



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización farmacológica de los canales de calcio involucrados en la reacción acrosomal inducida por ZP3 recombinante, en espermatozoides humanos.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A
OMAR JOSÉ RAMÍREZ



ASESORA: Dra. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ

MÉXICO D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
José
Ramírez
Omar
11 08 30 19
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
301031235
2. Datos del tutor
Dra.
Claudia Lydia
Treviño
Santa Cruz
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Jean Louis
Charli
Casalonga
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Alberto
Darszon
Israel
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Ignacio
López
González
6. Datos del sinodal 4
M. en I. B. B.
Diana Elodia
Aguilar
León
7. Datos del trabajo escrito
Caracterización farmacológica de los canales de calcio involucrados en la
reacción acrosomal inducida por ZP3 recombinante, en espermatozoides
humanos
64 p.
2008

*A mis padres y a mi hermana,
por impulsarme a seguir hacia adelante .*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Efraín y Romelia, porque sin su apoyo incondicional, la elaboración de esta investigación no habría sido posible.

Al Dr. Alberto Darszon, por darme la oportunidad de formar parte de su selecto grupo de trabajo.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Claudia Treviño, por haberme apoyado en todo momento desde mi época en el taller y por haberme asesorado durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Mayel Chirinos, por proveernos del material biológico indispensable para la elaboración de experimentos.

Al Dr. Gerardo De Blas y a la Biol. Yuridia Ocampo, por haberme orientado en múltiples ocasiones para mejorar mi desempeño en el quehacer científico.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Florencia, Penélope, Daniel, Julio, Dulce, Adán, Arlet, Esteban, Takuya, Carmen, Pablo, José Luis, Orta y Rocío, por hacer agradable mi estancia en el laboratorio.

A los miembros del jurado: Dr. Jean Louis Charli, Dr. Alberto Darszon, Dra. Claudia Treviño, Dr. Ignacio López y M. en I. B. B. Diana Aguilar, por sus valiosos comentarios para mejorar este escrito.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 El espermatozoide.....	2
2.2 El óvulo.....	3
2.3 La fecundación.....	5
2.4 Eventos previos a la fecundación en el espermatozoide de mamífero.....	6
2.4.1 La movilidad.....	6
2.4.2 La capacitación.....	6
2.4.3 La reacción acrosomal.....	7
2.5 La ZP en el óvulo de mamífero.....	10
2.5.1 Principales características de la ZP.....	10
2.5.2 Las glicoproteínas de la ZP y su papel durante la fecundación.....	12
2.6 Canales de Ca ²⁺ posiblemente involucrados en la reacción acrosomal del espermatozoide humano.....	13
2.6.1 Canales de Ca ²⁺ modulados por voltaje (Ca _v).....	13
2.6.2 Canales tipo Receptor de Potencial Transitorio (TRP).....	16
2.6.3 Canales Catiónicos del Espermatozoide (CatSper).....	18
3. ANTECEDENTES.....	19
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1 Swim up y capacitación de espermatozoides.....	23
6.2 Obtención de la curva de concentración de ZP3 (INNSZ, lote 2005).....	24
6.3 Inducción de la reacción acrosomal con glicoproteínas ZP.....	25
6.3.1 Inducción con ZP2, ZP3 y ZP4 (INNSZ).....	25
6.3.2 Inducción con ZP3 (Murcia).....	26
6.4 Inducción de la RA con ZP3 (INNSZ) en presencia de inhibidores de canales de Ca ²⁺	27
6.4.1 Incubación con SKF96365, Mibefradil y Nifedipina.....	27
6.4.2 Incubación con Ni ²⁺	28
6.4.3 Incubación con Verapamil y Diltiazem.....	28

6.4.4 Incubación con distintos inhibidores de canales de Ca^{2+}	29
6.5 Tinción de espermatozoides con FITC-PSA.....	29
7. RESULTADOS.....	31
7.1 Curvas de concentración de ZP3 (INNSZ).....	31
7.2 Efecto de las glicoproteínas de la ZP en la reacción acrosomal.....	33
7.2.1 Efecto de ZP2, ZP3 y ZP4 (INNSZ).....	33
7.2.2 Efecto de ZP3 (Murcia).....	34
7.3 Efecto de inhibidores de canales de Ca^{2+} en la reacción acrosomal inducida por ZP3 (INNSZ).....	35
7.3.1 Efecto de SKF, Mibefradil y Nifedipina.....	35
7.3.2 Inhibición por Ni^{2+}	36
7.3.3 Cálculo de IC_{50} de la curva dosis respuesta de Ni^{2+}	37
7.3.4 Efecto de Verapamil y Diltiazem.....	39
7.3.5 Verificación de los resultados en condiciones experimentales con menor número de variables.....	38
8. DISCUSIÓN.....	40
9. CONCLUSIONES.....	49
10. APÉNDICES.....	50
APÉNDICE I.....	50
APÉNDICE II.....	51
APÉNDICE III.....	53
11. ABREVIATURAS	54
12. BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Diagrama del espermatozoide humano.....	3
Figura 2. Diagrama del óvulo humano.....	4
Figura 3. Representación de un espermatozoide de mamífero durante la RA.....	8
Figura 4. Canales y moléculas involucradas en los cambios que ocasiona la RA en espermatozoides de mamífero.....	9
Figura 5. Estructura de la ZP del óvulo de ratón.....	11
Tabla I. Clasificación de los Canales de Ca^{2+} modulados por voltaje.....	13
Figura 6. Subunidades estructurales y regulación de los canales Ca_v1	14
Figura 7. Curvas de concentración de ZP3 (INNSZ) lotes 2005, 2006 y 2007.....	32
Figura 8. Inducción de la RA con las glicoproteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 (INNSZ).....	33
Figura 9. Inducción de la RA con la proteína recombinante ZP3 (Murcia).....	34
Figura 10. SKF96365, Mibefradil y Nifedipina inhiben la RA inducida por ZP3 (INNSZ).....	35
Figura 11. Inhibición por Ni^{2+} en la RA inducida por ZP3 (INNSZ).....	37
Figura 12. Cálculo de IC_{50} de la curva dosis respuesta de Ni^{2+}	37
Figura 13. Efecto de Verapamil y Diltiazem en la RA inducida por ZP3 (INNSZ).....	38
Figura 14. Efecto de SKF96365, Mibefradil, Nifedipina, Verapamil y Diltiazem en la RA inducida por ZP3 (INNSZ).....	39
Tabla II. Parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud.....	50
Figura 15. Evaluación de la RA con FITC-PSA.....	52
Tabla III. Inhibidores de canales de Ca^{2+} utilizados en este trabajo.....	53

1. RESUMEN

En mamíferos como el humano, la reacción acrosomal (RA) es un evento esencial para que el espermatozoide fecunde al óvulo. Hasta ahora la vía de señalización intracelular de este fenómeno, se ha estudiado con mayor detalle en el espermatozoide de ratón. Distintas evidencias sugieren que el principal inductor fisiológico de la RA es una glicoproteína denominada ZP3, la cual junto con ZP1 y ZP2, forma parte integral de la matriz extracelular (o zona pelúcida) del óvulo. Por otro lado, el calcio (Ca^{2+}) es esencial para modular varias de las funciones fisiológicas del espermatozoide. El modelo actual de la RA propone que la fase inicial involucra al menos dos entradas de Ca^{2+} , separadas espacial y temporalmente. Evidencias experimentales sugieren que la primera corriente de Ca^{2+} hacia el interior de la célula, sucede poco tiempo después de la unión de ZP3 a su(s) receptor(es) en la membrana plasmática del espermatozoide, es mediada por un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje y se caracteriza por ser rápida y transitoria. Por otro lado, la segunda entrada de Ca^{2+} es modulada por un canal operado por una poza interna (SOC) y se distingue por ser lenta y sostenida. A pesar de que en los últimos años se ha progresado en el entendimiento de la fisiología del espermatozoide humano, aún se desconocen varios de los mecanismos que operan durante la RA. Por tal motivo, la primera meta de esta investigación fue comprobar la actividad biológica de una serie de glicoproteínas de la zona pelúcida humana, las cuales se elaboraron utilizando distintos sistemas de expresión heteróloga. Para determinar el efecto de las distintas glicoproteínas recombinantes sobre la RA, incubamos a los espermatozoides humanos en presencia de cada una de las glicoproteínas. Posteriormente, teñimos a los espermatozoides con FITC-PSA para determinar el porcentaje de RA. Una vez cumplido este objetivo, decidimos continuar el proyecto utilizando a la ZP3 expresada en células Sf9 como inductor de la RA, debido al alto porcentaje de RA obtenido al incubar espermatozoides humanos en presencia de esta glicoproteína recombinante. La caracterización farmacológica de los canales de Ca^{2+} involucrados durante la RA inducida por ZP3 recombinante, se realizó mediante la adición de los inhibidores para distintas clases de canales en el medio de incubación. Los resultados obtenidos confirman la capacidad de ZP3 de inducir la RA y sugieren tanto la presencia de canales de las familias Ca_v1 , Ca_v3 y tipo SOC en el espermatozoide humano, como la participación de estos durante el proceso de RA.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El espermatozoide

El espermatozoide es el producto final del proceso de espermatogénesis en el macho, el cual ocurre dentro de los túbulos seminíferos de los testículos. Este proceso involucra una serie de divisiones mitóticas de las espermatogonias, dos divisiones meióticas de los espermatocitos, cambios morfológicos de las espermátidas durante la espermiogénesis, y la liberación de los espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos por espermiación. Al final, el proceso de espermatogénesis produce una célula que se encuentra diferenciada tanto estructural como funcionalmente, y al mismo tiempo es capaz de unirse al óvulo e iniciar el proceso que da lugar a un nuevo individuo.

El espermatozoide humano (~55 μm de largo) tiene dos regiones principales: la cabeza y el flagelo (**Figura 1**). La cabeza consta del acrosoma, el núcleo y el citoplasma. El acrosoma es un organelo que cubre la parte anterior del núcleo, se encuentra rodeado por una membrana y contiene enzimas hidrolíticas que le permiten al espermatozoide atravesar las capas externas y fusionarse con la membrana plasmática del óvulo. El núcleo del espermatozoide contiene únicamente un miembro de cada par de cromosomas, y la cromatina en su interior se encuentra altamente condensada. Por otro lado, el flagelo del espermatozoide contiene la maquinaria necesaria para que esta célula se mueva. Dicha maquinaria está compuesta principalmente por una estructura citoesquelética interna llamada axonema, la cual a su vez está integrada por microtúbulos. Mientras que en la pieza media del flagelo el axonema se encuentra rodeado por fibras densas externas y mitocondrias, en la pieza principal el axonema está rodeado únicamente por una vaina fibrosa.

Las características estructurales especializadas del espermatozoide son un reflejo de sus actividades funcionales únicas, siendo el papel principal de estos componentes el proveer al óvulo del material genético contenido en el núcleo del espermatozoide.

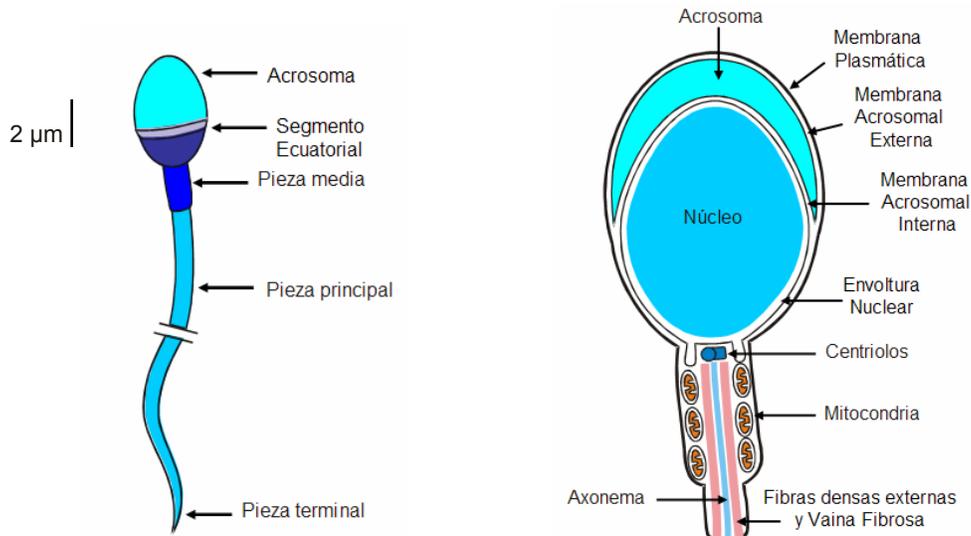


Figura 1. Diagrama del espermatozoide humano. La cabeza y el flagelo del espermatozoide están compuestos por varios segmentos (Izquierda). Estructura de la cabeza y la pieza media del espermatozoide (Derecha). Figura modificada de⁽¹⁾.

