoides está relacionada con este fenómeno. Debido a la variabilidad del efecto de remover el calcio con EGTA en la disminución de la

movilidad de los espermatozoides, esperamos el tiempo necesario para reducir su movilidad a valores cercanos a 25% y en este periodo se probó el efecto con 3 mM de MgCl_2 . Este catión divalente se añadió al medio normal de capHSM antes de agregar EGTA. En los patrones de movilidad frecuencia de batida (BCF) e índice de rectitud (STR), la administración de EGTA y MgCl_2 no afectó la movilidad en espermatozoides no capacitados y capacitados. Sin embargo, en las movilidades total, VSL, VAP y LIN se observó un efecto significativo con la adición de EGTA y la manera en que la posterior restauración del calcio reestablece la movilidad de los espermatozoides no capacitados y capacitados. Un dato interesante es que el EGTA tuvo mayor efecto en la movilidad de los espermatozoides capacitados y el MgCl_2 en los espermatozoides no capacitados; es decir, tuvieron mejor recuperación en cuanto a movilidad espermática. El tiempo necesario para recuperar 50% de

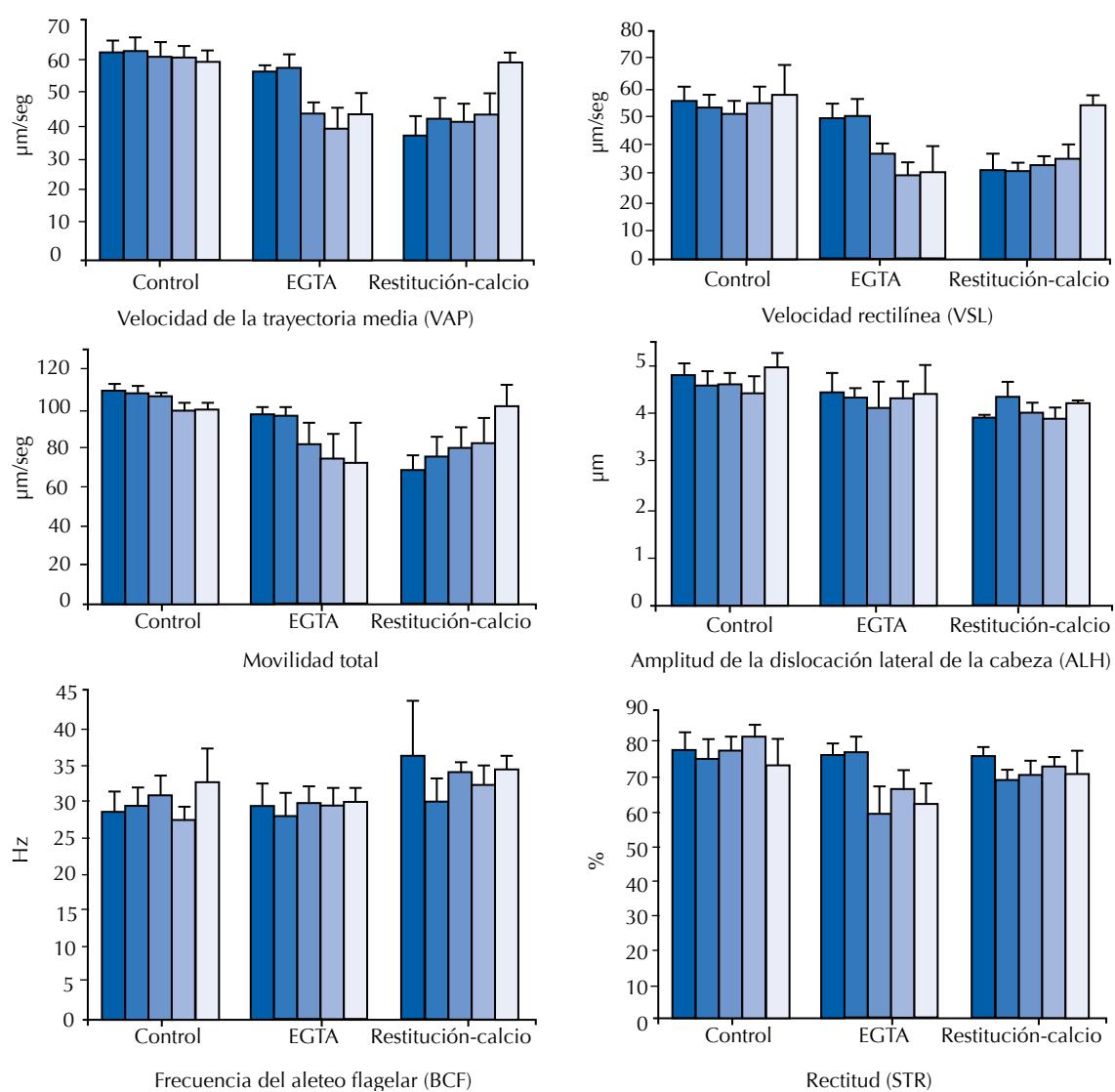


Figura 5. Efecto en la movilidad espermática de espermatozoides no capacitados por la remoción de Ca^{2+} con ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA), en el medio de cultivo, en los diferentes parámetros analizados por el sistema CASA. El efecto del EGTA se observa sobre todo en la velocidad media y rectilínea; en parámetros como desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batido (BCF) e índice de rectitud (STR) no se observa ningún efecto al quitar el Ca^{2+} del medio de cultivo.

movilidad de los espermatozoides ($t\frac{1}{2}_{\text{rec}}$) fue de 4.4 ± 0.8 , 3.9 ± 0.3 y 3.1 ± 0.3 minutos ($n=7 \pm$ error estándar), respectivamente.