2.2 El óvulo

El óvulo es el producto final del proceso de ovogénesis en una hembra. En los mamíferos, la ovogénesis inicia en una etapa relativamente temprana del desarrollo fetal y finaliza meses o años después, en la hembra adulta sexualmente madura. El proceso de ovogénesis cuenta con varias características fundamentales, entre las cuales se incluyen (a) el origen extragonadal y extraembrionario de las células germinales, (b) la migración de las células germinales a las gónadas, (c) la diferenciación sexual de las células germinales en ovogonias, (d) la suspensión de la mitosis (ovogonia) y el inicio de la meiosis (ovocito), (e) la suspensión prolongada de la meiosis, (f) el crecimiento del ovocito, (g) el reinicio de la meiosis (maduración meiótica; primera reducción meiótica), la ovulación (óvulo) y finalmente (h) el término de la meiosis (segunda reducción meiótica) en respuesta a la fecundación.

A lo largo de la vida reproductiva de una hembra, los ovarios contienen tanto ovocitos en crecimiento, como ovocitos que aún no crecen. Solamente los ovocitos completamente maduros ingresan nuevamente a la etapa meiótica y son ovulados durante cada ciclo reproductivo. Desde la formación de las células germinales primordiales durante el desarrollo fetal, hasta la liberación de óvulos no fecundados en la hembra sexualmente madura, la ovogénesis representa uno de los procesos biológicos más especializados y mejor regulados en mamíferos.

En condiciones normales, el óvulo humano (~100 μm de diámetro) está constituido principalmente por un núcleo, mitocondrias, aparato de Golgi, ribosomas, gránulos corticales, y una zona pelúcida (ZP) (**Figura 2**). La ZP es la matriz extracelular que rodea a los ovocitos de todos los vertebrados y está compuesta por glicoproteínas. Además de mediar el contacto con el espermatozoide, la ZP está involucrada en la prevención de la polispermia y en la protección del embrión, previa a la implantación. Por otro lado, los gránulos corticales son organelos esféricos que se localizan en la región cortical de los óvulos no fertilizados y se fusionan con el oolema durante la fecundación, al liberar dentro del espacio perivitelino las enzimas que contienen. De esta manera, alteran las propiedades funcionales de la ZP.

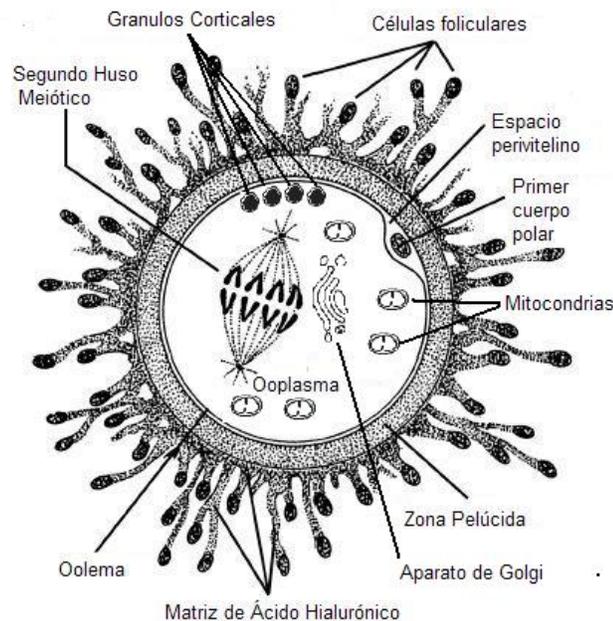


Figura 2. Diagrama del óvulo humano. Principales estructuras celulares que conforman el gameto femenino.

Hoy en día, existen evidencias experimentales que comprueban que el cigoto hereda del óvulo una gran reserva de macromoléculas y organelos que cubren los requerimientos nutricionales, sintéticos, energéticos y reguladores del embrión en sus primeras etapas de desarrollo.

2.3 La fecundación

La fecundación es el proceso de unión de un óvulo y un espermatozoide para generar descendencia, con una carga genética distinta a la de los progenitores. Este modo de reproducción surgió durante el curso de la evolución y se ha mantenido hasta la actualidad en la mayoría de los metazoarios, incluyendo a los mamíferos. El óvulo y el espermatozoide son gametos cuya maduración y papel que cumplen antes y después de la fecundación, son muy distintos. El espermatozoide se encarga de encontrar, reconocer y fusionarse con el óvulo para que la fecundación suceda y sorprendentemente, un solo espermatozoide es capaz de lograr esta tarea a pesar de ser una célula que no puede transcribir genes ni sintetizar proteínas. La fecundación requiere la participación de dos gametos completamente maduros y competentes, además de una compleja interacción molecular que hasta el día de hoy, aún no se comprende por completo⁽⁸⁾.

La importancia de los canales iónicos en la fisiología del espermatozoide, y particularmente de aquellos permeables a Ca^{2+} , se ha vuelto cada vez más evidente. Estos canales iónicos son participantes clave en la señalización entre gametos, ya que se ha observado que la movilidad del espermatozoide y la reacción acrosomal (un evento excitotónico del espermatozoide necesario para la fecundación en muchas especies) son inhibidas por bloqueadores de canales iónicos⁽²⁻⁴⁾.

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten de manera eficiente el transporte de iones a través de una bicapa lipídica no conductora. Un solo canal iónico (una sola proteína) permite el flujo de millones de iones por segundo a través de una membrana celular. Solo se necesitan unos cuantos canales para iniciar en milisegundos, cambios eléctricos sustanciales y de concentración en una célula. No es sorprendente que estos transductores hayan sido seleccionados evolutivamente para desempeñar intercambios rápidos de información entre el mundo externo y las células o dentro de ellas. Los gradientes iónicos a través de la célula determinan el potencial de membrana (E_m) por medio de canales selectivos a determinados iones. El E_m controla la proporción y la dirección del flujo de los iones a través de los canales e intercambiadores y sus fluctuaciones pueden modular el pH intracelular (pH_i), la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y otros segundos mensajeros que influyen la maduración de los espermatozoides, la movilidad y la reacción acrosomal⁽⁸⁾.

2.4 Eventos previos a la fecundación en el espermatozoide de mamífero.

2.4.1 La movilidad

La movilidad es una característica indispensable para que el espermatozoide se desplace a través del tracto genital femenino y fecunde al óvulo. Los espermatozoides de mamífero manifiestan dos formas generales de movilidad: activada e hiperactivada. La movilidad activada observada en espermatozoides recién eyaculados, se caracteriza por un batido flagelar de corta amplitud que propulsa al espermatozoide en las etapas iniciales de su viaje a través del tracto reproductivo femenino. Además, es estimulada por la fosforilación de Serinas/Treoninas (Ser/Thr) y Tirosinas (Tyr) en las proteínas flagelares⁽⁵⁾. La cascada de fosforilación se encuentra regulada en parte por la acción del AMP cíclico (cAMP) sobre proteínas cinasa A (PKA). El cAMP se genera a su vez por la acción de la adenilato ciclasa soluble (sAC) y esta enzima se regula por iones bicarbonato (HCO_3^-) y Ca^{2+} ⁽⁶⁾. A pesar de que aún se desconoce la fuente de Ca^{2+} que podría regular la actividad de la sAC, los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática son fuertes candidatos. Por otro lado, la movilidad hiperactivada se observa en espermatozoides aislados de las regiones superiores del tracto reproductivo femenino. Consta de batidos flagelares de larga amplitud que ocasionan que el espermatozoide nade en “forma de ocho” en medios de baja viscosidad. En medios de alta viscosidad, la movilidad hiperactivada es más progresiva⁽⁷⁾. Se piensa que la hiperactivación es importante para que el espermatozoide se traslade a través del ambiente de alta viscosidad del oviducto y posiblemente para la penetración de las capas externas del óvulo.

El Ca^{2+} también se requiere para el inicio y mantenimiento de la movilidad hiperactivada, al regular de manera directa los componentes de la maquinaria del axonema⁽⁸⁾.

2.4.2 La capacitación

Los espermatozoides maduros del epidídimo adquieren la competencia para fecundar, durante su tránsito a través del tracto reproductivo femenino. Este proceso complejo denominado capacitación, involucra varios cambios fisiológicos en el espermatozoide. Entre ellos se encuentra la reorganización de la membrana plasmática como consecuencia de la remoción de colesterol, la fosforilación de proteínas en Tyr, la

hiperpolarización del E_m (en algunas especies) e incrementos en el pH_i y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ^(1,9). La capacitación también se asocia con la aparición de la movilidad hiperactivada, la cual es considerada aún por algunos autores como parte de la capacitación^(7,9). Todos estos cambios preparan al espermatozoide para responder a la ZP, la matriz extracelular del óvulo que induce la RA. A pesar de que los mecanismos moleculares y los eventos de transducción de señales se encuentran parcialmente caracterizados, se ha demostrado que la capacitación y la fosforilación en Tyr se encuentran reguladas por una vía dependiente de cAMP que involucra a las PKA⁽⁹⁾. Recientemente se propuso que los cambios en la fluidez y en la organización de la membrana que se dan durante la capacitación, son en parte una consecuencia de la activación de translocasas que mueven fosfolípidos en ambas direcciones a través de la membrana plasmática⁽¹⁰⁾.

Numerosos estudios han demostrado que la capacitación es dependiente de distintos iones presentes en el medio de capacitación, como Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- y Na^+ ^(1,9). La capacitación *in vitro* requiere tres componentes esenciales: Ca^{2+} , HCO_3^- y albúmina sérica bovina (BSA). Se han reportado varios tipos de canales iónicos y transportadores en el espermatozoide de mamífero⁽¹⁾, pero aún no se ha determinado por completo la manera en que participan en la regulación del E_m , pH_i y $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la capacitación,.

2.4.3 La reacción acrosomal

La reacción acrosomal (RA) es un evento esencial para que la fecundación se lleve a cabo e involucra la exocitosis de un organelo denominado acrosoma⁽¹¹⁾. El acrosoma es una vesícula secretora que se origina en el aparato de Golgi y se encuentra localizado en la región apical del núcleo del espermatozoide. A la membrana del acrosoma que se encuentra por debajo de la membrana plasmática de la célula se le conoce como membrana acrosomal externa y la que se encuentra por encima del núcleo es la membrana acrosomal interna. La **Figura 3** muestra que la RA se origina por múltiples fusiones entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide, lo cual genera vesículas híbridas a partir de estas membranas y permite la liberación del contenido acrosomal. De esta manera queda expuesta la membrana acrosomal interna.

Solo los espermatozoides que han llevado a cabo la RA, pueden penetrar la ZP y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito⁽¹¹⁾.

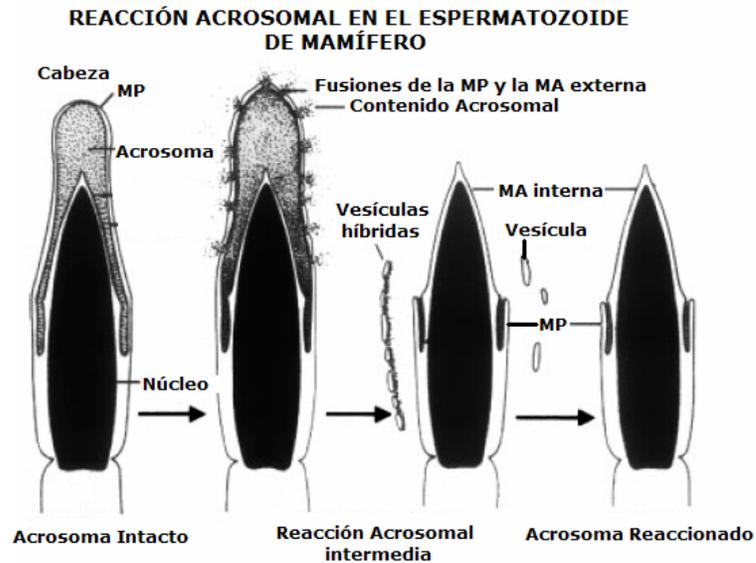


Figura 3. Representación de un espermatozoide de mamífero durante la RA. MP, Membrana Plasmática; MA, Membrana Acrosomal. Figura modificada de⁽¹¹⁾.

Aún no se conoce por completo la vía de señalización intracelular que culmina en la RA, pero varias investigaciones han ayudado a aclarar este fenómeno crucial (**Figura 4**). La ZP y algunos otros agentes como la progesterona, inducen la RA favoreciendo el flujo de iones, incrementando el metabolismo de fosfolípidos, los niveles de cAMP y la fosforilación de proteínas. Durante la RA se presenta un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y el pH_i , siendo sensible este último a la toxina pertusis (PTx) que inactiva a las proteínas G_i ⁽¹²⁾. El modelo actual de señalización de la RA propone que la unión de la glicoproteína 3 de la zona pelúcida (ZP3) genera una respuesta de Ca^{2+} que involucra al menos tres tipos de canales de Ca^{2+} distintos, dos de los cuales se localizan en la membrana plasmática del espermatozoide y uno de ellos en la membrana acrosomal externa.

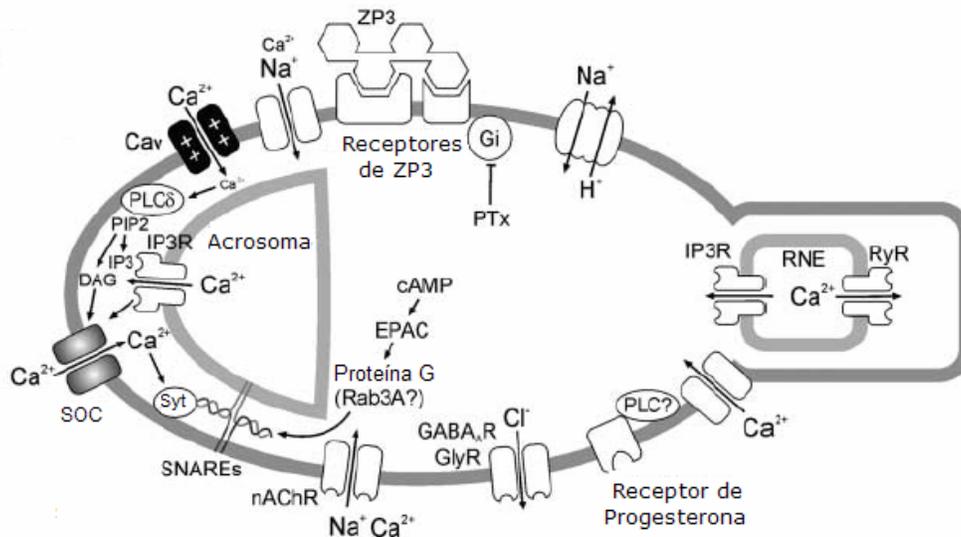


Figura 4. Canales y moléculas involucradas en los cambios que ocasiona la RA en espermatozoides de mamífero. La unión de ZP3 a su(s) receptor(es) abre a los canales de Ca^{2+} modulados por voltaje (Ca_v), lo que ocasiona la entrada inicial de Ca^{2+} ; la activación dependiente de Ca^{2+} de la fosfolipasa $\text{C}\delta$ ($\text{PLC}\delta$) genera diacilglicerol (DAG) e IP_3 a partir de la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5-difosfato (PIP_2). IP_3 se une a su receptor en la membrana acrosomal externa e induce el vaciamiento de la poza interna de Ca^{2+} , lo cual a su vez (posiblemente en conjunto con DAG) activa los canales SOC's de la membrana plasmática. El Ca^{2+} , el cAMP y las proteínas G actúan en conjunto para activar la maquinaria requerida para la fusión de las membranas. Figura modificada de⁽⁸⁾.

En el espermatozoide de ratón, la unión de la ZP3 a su(s) receptor(es) en la membrana plasmática inicialmente eleva la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles micromolares dentro de los primeros 50 ms y vuelve a su estado basal aproximadamente a los 200 ms. La farmacología y cinética de esta respuesta son consistentes con la apertura de canales de Ca^{2+} modulados por voltaje de la subfamilia 3 (Ca_v3)⁽¹³⁾. Además, la RA se puede inhibir por varios antagonistas de canales Ca_v3 como dihidropiridinas (DHP's), pimozida y níquel (Ni^{2+}). Esta familia de canales Ca_v cuenta con tres miembros, y todos ellos se han inmunolocalizado en espermatozoides de mamífero. Los canales $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.2$ se localizan en la región del acrosoma, sin embargo los ratones knockout para uno u otro gen de estos canales Ca_v son fértiles^(14,15), por lo que la generación de ratones knockout para ambos canales Ca_v3 , ayudará a esclarecer el papel que cumplen durante la RA. La participación de los canales Ca_v3 en la RA de espermatozoides humanos es mucho menos clara. Además, se han localizado otros miembros de la superfamilia de canales Ca_v y de los canales catiónicos del espermatozoide (CatSpers)⁽¹⁶⁾ en espermatozoides de mamífero y se sabe que participan en el proceso de hiperactivación⁽¹⁷⁾. Por otro lado, la unión de la ZP3 provoca un incremento del inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) en el espermatozoide, el cual mediante la unión a sus receptores situados en la membrana

acrosomal externa, libera el Ca^{2+} del acrosoma^(18,19). La evidencia que apoya este modelo incluye la identificación de la fosfolipasa C δ 4 (PLC δ 4) sensible a Ca^{2+} . Los ratones que carecen de la PLC δ 4 son infértiles. Por otro lado, se han inmunolocalizado receptores de IP_3 en el acrosoma. La generación de IP_3 y el vaciamiento de Ca^{2+} del acrosoma, provoca un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a la apertura en la membrana plasmática de canales operados por pozas (SOC's). La activación de estos canales provoca un segundo aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el cual es lento y sostenido, dura varios minutos y es necesario para completar la RA. Es posible que estos SOC's sean miembros de la superfamilia de receptores de potencial transitorio (TRP). De manera consistente con esto, se ha implicado al canal TRPC2 en la RA inducida por ZP3 en el espermatozoide de ratón⁽²⁰⁾ y la región acrosomal de estos espermatozoides contiene al menos TRPC1, 2 y 5. Por lo tanto no se puede descartar la posible participación de más de un TRP en la fecundación, debido a que los ratones que carecen de TRPC2 son fértiles⁽²¹⁾ y además los canales TRPC pueden formar heteromultímeros⁽²²⁾.

2.5 La ZP en el óvulo de mamífero

2.5.1 Principales características de la ZP

La ZP es una envoltura extracelular porosa, transparente y relativamente gruesa que rodea a la membrana plasmática de los óvulos de todos los mamíferos y está constituida por glicoproteínas. La ZP se forma en las etapas tempranas del desarrollo folicular ovárico, contiene receptores especie específicos para el espermatozoide y es capaz de inducir la RA. Como se mencionó anteriormente, la ZP también está involucrada en el establecimiento del bloqueo a la polispermia en el óvulo (posterior a la fecundación) y en la protección del embrión mientras este es transportado a lo largo del tracto reproductivo femenino.

Mucho de lo que se sabe sobre la ZP y el papel que cumple en la fecundación de mamíferos, se ha obtenido de estudios en el óvulo de ratón. La ZP de óvulos de mamífero, una estructura que puede representar más del 10% de la proteína total del óvulo, está compuesta por solo unas cuantas glicoproteínas (**Figura 5**). Por ejemplo, la ZP de óvulos de ratón (~3.5 ng de proteína; ~6.5 μm de grosor) consta de solo tres glicoproteínas, llamadas ZP1, ZP2 y ZP3 (M_r ~200, 120 y 83 kDa, respectivamente) las cuales son

sintetizadas, secretadas y ensambladas en la ZP solamente por los ovocitos en crecimiento, a lo largo de un periodo que abarca de dos a tres semanas⁽²³⁾.

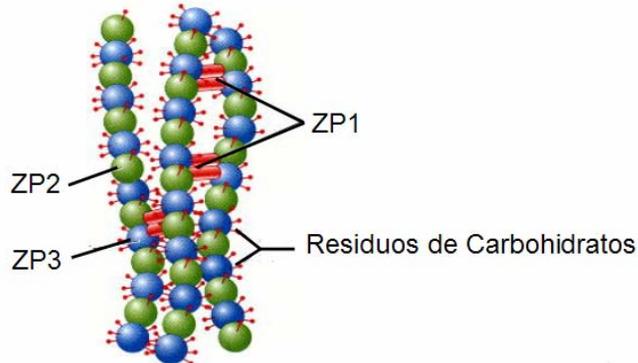


Figura 5. Estructura de la ZP del óvulo de ratón. Figura modificada de⁽²⁴⁾.

De manera análoga al ratón, se consideraba que la ZP de los óvulos humanos estaba constituida únicamente por tres glicoproteínas: ZP1-3, llamadas inicialmente ZPB, ZPA y ZPC, respectivamente. El aumento en la disponibilidad de secuencias genómicas como resultado de los proyectos de secuenciación de genomas, ha generado un conocimiento más profundo sobre la genética de la ZP. El primer paso se dio al descubrir que el gen humano llamado ZPB no era el ortólogo real del gen *Zp1* de ratón⁽²⁵⁾. Se demostró que el genoma humano contiene un gen *Zp* adicional, el cual es el homólogo verdadero del gen *Zp1* de ratón, de manera que la ZP de los óvulos humanos cuenta con cuatro glicoproteínas: ZP1-4. El apoyo a la existencia de genes *Zp1* y *Zp4* vino de estudios en pollo, en donde ambos genes fueron identificados subsecuentemente⁽²⁶⁾. Recientemente se demostró que la rata y el chimpancé también poseen los genes *Zp1* y *Zp4*. Estas tres especies y varias más, tienen los cuatro genes ZP. Además, hace algunos años se demostró la presencia de transcritos de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) para los cuatro genes ZP en ovocitos humanos, usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). También se ha analizado por espectrometría de masas la composición de la ZP humana, y se identificó la existencia de las cuatro glicoproteínas ZP⁽²⁷⁾. La existencia de los genes *Zp1* y *Zp4* en el pollo, la rata, el chimpancé y el humano implica una duplicación del gen que permitió que la divergencia de los dos genes se diera temprano en el linaje de los vertebrados. Tal presencia en los vertebrados superiores indica que ambos genes se han mantenido, y que por lo tanto, tienen una importancia funcional. Esto es particularmente significativo, dado que el número de proteínas involucradas en la reproducción, incluyendo a ZP2 y ZP3, se encuentra bajo una fuerte presión selectiva⁽²⁸⁾. También vale la pena mencionar que cada glicoproteína ZP consta

de un polipéptido único que se encuentra glicosilado de manera heterogénea con oligosacáridos ligados a Serina/Treonina (glicosilación tipo O) o a Asparagina (glicosilación tipo N).

2.5.2 Las glicoproteínas de la ZP y su papel durante la fecundación

Aún existen algunos aspectos inconclusos en cuanto al papel que las glicoproteínas de la ZP humana cumplen. Las funciones propuestas para ZP1, ZP2 y ZP3 provienen de estudios en la ZP del óvulo de ratón. La ZP1 de ratón contribuye a mantener la integridad estructural de la ZP, actuando como la unión molecular entre los filamentos que conforman a la matriz extracelular⁽²⁹⁾. La ZP3 es el receptor primario al espermatozoide capacitado e intacto de ratón, y es responsable de inducir la RA⁽³³⁾, proceso que se requiere para que el espermatozoide penetre la ZP y se fusione con la membrana plasmática del óvulo^(33,34). Por otro lado, se han encontrado evidencias que confirman que ZP2 es el receptor responsable de la unión al espermatozoide con el acrosoma reaccionado⁽³⁰⁻³²⁾. Las glicoproteínas mZP1 y mZP2 no inducen la RA de espermatozoides *in vitro*. La inducción de la RA por ZP3 de óvulos no fecundados presenta cierta especie especificidad y no se da en presencia de ZP3 de óvulos fecundados⁽³⁴⁾. Por lo tanto, de las tres glicoproteínas que conforman a la ZP del óvulo de ratón, solo la mZP3 de óvulos no fecundados compite por los sitios de unión en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide e induce la RA *in vitro*. Además, consistente con el comportamiento de los gametos de ratón *in vivo*, la mZP3 de óvulos fecundados o embriones inmaduros es inactiva como receptor de espermatozoides y como inductor de la RA.

Experimentos recientes han demostrado que la ZP de ratón humanizada (la cual expresa ZP2 y ZP3 humanas) es capaz de unirse a los espermatozoides de ratón, pero incapaz de unirse a los espermatozoides de humano⁽³⁵⁾. Es posible que esta incapacidad de unirse se deba a un requerimiento de glicosilación especie específica. De manera alternativa, este resultado podría reflejar la necesidad de una ZP formada por cuatro glicoproteínas (en lugar de tres) para que el espermatozoide humano se pueda unir. También existe la posibilidad de que ZP4 sea requerida para una interacción directa, siendo parte del receptor para el espermatozoide en la ZP. Hay evidencias obtenidas de estudios en varios mamíferos (e. g., macaco, vaca y conejo) que apoyan la hipótesis de que ZP4 tiene actividad de unión al espermatozoide⁽³⁶⁻³⁸⁾. En el cerdo, por ejemplo, el receptor primario para el espermatozoide es un heterocomplejo de ZP3 y ZP4⁽³⁹⁾. Todos

estos datos sugieren la necesidad de establecer cuál(es) de las glicoproteínas ZP constituye(n) el receptor para los espermatozoides de humano.

2.6 Canales de Ca^{2+} posiblemente involucrados en la RA del espermatozoide humano

2.6.1 Canales de Ca^{2+} modulados por voltaje (Ca_v)

Los canales Ca_v son proteínas transmembranales que regulan la entrada de Ca^{2+} a la célula, en respuesta a una despolarización de la membrana plasmática. Estas proteínas conforman una superfamilia de canales iónicos transmembranales a la que también pertenecen los canales de K^+ y Na^+ modulados por voltaje⁽⁴⁰⁾. Los canales Ca_v se clasificaron inicialmente de acuerdo a sus propiedades biofísicas y farmacológicas, en canales de alto umbral de activación (HVA) y canales de bajo umbral de activación (LVA) (**Tabla I**). Los canales HVA se abren con potenciales despolarizantes relativamente altos (≥ -30 mV) y se dividen a su vez en: L (**L**ong-lasting), N (**N**euronal), P (inicialmente registrados en neuronas de **P**urkinje) /Q y R (**R**esistentes a la mayoría de bloqueadores orgánicos de canales Ca_v). A su vez, los canales LVA se activan en respuesta a potenciales despolarizantes relativamente bajos (≥ -70 mV), se inactivan rápidamente y se desactivan lentamente. Se conocen como canales de bajo umbral de activación por su activación a voltajes negativos o como canales tipo **T** por presentar una corriente transitoria.