En los espermatozoides humanos, al adicionar EGTA se indujo una despolarización dependiente de Na^+ , por la disminución del calcio intracelu-



lar y el aumento de sodio intracelular.^{13,15} Como se anticipaba, después de cuatro minutos, el porcentaje de espermatozoides móviles cayó de 95 a 45%. La movilidad se recuperó a 90% al restituir el calcio^{13,15} y se preservaron las características de la movilidad. El Mg²⁺ indujo una hiperpolarización en espermatozoides tratados con EGTA, al detener el influxo de sodio y el aumento de la [Na⁺]_i, sin afectar las concentraciones de la [Ca²⁺]_i. En estas condiciones, la inhibición de la movilidad de los espermatozoides inducida por la eliminación de calcio se revirtió, incluso con concentraciones altas de la [Na⁺]_i, como ocurre al restituir el calcio. En conjunto, estos resultados sugieren que la disminución de la movilidad de los espermatozoides no depende del Ca²⁺ intracelular, sino de la despolarización dependiente de Na⁺, al aumento en la [Na⁺]_i o a la suma de ambas.

Experimentos realizados en espermatozoides de ratón, con técnica de fijación de membranas en la gota citoplásmica, mostraron que el flagelo de los espermatozoides contiene un canal selectivo a Ca²⁺, escasamente dependiente del voltaje y activado por alcalinización, llamado CatSper.¹⁶ Los espermatozoides que carecen de este canal son incapaces de hiperactivar su movilidad y, como resultado, los machos son infériles.^{10,17} En ausencia de Ca²⁺ externo, estos canales conducen sodio.¹⁸ Es importante notar que los espermatozoides nulos para CatSper incubados en un medio ausente de calcio mantienen su movilidad inicial; mientras que los espermatozoides tipo salvaje se inmovilizan.⁴

Este nuevo canal de calcio presente en el flagelo de espermatozoides de ratón y de humano es necesario para la movilidad hiperactivada^{4,9,10,17,19} y su ausencia conlleva a la infertilidad. En particular, los espermatozoides machos nulos a CatSper conservan su movilidad inicial en la ausencia de calcio externo, a diferencia de los ratones silvestres.¹⁷

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados de nuestro estudio, el calcio en el medio de cultivo es importante para activar y mantener la movilidad en los espermatozoides capacitados y su ausencia tiene mayor repercusión en la movilidad progresiva, principal parámetro a tomar en cuenta en la capacitación espermática, y esencial para que el espermatozoide logre llegar al ovocito y se realice la fecundación.

La existencia de calcio es fundamental para que se realice y se mantenga la hiperactividad espermática en espermatozoides capacitados.

REFERENCIAS

1. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 2006;12:23-37.
2. Darszon A, Treviño CL, Wood C, Galindo B, et al. Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;65:229-244.
3. Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR. Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem* 2003;278:15922-15926.
4. Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, et al. CatSper3 and CatSper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod* 2007;77:37-44.
5. Torres-Flores V, Picazo-Juárez G, Hernández-Rueda Y, Darszon A, González-Martínez MT. Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod* 2011;26:2626-2635.
6. Darszon A, Acevedo J, Galindo B, Hernández-González E, et al. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduc Review* 2006;131:977-988.
7. Carlson E, Westenbroek E, Quill T, Dejian R, et al. CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry y control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:14864-14868.
8. Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12527-12531.
9. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001;413:603-609.
10. Carlson AE, Burnett LA, del Camino D, Quill TA, et al. Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals

a required role in maintenance of sperm hyperactivation. *PLoS One* 2009;4:6844.

11. Feng B, Bhattacharya A, Yanagimachi R. Ca²⁺ is essential for the motility of plasma membrane-intact, but not of demembranated, hamster spermatozoa. *Andrologia* 1988;20:155-162.
12. Aaberg AR, Sauer MV, Sikka S, Rajfer J. Effects of extracellular ionized calcium, diltiazem and cAMP on motility of human spermatozoa. *J Urol* 1989;141:1221-1224.
13. González-Martínez MT. Induction of a sodium-dependent depolarization by external calcium removal in human sperm. *J Biol Chem* 2003;278:36304-36310.
14. Linares-Hernández L, Guzman-Grenfell AM, Hicks-Gómez JJ, González-Martínez MT. Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim Biophys Acta* 1988;1372:1-12.
15. Torres-Flores V, García-Sánchez NL, González-Martínez MT. Intracellular sodium increase induced by external calcium removal in human sperm. *J Androl* 2008;29:63-69.
16. Lishko PV, Kirichok Y. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol* 2010;588:4667-4672.
17. Ren D, Xia J. Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda)* 2010;25:165-175.
18. Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* 2006;439:737-740.
19. Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 2010;140:327-337.