Tipo de canal de Ca^{2+}	Nombre del canal	Tipo de corriente	Nombre del gen	Antagonistas
De alto umbral de activación (HVA)	$\text{Ca}_v1.1$	L	α_{1S}	Dihidropiridinas,
	$\text{Ca}_v1.2$	L	α_{1C}	Benzodiazepinas y
	$\text{Ca}_v1.3$	L	α_{1D}	Fenilalquilaminas
	$\text{Ca}_v1.4$	L	α_{1F}	
	$\text{Ca}_v2.1$	P/Q	α_{1A}	ω -Agatoxina IVA
	$\text{Ca}_v2.2$	N	α_{1B}	ω -Conotoxina GVIA
	$\text{Ca}_v2.3$	R	α_{1E}	SNX-482
De bajo umbral de activación (LVA)	$\text{Ca}_v3.1$	T	α_{1G}	Ni^{2+} , Mibefradil
	$\text{Ca}_v3.2$	T	α_{1H}	Ni^{2+} , Mibefradil
	$\text{Ca}_v3.3$	T	α_{1I}	Ni^{2+} , Mibefradil

Tabla I. Clasificación de los Canales de Ca^{2+} modulados por voltaje.

La subunidad que forma el poro conductor de iones en los canales HVA y LVA, se conoce como α_1 (**Figura 6**). Esta es la subunidad más grande (190 a 250 kDa) y contiene además el sensor de voltaje, las compuertas de apertura, cierre e inactivación del canal, y la mayoría de los sitios conocidos de regulación del canal por segundos mensajeros, drogas o toxinas. Está organizada en cuatro dominios homólogos repetidos (I-IV), con seis segmentos transmembranales (S1-S6) en cada uno. El segmento S4 sirve como sensor de voltaje y el poro entre los segmentos transmembranales S5 y S6 de cada dominio, determina la conductancia iónica y la selectividad al ion Ca^{2+} . A pesar de que las subunidades auxiliares β , γ y $\alpha_2\delta$ modulan en los canales HVA las propiedades de todo el complejo del canal, la diversidad farmacológica y electrofisiológica de los canales de Ca^{2+} se encuentra dada principalmente por la existencia de múltiples subunidades α_1 ⁽⁴¹⁾.

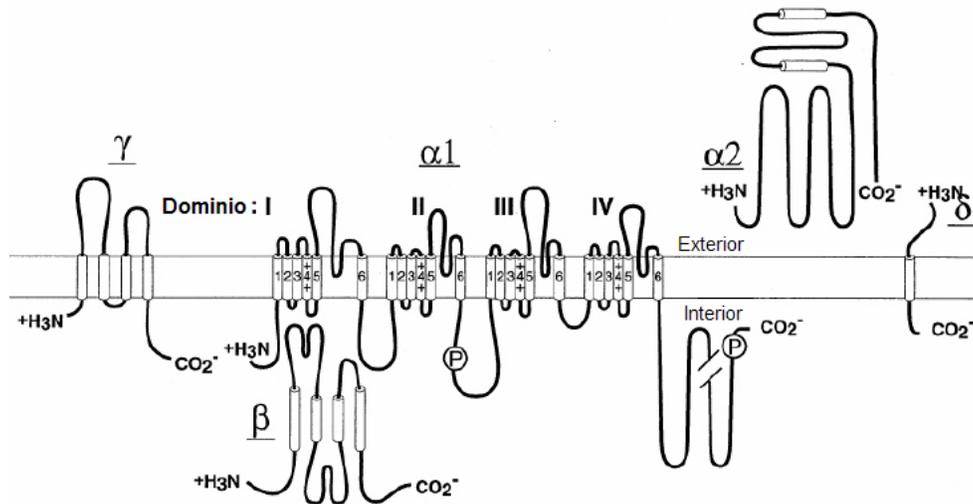


Figura 6. Subunidades estructurales y regulación de los canales Ca_v1 . Ilustración de las subunidades que conforman a los canales de Ca^{2+} purificados de músculo esquelético. Figura modificada de⁽⁴⁰⁾.

Los canales Ca_v se clasificaron posteriormente de acuerdo a los distintos genes que codifican a las subunidades α_1 : α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} , α_{1A} , α_{1B} , α_{1E} , α_{1G} , α_{1H} y α_{1I} ⁽⁴⁰⁾. Sin embargo en el año 2000 se adoptó una nomenclatura sistemática y los canales de Ca^{2+} se nombraron combinando el símbolo químico del Ca^{2+} con el regulador fisiológico más importante del canal (voltaje) indicado como subíndice (Ca_v). El número corresponde a la familia de la subunidad α_1 de los canales Ca_v (1 a 3) y el orden en el que se descubrieron las subunidades α_1 de cada una de las familias. De acuerdo con esta nomenclatura, la familia Ca_v1 ($\text{Ca}_v1.1$ - $\text{Ca}_v1.4$) comprende a las subunidades α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} y α_{1F} , las cuales son responsables de las corrientes de Ca^{2+} tipo L. La familia Ca_v2 ($\text{Ca}_v2.1$ - $\text{Ca}_v2.2$) incluye a las subunidades α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} , las cuales son responsables de las corrientes de

Ca²⁺ tipo P/Q, N y R, respectivamente. Por último, la familia Ca_v3 (Ca_v3.1 - Ca_v3.3) incluye a las subunidades α_{1G}, α_{1H} y α_{1I}, responsables de las corrientes de Ca²⁺ tipo T⁽⁴⁰⁾.

La farmacología de las tres familias de canales de Ca²⁺ es muy distinta. Los canales Ca_v1 son blancos moleculares de bloqueadores orgánicos usados comúnmente en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Se piensa que estas drogas actúan en tres sitios receptores separados, pero unidos alostéricamente. Las fenilalquilaminas (e. g., Verapamil) son bloqueadores del poro intracelular, y se piensa que entran al poro desde el lado citoplásmico del canal. Su sitio receptor se encuentra formado por residuos de aminoácidos localizados en los segmentos S6 de los residuos III y IV. Las dihidropiridinas (e. g., Nifedipina y Nimodipina) actúan alostéricamente al cambiar el canal del estado abierto al cerrado, en lugar de ocluir el poro. Su sitio receptor involucra tanto residuos de aminoácidos en los segmentos S6 de los dominios III y IV, como al segmento S5 del dominio III. El sitio receptor de dihidropiridinas se encuentra próximo al sitio receptor de fenilalquilaminas, y ambos comparten algunos residuos de aminoácidos. Por otro lado, las benzodiacepinas (e. g., Diltiazem) se unen a un sitio receptor del poro, cuyos residuos de aminoácidos se sobrelapan en gran medida con los del sitio de unión a fenilalquilaminas.

Los canales de la subfamilia Ca_v2 son relativamente insensibles a los compuestos que bloquean a los canales Ca_v1, pero se bloquean específicamente por toxinas presentes en el veneno de ciertas arañas y caracoles. Los canales Ca_v2.1 se bloquean específicamente por ω-Agatoxina IVA, un péptido presente en el veneno de la araña australiana *Atrax robustus*. Los canales Ca_v2.2 se bloquean por ω-Conotoxina GVIA, proveniente del veneno del caracol marino *Conos geographus*.

Los canales de la familia Ca_v3 se inhiben por drogas como Mibefradil (5 μM)⁽⁴²⁾, Amilorida, Pimozida y Ni²⁺ a concentraciones micromolares. En un estudio se examinó el bloqueo por Ni²⁺ de canales tipo T expresados en ovocitos de *Xenopus* y células HEK-293, y únicamente las corrientes α_{1H} fueron sensibles a concentraciones micromolares (13 μM). Sin embargo, se requirieron concentraciones más altas para bloquear a la mitad de las corrientes α_{1I} (216 μM) y las corrientes α_{1G} (250 μM)⁽⁴³⁾. Por otro lado, a concentraciones elevadas (30 μM)⁽⁴⁴⁾ el Mibefradil también puede actuar como un antagonista de las corrientes tipo HVA. A pesar de que inicialmente se consideró a la Nifedipina y dihidropiridinas relacionadas, como antagonistas específicos de los canales HVA tipo L,

ahora se sabe que también son capaces de bloquear a las corrientes tipo T a concentraciones micromolares en otras células⁽⁴⁵⁾, en células espermatogénicas^(46,47) y en el espermatozoide de ratón⁽⁴⁸⁾.

2.6.2 Canales tipo Receptor de Potencial Transitorio (TRP)

Los canales TRP comprenden a una superfamilia de canales catiónicos permeables a Ca^{2+} . Estos canales se identificaron inicialmente en *Drosophila* como una mutación (*trp*) que causa ceguera a la luz brillante, debido a un defecto de los canales TRP que median la transducción de señales de la visión⁽⁴⁹⁾. La superfamilia de los 33 genes TRP se divide en siete subfamilias, con base en la similitud de sus secuencias⁽⁵⁰⁾:

- 1) **TRPC** es la subfamilia relacionada con los TRP de *Drosophila* y está integrada por siete miembros.
- 2) **TRPV** fue llamada así por su primer miembro descubierto; el receptor a compuestos Vaniloides. Está constituida por seis miembros.
- 3) **TRPM** es una subfamilia llamada así por el gen de melastatina. Está constituida por ocho miembros.
- 4) **TRPP**, que incluye a las proteína ADPKD (proteína implicada en la enfermedad policística de riñón), policistina-2 (PC-2) y dos proteínas tipo PC.
- 5) **TRPML** está formada por tres proteínas relacionadas con la proteína tipo IV de las mucolipinas. Los productos de estos genes están mutados en pacientes con mucopolipidosis e induce sordera y defectos de pigmentación.
- 6) **TRPA** está compuesta por un solo miembro que se identificó en mamíferos.
- 7) **TRPN** es una subfamilia que no se ha identificado en mamíferos y está formada por el canal de transducción mecanosensorial (NOMPC) en *Drosophila*, y canales relacionados en *C. elegans* y *Danio rerio*.

La estructura de los canales TRP consta de seis segmentos transmembranales (S1-S6) con el poro ubicado entre los segmentos S5 y S6. Las regiones carboxilo y amino terminal se localizan del lado citoplásmico. La estructura es similar a la de los canales regulados por voltaje y a la de los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG), excepto que el segmento S4 de los canales TRP no posee una secuencia de residuos cargados positivamente, lo que los hace poco sensibles al voltaje. Para formar un canal

funcional los canales TRP se ensamblan como homo o heterotetrámeros y también se ha reportado la asociación entre proteínas de los diferentes subgrupos (PKD2 y TRPC1)⁽⁵¹⁾.

Los TRP's de mamíferos pueden agruparse según la homología estructural de sus dominios transmembranales. Poseen un motivo de 25 aminoácidos (dominio TRP) que contiene la caja TRP (EWKFAR) en la región carboxilo terminal del segmento S6. El dominio y la caja TRP están presentes en la mayoría de los genes *trpc*, pero no en todos los genes TRP.

En algunos tipos celulares de mamíferos, la entrada de Ca^{2+} conocida como capacitativa contribuye a mantener los niveles de Ca^{2+} en las pozas internas. La entrada de Ca^{2+} a través de esta vía también genera señales de Ca^{2+} esenciales para distintas funciones celulares⁽⁵²⁾. Evidencias recientes sugieren que los canales de Ca^{2+} capacitativos en mamíferos, están codificados por algunos miembros de la superfamilia de canales TRPC, usualmente conocidos como canales operados por pozas internas (SOC's). La entrada de Ca^{2+} a través de los SOC's regula varias funciones fisiológicas.

Varios reportes indican que la Maitotoxina del dinoflagelado marino *Gambierdiscus toxicus*, probablemente activa de manera directa a un canal SOC de la familia TRP^(53,54-56). Por otro lado, existen agentes (e. g., Tapsigargina) que activan a los canales tipo SOC's de manera indirecta, al propiciar el vaciamiento de pozas internas de Ca^{2+} . La Tapsigargina es un inhibidor de la ATPasa de Ca^{2+} que bombea a este ion del citosol al retículo endoplásmico/sarcoplásmico (SERCA). Debido a este modo de acción, las pozas de Ca^{2+} en presencia de Tapsigargina se vacían por una fuga de Ca^{2+} al citosol y esta liberación de Ca^{2+} de las pozas internas promueve la activación de los canales tipo SOC's.

Uno de los inhibidores para canales tipo SOC's es el SKF96365 ($20\mu\text{M}$)⁽⁵³⁾, el cual bloquea de manera específica la fase de entrada de la respuesta (ingreso de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática) en lugar de la fase de liberación (salida de Ca^{2+} de las pozas internas)⁽⁵⁷⁾. El mecanismo molecular por el cual los SOC's de la membrana plasmática detectan el llenado de Ca^{2+} del retículo endoplásmico se descubrió con la reciente identificación de STIM1 como el sensor del contenido de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. El agotamiento del Ca^{2+} del retículo endoplásmico provoca un rearrreglo de

STIM1 debajo de la membrana plasmática y la subsecuente activación de los canales que modulan la entrada de Ca^{2+} ⁽⁵⁸⁾.

Es importante mencionar que no todos los canales TRPC son activados por el vaciamiento de pozas internas de Ca^{2+} . Los canales TRPC que no son SOC's se pueden activar de distintas maneras (e. g., DAG).

2.6.3 Canales Catiónicos del Espermatozoide (CatSper)

Los canales CatSper (CatSper1-4) reciben su nombre por un canal catiónico del espermatozoide⁽⁵⁹⁾. Los CatSper son canales putativos modulados por voltaje y permeables a Ca^{2+} . Además, al parecer se localizan únicamente en los espermatozoides. Los canales CatSper1 y 2 están involucrados en la hiperactivación de la movilidad en el espermatozoide, lo cual es un requisito indispensable para la fecundación.

Todos los CatSper se encuentran estrechamente relacionados con las familias de canales de Na^+ y Ca^{2+} modulados por voltaje (Na_v y Ca_v , respectivamente) y cuentan con un segmento transmembranal S4 con aminoácidos de carga positiva situados cada tres aminoácidos.

CatSper1 se localiza en la membrana plasmática de la cola del espermatozoide⁽⁶⁰⁾. La eliminación del gen CatSper1 originó un fenotipo de infertilidad. Los espermatozoides mutantes mostraron una velocidad basal reducida y carecían de un batido flagelar vigoroso, por lo que no fueron capaces de fecundar óvulos con una zona pelúcida intacta, sin embargo, sí pudieron fecundar óvulos cuyas capas externas se habían removido enzimáticamente⁽⁶⁰⁾. Estudios posteriores demostraron que los espermatozoides sin el gen CatSper1, no se hiperactivaban⁽⁶¹⁾. Los ratones que carecen del gen CatSper2 también resultaron estériles, debido a la ausencia de la movilidad hiperactivada necesaria para la penetración de la matriz extracelular del óvulo⁽⁶²⁾. Hasta ahora los CatSper no han sido funcionales en sistemas de expresión heteróloga o espermatoцитos, aparentemente debido a que no son conducidos a la membrana plasmática de las células que no son espermatozoides⁽⁶⁰⁾. Además, no existen antagonistas específicos para este tipo de canales, lo cual también ha dificultado su estudio. En cuanto a los canales CatSper3 y 4, aún se sabe muy poco.

3. ANTECEDENTES

La exocitosis acrosomal inducida en el espermatozoide por la ZP es esencial para una fecundación exitosa, y a pesar de que se ha considerado clásicamente a la ZP como el principal inductor *in vivo* de la RA, la exocitosis acrosomal también se puede estimular por otros factores como la progesterona⁽⁶³⁻⁶⁵⁾, GABA⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾, glicina^(69,70), EGF⁽⁷¹⁾, ATP^(72,73), PAF⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾ y acetilcolina⁽⁷⁷⁾. Sin embargo, la importancia fisiológica de estos agonistas alternativos aún no se comprende por completo. La progesterona parece ejercer un efecto importante en la RA, ya que cuando los espermatozoides se exponen primero a la progesterona y después a la ZP, la exocitosis se incrementa aún más que cuando los dos agonistas se presentan juntos o en orden inverso⁽⁷⁸⁾. Es posible entonces que la ZP finalice un proceso excitotico ya iniciado durante la capacitación⁽⁷⁹⁾.

Hasta el día de hoy, existen muchos estudios relacionados con los cambios en el funcionamiento del espermatozoide después de la incubación con diferentes factores reproductivos, sin embargo los estudios de la interacción entre el espermatozoide y la ZP humana están severamente restringidos debido a la dificultad de obtener óvulos humanos como fuente de ZP nativa. Para superar esta limitación, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de clonar y expresar proteínas recombinantes humanas de la ZP, con el objetivo de esclarecer los mecanismos de interacción entre el espermatozoide y esta región del óvulo. Tomando esto en cuenta, se ha demostrado que la ZP3 humana recombinante expresada en células de ovario de hámster chino (CHO), es capaz de inducir la RA y de promover la fusión de espermatozoides con óvulos de hámster⁽⁸⁰⁻⁸²⁾. Resultados similares se han obtenido con ZP4 (llamada ZPB por los autores) y ZP3 expresadas en células Sf21⁽⁸³⁾. Sin embargo, se debe investigar más a fondo la utilidad de cada sistema celular de expresión, en particular porque la hZP3 expresada en células 293T no tiene efecto alguno en la RA⁽⁸⁴⁾.

En un estudio reciente⁽⁸⁵⁾ se utilizaron proteínas recombinantes expresadas en células Sf9 para investigar los efectos de ZP2, ZP3 y ZP4 en el funcionamiento de espermatozoides humanos. La ausencia de ZP1 en tal estudio no se consideró un problema crítico, ya que esta glicoproteína no es muy abundante en la ZP⁽²⁷⁾. Una vez expresadas las tres glicoproteínas, se realizaron pruebas en donde estas fueron

reconocidas específicamente por anticuerpos, y se confirmaron tamaños mayores que los predichos por las secuencias de cDNA para las tres glicoproteínas. Este hecho sugirió que las proteínas sufrieron modificaciones postraduccionales (e. g., glicosilación) durante su expresión. Por otro lado, los pesos moleculares de las proteínas recombinantes resultaron distintos de aquellos de las proteínas nativas, lo que indicó que el tipo y/o cantidad de glicosilación producida por el sistema de expresión es distinto del observado en el sistema nativo.

Las glicoproteínas ZP nativas se encuentran altamente glicosiladas y las investigaciones en varias especies, incluyendo al humano, apoyan la hipótesis de que las interacciones específicas entre el óvulo y el espermatozoide son eventos mediados por carbohidratos. Investigaciones en las cuales se han caracterizado los carbohidratos presentes en la ZP humana mediante estudios de histoquímica en ovocitos no viables, revelan que posee residuos de manosa, ácido siálico, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fucosa, β -galactosa y el disacárido β -gal-(1-3)N-acetilgalactosidasa enmascarado por residuos de ácido siálico^(86,87). En un trabajo reciente⁽⁸⁸⁾, las ZP recombinantes humanas expresadas en células Sf9 se sometieron a un análisis de afinidad a lectinas, y se determinó que contienen residuos de manosa, ácido siálico y/o N-acetilglucosamina, α -N-acetilgalactosamina, fucosa y N-acetilglucosamina ligada al oxígeno de la Ser del esqueleto polipeptídico. Por lo tanto, las proteínas nativas y las ZP recombinantes humanas mencionadas poseen carbohidratos similares, si bien los patrones de glicosilación obtenidos no son idénticos.

Al examinar la actividad biológica de las glicoproteínas ZP, espermatozoides humanos capacitados se incubaron con ZP2, ZP3 o ZP4 a diferentes intervalos de tiempo. *La incubación de células con ZP3 o ZP4 dio como resultado un incremento significativo en el número de espermatozoides que llevaron a cabo la RA, mientras que ningún cambio significativo se observó al incubarlos con ZP2⁽⁸⁵⁾*. La inducción de RA se detectó en los primeros 10 minutos de la incubación, sin embargo la estimulación por ZP3 o ZP4 fue significativa solo después de 20 minutos. La combinación de ZP3 y ZP4 dio como resultado un efecto en la RA similar al observado con las proteínas individuales. Con esto, se demostró que dos (ZP3 y ZP4) de las tres glicoproteínas expresadas en células Sf9, son capaces de promover la RA en espermatozoides humanos capacitados.

Por otro lado, también en una investigación reciente (*artículo en vía de publicación*) se expresaron las proteínas ZP2 y ZP3 humanas en células CHO, para analizar el papel que desempeñan los oligosacáridos ligados a N y a O, en el proceso de la fecundación. Los datos presentados en dicho trabajo reportan un valor neto de ~32% de espermatozoides con acrosoma reaccionado, al incubarlos en presencia de ZP3 recombinante.

4. HIPÓTESIS

En el espermatozoide humano existen canales permeables a Ca^{2+} que participan en la fase inicial de la RA inducida por rhZP3.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Identificar a los canales de Ca^{2+} que participan en la RA inducida por ZP3 recombinante, en el espermatozoide humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprobar la eficiencia de la actividad de las glicoproteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 elaboradas en el departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INNSZ).
- Comprobar la eficiencia de la actividad de la proteína recombinante ZP3 elaborada en el departamento de Biología Celular de la Universidad de Murcia, España.
- Caracterizar farmacológicamente a los canales iónicos permeables a Ca^{2+} que participan en la vía de señalización de la RA inducida por ZP3 recombinante, en espermatozoides humanos capacitados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

En todas las pruebas descritas en este trabajo, se utilizaron muestras de semen de donadores sanos con mínimo 2 días de abstinencia y máximo 7. Se verificó que las muestras, obtenidas por masturbación, cumplieran con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (Ver **Apéndice I**)⁽⁸⁹⁾. Cada muestra se colectó en su totalidad dentro de un frasco de plástico estéril y se transportó al laboratorio de manera inmediata para incubarla dentro de una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂ durante 40 minutos, promoviendo así una licuefacción adecuada de la misma. En seguida, los espermatozoides móviles se separaron del semen mediante la técnica de *swim up*.

6.1 *Swim up* y capacitación de espermatozoides

El método de *swim up* está basado en el aumento del proceso de migración de los espermatozoides en el fluido seminal, a una capa superior de medio artificial dentro de un tubo de ensayo⁽⁹⁰⁾. Al utilizar la técnica de *swim up* se aplicó el siguiente procedimiento:

1. Colocar 1 ml de semen previamente licuado, dentro de un tubo de ensayo. Agregar muy lentamente al tubo, 500 µl de medio HAM's F-10 con una concentración de 2 mM de Ca²⁺ y 5 mg/ml de BSA.

Nota: Es muy importante evitar la mezcla de las dos fases (semen y HAM's F-10+BSA+Ca²⁺).

2. Colocar el tubo con una inclinación de 45° dentro de una gradilla e incubar durante 1 hora dentro de una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂.

En los experimentos en los cuales se requerían células no capacitadas, durante el *swim up* y la capacitación siempre se utilizó medio HAM's F-10 no suplementado (HAM's F-10 sin BSA y sin Ca²⁺) para tratar a los espermatozoides. Las células móviles se recuperaron tomando cuidadosamente los 350 µl superiores de la fase de medio HAM's F-10. Después se procedió a ajustar la concentración de espermatozoides en las cuales más adelante se promovió el proceso de capacitación. El ajuste del número de células se llevó a cabo de la siguiente forma:

1. Tomar la cantidad necesaria de medio HAM's F-10 con células, para preparar una dilución 1:20.
2. Colocar 10 µl de esta dilución en un hemocitómetro para determinar el número de espermatozoides obtenidos con la técnica de *swim up*.
3. Con base en el número obtenido de células, tomar la cantidad de medio en donde se tengan 7×10^6 células y llevar ese volumen a 1 ml con medio HAM's F-10 suplementado.

El tubo con células y medio HAM's F-10 suplementado se incubó durante 4 horas dentro de una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂ para promover la capacitación de los espermatozoides. Al finalizar la capacitación, se resuspendió el medio con las células y se tomó el número de espermatozoides necesario según el experimento, tomando en cuenta que en cada prueba de inducción o inhibición de la RA siempre se utilizaron 300,000 células.

6.2 Obtención de la curva de concentración de ZP3 (INNSZ, lote 2005)

Los stocks de ZP3 (INNSZ) lotes 2005, 2006 y 2007 se encontraban a concentraciones de 300 ng/µl, 140 ng/µl y 300 ng/µl, respectivamente. En este trabajo se probó solamente la actividad de la glicoproteína del lote 2005, a distintas concentraciones. Dichas cantidades se diluyeron en medio HAM's suplementado y se procedió a resuspender. Finalmente se agregaron las células y se resuspendió nuevamente. En las pruebas de control positivo se utilizó un stock 0.5 mM del ionóforo de Ca²⁺, A-23187 (DMSO), y se agregó la cantidad necesaria para llevar a una concentración final de 7 µM. Las cantidades utilizadas en la curva de concentración de ZP3 (INNSZ) lote 2005, se presentan a continuación:

Condición	ZP3	Ionóforo	HAM's suplementado	Células
Control -	-	-	30 µl	10 µl
5 ng/µl	0.67 µl	-	29.33 µl	10 µl
10 ng/µl	1.3 µl	-	28.7 µl	10 µl
15 ng/µl	2.0 µl	-	28 µl	10 µl
20 ng/µl	2.67 µl	-	27.33 µl	10 µl
Control +	-	0.56 µl	29.44 µl	10 µl

Las células se incubaron durante 30 minutos dentro de una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂, para estimular la RA en los espermatozoides.

6.3 Inducción de la reacción acrosomal con glicoproteínas ZP

6.3.1 Inducción con ZP2, ZP3 y ZP4 (INNSZ)

Los stocks de las glicoproteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 lote 2006, proporcionadas por el INNSZ, se encontraban a las siguientes concentraciones:

Stocks	
Glicoproteína	Concentración
ZP2	170 ng/μl
ZP3	140 ng/μl
ZP4	126 ng/μl

A partir de estos tres stocks se prepararon alícuotas (10 ng/μl) de las tres glicoproteínas, diluyéndolas en medio HAM's F-10 no suplementado. El objetivo de preparar las alícuotas fue evitar el congelamiento y descongelamiento constante de los stocks, lo cual eventualmente dañaría la actividad biológica de las glicoproteínas. Finalmente, las cantidades utilizadas quedaron de la siguiente manera:

Alícuota	Glicoproteína	HAM's F-10
ZP2	1.17 μl	18.83 μl
ZP3	1.42 μl	18.58 μl
ZP4	1.58 μl	18.42 μl

Por lo tanto, cuando se hicieron las primeras pruebas de RA la concentración final de cada glicoproteína fue de 1 ng/μl en un volumen final de 20 μl.

En las pruebas para determinar el efecto de las glicoproteínas ZP2, ZP3 y ZP4 (INNSZ) en la RA de espermatozoides humanos, primero se colocaron las cantidades necesarias de las proteínas o del ionóforo dentro de tubos eppendorf. Posteriormente se agregó medio HAM's F-10 con o sin BSA y Ca²⁺, dependiendo de la condición, y se resuspendió. Es importante mencionar que las pruebas con espermatozoides **no** capacitados se hicieron con células tratadas durante el *swim up* y la fase de capacitación, con medio HAM's F-10 **no** suplementado. Las pruebas de control positivo se hicieron utilizando un stock 1 mM del ionóforo de Ca²⁺ A-23187 (DMSO) y se llevaron a una

concentración final de 7 μ M. Finalmente, se adicionaron las células a todas las pruebas y se resuspendió el medio. La cantidad de cada componente utilizado en las distintas pruebas se detalla a continuación:

Pruebas de RA con espermatozoides capacitados

Condición	Proteína	Ionóforo	HAM's suplementado	Células
Control -	-	-	15 μ l	5 μ l
ZP1	2 μ l	-	13 μ l	5 μ l
ZP2	2 μ l	-	13 μ l	5 μ l
ZP3	2 μ l	-	13 μ l	5 μ l
Control +	-	0.140 μ l	14.86 μ l	5 μ l

Pruebas de RA con espermatozoides no capacitados

Condición	Proteína	Ionóforo	HAM's no suplementado	Células
Control -	-	-	15 μ l	5 μ l
ZP1	2 μ l	-	13 μ l	5 μ l
ZP2	2 μ l	-	13 μ l	5 μ l
ZP3	2 μ l	-	13 μ l	5 μ l
Control +	-	0.140 μ l	14.86 μ l	5 μ l

Las células se incubaron durante 30 minutos dentro de una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂, con la finalidad de estimular la RA en los espermatozoides.

6.3.2 Inducción con ZP3 (Murcia)

En este caso, además de ZP3 (INNSZ) se utilizó ZP3 recombinante elaborada en la Universidad de Murcia, España. La ZP3 (Murcia) que se nos proporcionó se encontraba liofilizada, por lo que el total de la proteína se resuspendió en agua bidestilada para obtener un stock con un volumen final de 200 μ l, del cual se tomó la cantidad necesaria para elaborar las pruebas y llevarlas a un volumen final de 30 μ l. En las pruebas de estos experimentos primero se colocaron distintos volúmenes de las proteínas ZP3 recombinantes o del ionóforo A-23187 (DMSO) en sus respectivos tubos. Se agregó HAM's F-10 suplementado, en las pruebas con proteínas ZP3 y en los controles, para finalmente resuspender todas las pruebas. Después se agregaron las células a cada tubo y se resuspendió de nueva cuenta. La cantidad de cada componente utilizado en los tres experimentos, se detalla a continuación:

Condición	Glicoproteína	Ionóforo	HAM's suplementado	Células
Control -	-	-	15 µl	5 µl
ZP3 (Murcia)	0.5 µl	-	24.5 µl	5 µl
ZP3 (INNSZ)	2 µl	-	13 µl	5 µl
Control +	-	0.140 µl	14.86 µl	5 µl

Las células se incubaron durante 30 minutos dentro de una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂, para estimular la RA en los espermatozoides.

6.4 Inducción de la RA con ZP3 (INNSZ) en presencia de inhibidores de canales de Ca²⁺

6.4.1 Incubación con SKF96365, Mibefradil y Nifedipina

Las pruebas de estos experimentos se hicieron utilizando tres inhibidores distintos de canales de Ca²⁺. Se usaron stocks de **SKF96365** (DMSO) 1200 µM, **Mibefradil** (H₂O) 300 µM, **Mibefradil** (H₂O) 1800 µM y **Nifedipina** (DMSO) 600 µM. Se tomaron las cantidades requeridas de los stocks para llevar las pruebas a concentraciones finales de 20 µM, 5 µM, 30 µM y 10 µM, respectivamente. Las pruebas de control positivo se hicieron utilizando un stock 1 mM del ionóforo de Ca²⁺, A-23187 (DMSO). Estas pruebas control se llevaron a una concentración final de 7 µM. El protocolo de incubación con inhibidores de canales de canales de Ca²⁺ y ZP3 se describe a continuación:

1. Colocar la cantidad necesaria de cada inhibidor dentro de los tubos correspondientes.
2. Agregar medio HAM's F-10 suplementado y resuspender.
3. Introducir los espermatozoides a las pruebas y resuspender nuevamente.
4. Incubar las pruebas durante 15 minutos dentro de una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂ para promover el bloqueo de los canales de Ca²⁺ en los espermatozoides.
5. Transferir el contenido de las pruebas a tubos en los cuales se haya colocado previamente la cantidad necesaria de ZP3 (INNSZ) y resuspender.
6. Incubar las células durante 30 minutos dentro de una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂, con la finalidad de estimular la RA en las células.

En seguida se enlistan las cantidades utilizadas de cada sustancia en los experimentos:

Condición	Inhibidor	ZP3	Ionóforo	HAM's suplementado	Células
Control -	-	-	-	15 µl	5 µl
ZP3	-	2 µl	-	13 µl	5 µl
SKF96365 20 µM	0.33 µl	2 µl	-	12.5 µl	5 µl
Mibefradil 5 µM	0.33 µl	2 µl	-	12.5 µl	5 µl
Mibefradil 30 µM	0.33 µl	2 µl	-	12.5 µl	5 µl
Nifedipina 10 µM	0.33 µl	2 µl	-	12.5 µl	5 µl
Control +	-	-	0.140 µl	14.86 µl	5 µl

6.4.2 Incubación con Ni²⁺

En este caso se utilizó Ni²⁺ para inhibir a los canales Ca_v3 que podrían participar en la RA del espermatozoide humano, por lo cual se prepararon dos stocks de NiCl₂ (H₂O) a concentraciones de 1 mM y 10 mM. El stock 1 mM se utilizó para preparar las pruebas que debían llevarse a las concentraciones finales de 20 µM, 50 µM y 100 µM, mientras que el stock 10 mM se usó para preparar las pruebas llevadas a concentraciones finales de 200 µM y 300 µM. En las pruebas de control positivo se utilizó un stock 0.5 mM del ionóforo de Ca²⁺, A-23187 (DMSO), y se agregó la cantidad necesaria para llevar a una concentración final de 7 µM. El protocolo utilizado para incubar con inhibidores de canales de Ca²⁺ y ZP3, se describe en la sección 5.4.1. La cantidad de cada sustancia utilizada en los experimentos se presenta en seguida:

Condición	Inhibidor	ZP3	Ionóforo	HAM's suplementado	Células
Control -	-	-	-	15 µl	5 µl
Ni ²⁺ 20 µM	0.4 µl	2 µl	-	12.6 µl	5 µl
Ni ²⁺ 50 µM	1 µl	2 µl	-	12 µl	5 µl
Ni ²⁺ 100 µM	2 µl	2 µl	-	11 µl	5 µl
Ni ²⁺ 200 µM	0.4 µl	2 µl	-	12.6 µl	5 µl
Ni ²⁺ 300 µM	0.6 µl	2 µl	-	12.4 µl	5 µl
Control +	-	-	0.28 µl	14.72 µl	5 µl

6.4.3 Incubación con Verapamil y Diltiazem

En estos experimentos se probó la actividad de dos inhibidores distintos a los utilizados previamente: **Verapamil** (fenilalquilamina) y **Diltiazem** (benzodiazepina), por lo cual se preparó un stock de cada inhibidor. Los stocks en cada caso se prepararon a concentraciones de 1 mM y 10 mM. El stock 1 mM (H₂O) se utilizó para preparar las

pruebas llevadas a una concentración final de 10 μM , mientras que el stock 10 mM (H_2O) se usó para aquellas pruebas llevadas a una concentración final de 80 μM . En las pruebas de control positivo se utilizó un stock 0.5 mM del ionóforo de Ca^{2+} , A-23187 (DMSO), y se agregó la cantidad necesaria para llevar a una concentración final de 7 μM . El protocolo utilizado para incubar con inhibidores de canales de Ca^{2+} y ZP3, se describe en la sección 5.4.1. Las cantidades utilizadas de cada sustancia se enlistan a continuación:

Condición	ZP3	Inhibidor	Ionóforo	HAM's suplementado	Células
Control -	-	-	-	30 μl	10 μl
Verapamil 10 μM	1.34 μl	0.4 μl	-	28.26 μl	10 μl
Verapamil 80 μM	1.34 μl	0.4 μl	-	28.26 μl	10 μl
Diltiazem 10 μM	1.34 μl	0.4 μl	-	28.26 μl	10 μl
Diltiazem 80 μM	1.34 μl	0.4 μl	-	28.26 μl	10 μl
Control +	-	-	0.56 μl	29.44 μl	10 μl

6.4.4 Incubación con distintos inhibidores de canales de Ca^{2+}

En estas pruebas se utilizaron cinco inhibidores distintos de canales de Ca^{2+} : **SKF96365**, **Mibefradil**, **Nifedipina**, **Verapamil** y **Diltiazem**. El protocolo utilizado para incubar con inhibidores de canales de Ca^{2+} y ZP3, se describe detalladamente en la sección 5.4.1. Las cantidades utilizadas de cada sustancia, se enlistan a continuación:

Condición	Inhibidor	ZP3	Ionóforo	HAM's+BSA+ Ca^{2+}	Células
Control -	-	-	-	30 μl	10 μl
ZP3	-	0.67 μl	-	29.33 μl	10 μl
SKF96365 20 μM	0.67 μl	0.67 μl	-	28.66 μl	10 μl
Mibefradil 5 μM	0.67 μl	0.67 μl	-	28.66 μl	10 μl
Mibefradil 30 μM	0.67 μl	0.67 μl	-	28.66 μl	10 μl
Nifedipina 10 μM	0.67 μl	0.67 μl	-	28.66 μl	10 μl
Verapamil 10 μM	0.4 μl	0.67 μl	-	28.93 μl	10 μl
Diltiazem 10 μM	0.4 μl	0.67 μl	-	28.93 μl	10 μl
Control +	-	-	0.28 μl	29.72 μl	10 μl

6.5 Tinción de espermatozoides con FITC-PSA

En todos los experimentos descritos anteriormente, después de incubar a las células con la ZP3 se procedió a permeabilizar las membranas plasmáticas y a teñir a los espermatozoides con FITC-PSA (Ver **APÉNDICE II**) utilizando el protocolo que se detalla a continuación:

1. Agregar 100 μ l de PBS 1X a cada uno de los tubos, y centrifugarlos durante 5 minutos a 2,800 rpm (en centrífuga eppendorf).
2. Descartar el sobrenadante y adicionar 40 μ l de metanol absoluto frío (-20°C) a cada tubo para permeabilizar la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa de los espermatozoides.
3. Agitar **inmediatamente después** los tubos en un Vórtex y colocarlos en hielo.
4. Trasladar el contenido de cada prueba a su respectivo pozo dentro de un portaobjetos con cubierta de teflón.
5. Colocar los portaobjetos sobre una plancha a 37°C y dejar secar durante 1 hora.
6. Agregar 7 μ l de FITC-PSA (25 μ g/ml en PBS 1X) a cada pozo y dejar reposar dentro de una cámara oscura y húmeda durante 30 minutos.
7. Introducir el portaobjetos a un frasco oscuro con agua bidestilada fría y mantener a 4°C durante 15 minutos.
8. Descartar el excedente de agua del portaobjetos. Dejarlo secar nuevamente sobre una plancha a 37°C y al abrigo de la luz.
9. Observar los espermatozoides utilizando un microscopio de fluorescencia y un objetivo 100X. Tomando en cuenta la presencia o ausencia de la tinción en los espermatozoides, evaluar el estado del acrosoma de 200 a 500 células elegidas al azar en varios campos ópticos.

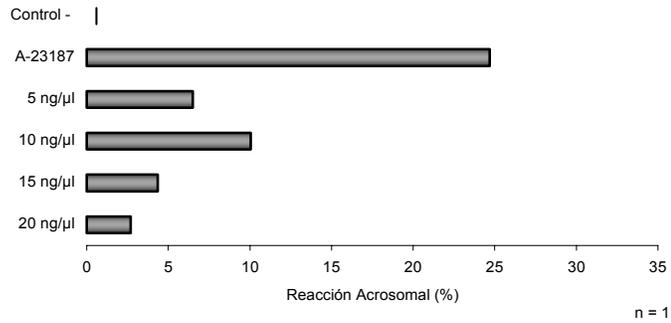
7. RESULTADOS

El análisis de los elementos que conforman a la vía de señalización de la RA en el espermatozoide humano, se ha visto restringido por largo tiempo. Esto debido a las dificultades técnicas que implica el obtener ovocitos humanos como fuente de ZP nativa. En un estudio reciente⁽⁸⁵⁾ se utilizaron proteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 expresadas en células Sf9, para investigar sus efectos en la función de espermatozoides humanos. Los resultados demostraron que la incubación de espermatozoides capacitados en presencia de ZP3 y/o ZP4 originó un incremento significativo en el número de espermatozoides que llevaron a cabo la RA, mientras que ningún cambio significativo se observó al incubar las células con ZP2.

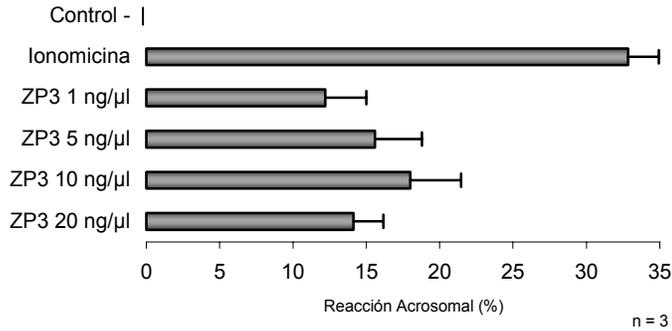
7.1 Curvas de concentración de ZP3 (INNSZ)

Durante el desarrollo de este proyecto se utilizaron tres lotes distintos de ZP3 y en cada caso se determinó la concentración óptima, es decir, la concentración que produjo el porcentaje máximo de reacción acrosomal. Todos los valores finales de RA mostrados en este trabajo, se obtuvieron al sustraer el porcentaje de RA espontánea (control negativo; intervalo 2.50%-16%), a los porcentajes crudos de RA obtenidos en cada condición. Esto con la finalidad de visualizar los valores netos de RA obtenidos en cada caso. Las curvas de concentración correspondientes a los lotes 2006 y 2007 fueron elaboradas por el Dr. Gerardo De Blas, en el mismo laboratorio en donde se realizó esta investigación. Para obtener la curva del lote 2005 se utilizaron cuatro concentraciones distintas de ZP3 en espermatozoides humanos capacitados para determinar el valor más alto de RA. En la **Figura 7** se resumen los porcentajes netos de RA obtenidos: ZP3 5 ng/μl RA = 6.49%, ZP3 10 ng/μl RA = 10.05%, ZP3 15 ng/μl RA = 4.35% y ZP 20 ng/μl RA = 2.69%. Estos datos demostraron que el porcentaje más elevado de RA se obtiene al utilizar una concentración de 10 ng/μl del lote 2005 de ZP3.

A)



B)



C)

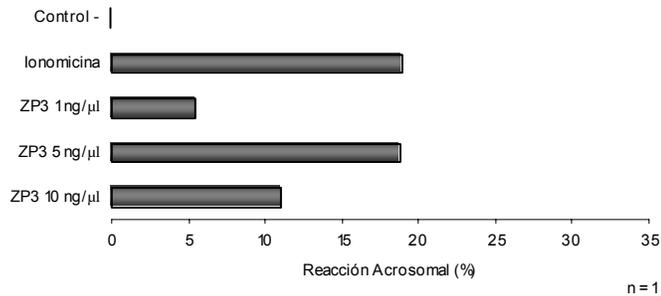


Figura 7. Curvas de concentración de ZP3 (INNSZ) lotes 2005, 2006 y 2007. Se incubaron espermatozoides humanos capacitados, en presencia de distintas concentraciones de ZP3. El estado del acrosoma se evaluó después de tefir a las células con FITC-PSA. Las gráficas muestran efectos dosis dependientes de la proteína ZP3 en las células. Los porcentajes más altos de RA se obtuvieron utilizando: **A)** 10 ng/μl del lote 2005, **n = 1**; **B)** 10 ng/μl del lote 2006, **n = 3**; **C)** 5 ng/μl del lote 2007, **n = 1**. Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea.

7.2 Efecto de las glicoproteínas de la ZP en la reacción acrosomal

7.2.1 Efecto de ZP2, ZP3 y ZP4 (INNSZ)

El primer objetivo del presente trabajo fue verificar la reproducibilidad de los resultados obtenidos por el INNSZ. Por este motivo se utilizó el mismo protocolo de inducción de la RA, que el usado por el grupo de investigación mencionado anteriormente⁽⁸⁵⁾. Se utilizaron células capacitadas o no capacitadas, las cuales se incubaron de manera independiente con cada una de las tres glicoproteínas ZP recombinantes, con el ionóforo A-23187 o en ausencia de cualquier inductor de la RA. La presencia o ausencia del acrosoma en las células se evaluó con FITC-PSA. La **Figura 8** integra los resultados obtenidos en seis experimentos realizados. ZP3 (1 ng/ μ l; RA = 9.02%, 3.98%) y ZP4 (1 ng/ μ l; RA = 5.62%, 2.00%) generaron valores de RA estadísticamente significativos con respecto a la RA espontánea en espermatozoides capacitados y no capacitados, respectivamente. Por otro lado, los valores de RA obtenidos con ZP2 (1 ng/ μ l; RA = 1.46%, 1.60%) no resultaron estadísticamente significativos en células capacitadas y no capacitadas, respectivamente.

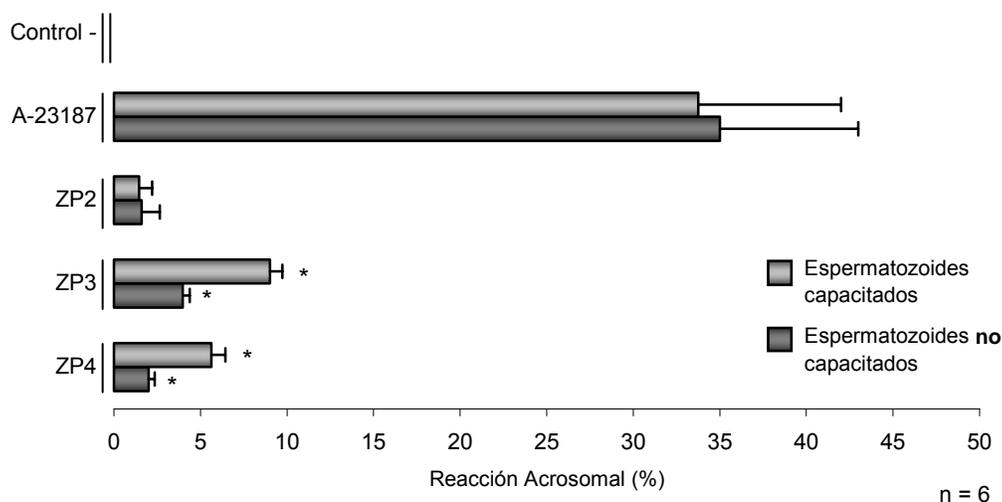


Figura 8. Inducción de la RA con las glicoproteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 (INNSZ). Se incubaron espermatozoides capacitados y no capacitados, en presencia de cada una de las tres glicoproteínas recombinantes (INNSZ) o del ionóforo de Ca^{2+} A-23187 (control positivo), para promover la RA. El estado del acrosoma se evaluó después de teñir a las células con FITC-PSA. Únicamente ZP3 y ZP4 indujeron la RA tanto en espermatozoides capacitados, como en no capacitados. Además, ZP3 generó el mayor porcentaje de RA. Los valores se encuentran normalizados con respecto a la RA espontánea. **n = 6**, * $P < 0.05$.

7.2.2 Efecto de ZP3 (Murcia)

En el 10º Simposio Internacional de Espermatología (Madrid, 2006) se presentó un trabajo de investigación (*artículo en vía de publicación*) en el cual se expresó la glicoproteína humana ZP3 en células CHO. En el estudio, se obtuvo un valor neto de ~32% de espermatozoides con RA al incubar a las células en presencia de ZP3 (Murcia). Gracias a la disponibilidad de esta proteína, en la presente investigación se planteó como segundo objetivo el verificar la habilidad de esta ZP3 (Murcia) para inducir la RA. Para cumplir esta meta se incubaron durante 30 minutos en presencia de la ZP3 (Murcia), espermatozoides capacitados. En el control positivo las células capacitadas se incubaron con el ionóforo A-23187, mientras que en el control negativo las células se incubaron en ausencia de cualquier inductor de la RA. Además, se incluyó un control en el cual espermatozoides capacitados se incubaron únicamente con ZP3 (INNSZ). Después de teñir a las células con FITC-PSA, se determinó el estado del acrosoma al observarlas en un microscopio de fluorescencia. Los resultados de dos experimentos en los cuales se usaron las condiciones anteriores, se resumen en la **Figura 9**. La ZP3 (Murcia) generó un porcentaje de RA significativamente superior con respecto a la RA espontánea, sin embargo tal valor de RA es 87% más bajo que el reportado.

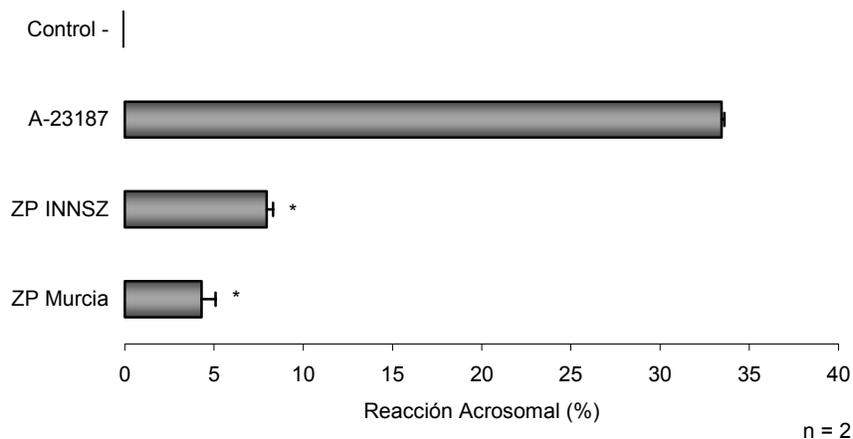


Figura 9. Inducción de la RA con la proteína recombinante ZP3 (Murcia). Espermatozoides humanos capacitados se incubaron en presencia de ZP3 (Murcia). El estado del acrosoma se evaluó después de teñir a las células con FITC-PSA. ZP3 (Murcia) induce pobremente la RA. Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea. n = 2, *P<0.05.

Seleccionamos a la ZP3 (INNSZ) para los siguientes experimentos de este trabajo, debido a que se obtuvo el máximo porcentaje de RA con esta glicoproteína, además de otra serie de ventajas que implica su uso (ver **DISCUSIÓN**).

7.3 Efecto de inhibidores de canales de Ca^{2+} en la reacción acrosomal inducida por ZP3 (INNSZ)

7.3.1 Efecto de SKF, Mibefradil y Nifedipina

La siguiente etapa de la investigación se inició utilizando tres drogas capaces de inhibir la actividad de los distintos canales de Ca^{2+} que se piensa, participan en la vía de señalización de la RA. Por tal motivo, en espermatozoides capacitados se indujo la RA al incubarlos en presencia de tres inhibidores de canales de Ca^{2+} . Las drogas elegidas fueron el **SKF96365** 20 μ M que bloquea canales SOC, el **Mibefradil** 5 μ M y 30 μ M, que bloquea canales Ca_v3 (corriente tipo T) y también Ca_v1 (corriente tipo L) a las concentraciones respectivas. También se probó **Nifedipina** 10 μ M, la cual inhibe la actividad de los canales Ca_v1 . Como control positivo se incubaron las células con A-23187 y como control negativo se incubaron las células en ausencia de cualquier inductor de la RA. Los valores promedio obtenidos de seis experimentos en los cuales se utilizaron estas drogas, se muestran en la **Figura 10**. Las pruebas con **SKF96365** (20 μ M; RA = 2.58%), **Mibefradil** (5 μ M, 30 μ M; RA = 1.82%, 2.10%, respectivamente) y **Nifedipina** (10 μ M; RA = 0.85%) arrojaron valores de RA significativamente menores con respecto al control de ZP3 (1 ng/ μ l; RA = 8.97%). Esto demuestra que los tres compuestos son capaces de impedir que se lleve a cabo la RA, probablemente al bloquear a los canales de Ca^{2+} involucrados en este proceso.

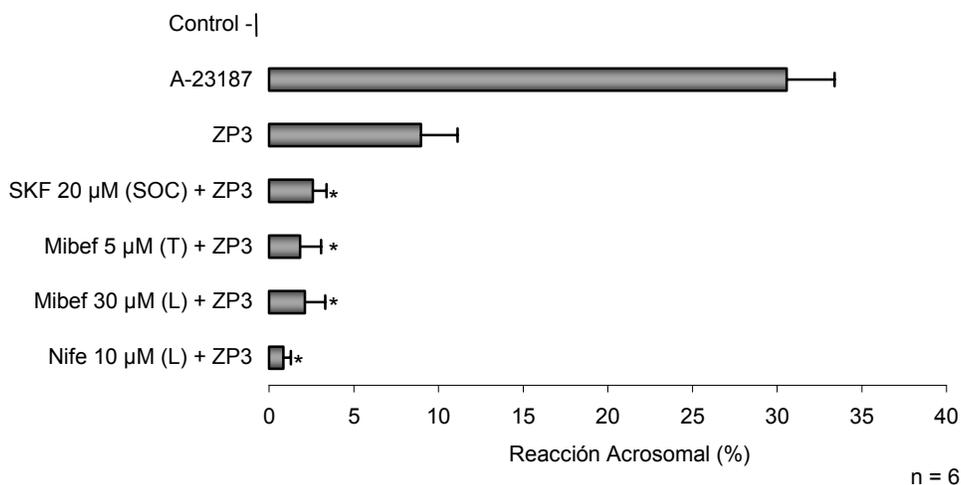


Figura 10. SKF96365, Mibefradil y Nifedipina inhiben la RA inducida por ZP3 (INNSZ). Espermatozoides humanos capacitados se incubaron en presencia de tres inhibidores de canales de Ca^{2+} . El SKF96365 (20 μ M) bloquea canales SOC, el Mibefradil (5 μ M) bloquea canales Ca_v3 y a más de 30 μ M bloquea también canales Ca_v1 . Por otro lado, la Nifedipina (10 μ M) bloquea canales Ca_v1 . El estado del acrosoma se evaluó después de teñir las células con FITC-PSA. Las tres drogas redujeron de manera significativa la RA inducida por ZP3 recombinante. Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea. n = 6, *P<0.05.

Considerando los resultados de inhibición de la RA obtenidos al usar SKF96365, Mibefradil y Nifedipina, en los experimentos posteriores los esfuerzos se centraron en obtener un perfil farmacológico más amplio para tratar de identificar a los canales involucrados en la RA.

7.3.2 Inhibición por Ni²⁺

La participación de los canales de corriente tipo T durante la RA en espermatozoides de humano se ha cuestionado ampliamente, ya que a pesar de que los tres canales Ca_v3 están presentes en estas células, hasta ahora su relevancia funcional se ha investigado de manera indirecta y usualmente en poblaciones de espermatozoides⁽⁹¹⁾. Nuestros resultados con Mibefradil sugieren que estos canales podrían participar en dicho evento. A pesar de que el Ni²⁺ es un inhibidor general de canales de Ca²⁺ (modulados por voltaje y tipo SOC), al menos para los tres canales tipo T, las IC₅₀ están bien definidas (ver **APÉNDICE III**). Por este motivo, realizamos una curva dosis dependiente de la inhibición por Ni²⁺ en la RA inducida por ZP3. La **Figura 11** muestra los valores de RA obtenidos al promediar los resultados de seis experimentos. Ni²⁺ 20 μM (RA = 3.41%), Ni²⁺ 50 μM (RA = 1.45%), Ni²⁺ 100 μM (RA = 1.26%), Ni²⁺ 200 μM (RA = 0.38%) y Ni²⁺ 300 μM (RA = -0.28%) generaron valores significativamente menores con respecto al control de ZP3 (RA = 6.24%). Al comparar los valores de RA entre sí, es notorio el hecho de que al aumentar la concentración de Ni²⁺, los valores de RA disminuyen. Esto sugiere la participación en la RA de al menos un canal tipo Ca_v3, lo cual es consistente con los resultados obtenidos utilizando Mibefradil 5 μM en pruebas anteriores (Ver **Figura 10**). Es importante mencionar que debido al relativamente bajo porcentaje de RA obtenido en el control de ZP3, se consideró prudente tomar en cuenta un número > 200 células al observar en el microscopio. Por lo tanto, a partir de este experimento siempre se valoró el estado acrosomal de un número ≥ 500 células por prueba.

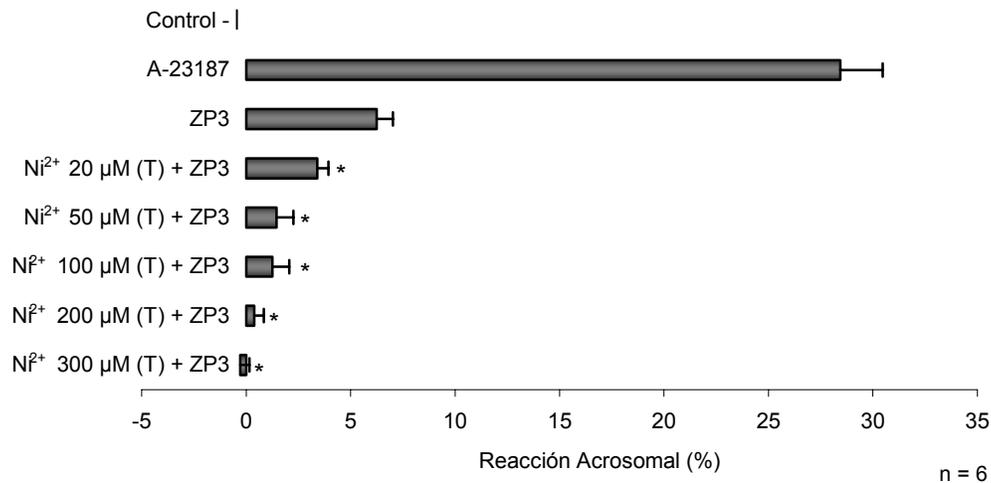


Figura 11. Inhibición por Ni²⁺ en la RA inducida por ZP3 (INNSZ). Espermatozoides humanos capacitados se incubaron en presencia de Ni²⁺ a cinco concentraciones distintas. El Ni²⁺ bloquea los canales Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3 a concentraciones de 250 μM, 13 μM y 216 μM, respectivamente. El estado del acrosoma se evaluó después de teñir a las células con FITC-PSA. La gráfica muestra una disminución dosis dependiente de la RA, al incubar espermatozoides humanos con el Ni²⁺. Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea. n = 6, *P<0.05.

7.3.3 Cálculo de IC₅₀ de la curva dosis respuesta de Ni²⁺

Los valores de RA obtenidos mediante la curva dosis respuesta de Ni²⁺, se utilizaron para calcular la IC₅₀ de inhibición. Esto se hizo con el apoyo del programa computacional *SigmaPlot 9.0*, cuya función es elaborar análisis de datos y generar gráficas a partir del procesamiento de estos. Al introducir los porcentajes de RA, el programa elaboró una regresión no lineal gracias a la cual se obtuvo el valor de IC₅₀ de inhibición. La IC₅₀ fue de 23 ± 10 μM.

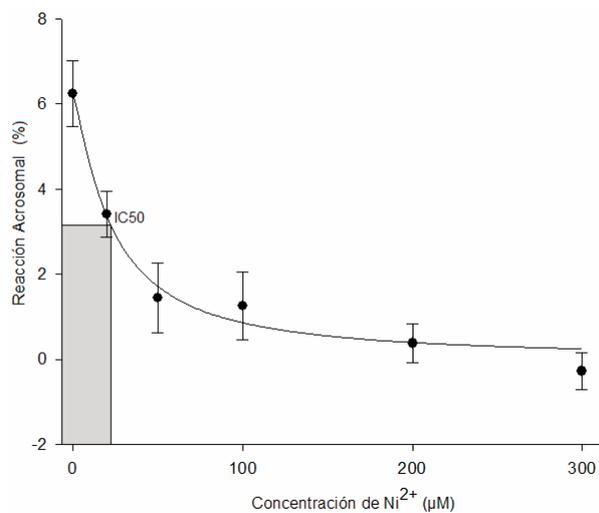


Figura 12. Cálculo de IC₅₀ de la curva dosis respuesta de Ni²⁺. Utilizando el programa *SigmaPlot 9.0* y a partir de los valores de RA obtenidos en la curva dosis respuesta de Ni²⁺, se elaboró una regresión no lineal utilizando la ecuación de una curva logística de cuatro parámetros. El valor de IC₅₀ calculado tomando en cuenta la gráfica, fue de 23 ± 10 μM. n = 6.

7.3.4 Efecto de Verapamil y Diltiazem

El siguiente objetivo fue confirmar farmacológicamente la posible participación de los canales Ca_v1 (corriente tipo L) en la vía de RA. Para cumplir esta meta se utilizaron dos drogas distintas (Verapamil y Diltiazem), de las cuales se sabe que bloquean estos tipos de canales a determinadas concentraciones. En el caso de ambos inhibidores, la literatura científica especializada reporta distintos valores de IC_{50} . Estos se ubican en un rango que va de 10 μM a 80 μM , por lo cual se decidió utilizar estas dos concentraciones para probar la actividad de los dos inhibidores. Los valores de la **Figura 13** engloban los resultados obtenidos en cuatro experimentos. Verapamil 10 μM (RA = 7.27%) y 80 μM (RA = 7.63%) no produjeron valores de RA significativamente distintos a los del control ZP3 (RA = 8.42%); sin embargo, Diltiazem 10 μM (RA = 1.42%) y 80 μM (RA = 1.07%) arrojaron valores de RA que sí resultaron menores con respecto al control de ZP3.

Los resultados obtenidos utilizando Diltiazem 10 μM y 80 μM son consistentes con aquellos obtenidos en experimentos previos, en donde espermatozoides capacitados se incubaron en presencia de Mibefradil 30 μM y Nifedipina 10 μM (Ver **Figura 8**). Por otro lado, los valores de RA utilizando Verapamil 10 μM y 80 μM fueron inesperados, debido a que la literatura reporta al Verapamil y al Diltiazem como inhibidores de canales Ca_v1 , a concentraciones ubicadas entre 10 μM y 80 μM en ambos casos.

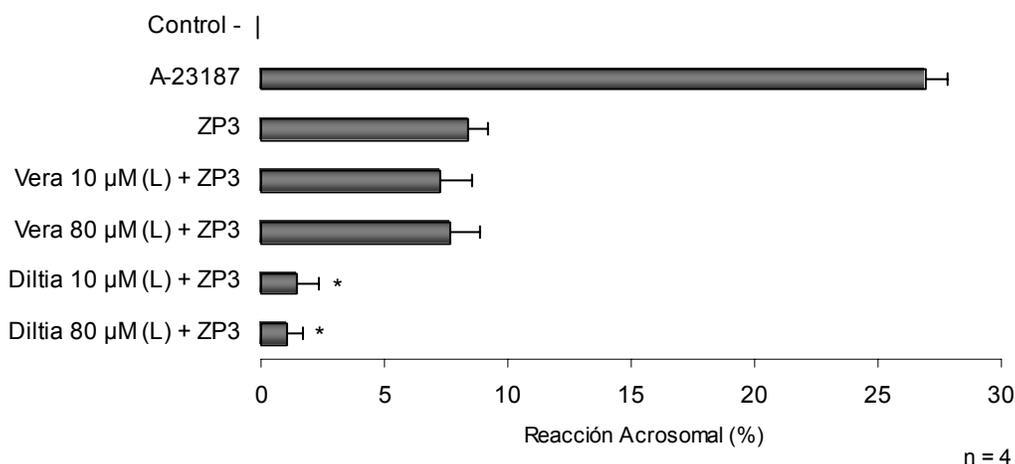


Figura 13. Efecto de Verapamil y Diltiazem en la RA inducida por ZP3 (INNSZ). Se incubaron espermatozoides humanos capacitados en presencia de Verapamil o Diltiazem. Ambas drogas inhiben canales Ca_v1 ; se probaron dos concentraciones distintas con cada inhibidor: 10 μM y 80 μM . El estado del acrosoma se evaluó después de teñir a las células con FITC-PSA. Las dos concentraciones de Diltiazem disminuyeron significativamente la RA inducida por ZP3 en espermatozoides humanos capacitados. En contraste, el Verapamil no inhibió la RA en ninguno de los dos casos. Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea. $n = 4$, * $P < 0.05$.

7.3.5 Verificación de los resultados en condiciones experimentales con menor número de variables

Durante el transcurso de este trabajo estuvieron presentes variables como diferentes lotes de ZP3 recombinante, donadores distintos, medio diferente, etc., por lo que finalmente decidimos realizar una nueva serie de experimentos combinando todos los inhibidores utilizados en una misma corrida y con esto comprobar la reproducibilidad de experimentos previos (Ver **Figuras 10 y 13**). Por tal motivo, espermatozoides capacitados se incubaron con las drogas y posteriormente en presencia de ZP3, en las condiciones experimentales mencionadas anteriormente. En la **Figura 14** se muestran los valores promedio de RA obtenidos de seis experimentos en total. SKF96365 20 μ M (RA = 1.13%), Mibefradil 5 μ M (RA = 0.73%), Mibefradil 30 μ M (RA = 1.72%), Nifedipina 10 μ M (RA = 1.51%) y Diltiazem 10 μ M (RA = 0.54%) dieron como resultado valores de RA significativamente menores a los obtenidos con el control de ZP3 (RA = 6.96%). En contraste, el Verapamil 10 μ M (RA = 5.20%) no presentó un porcentaje de RA distinto al control de ZP3.

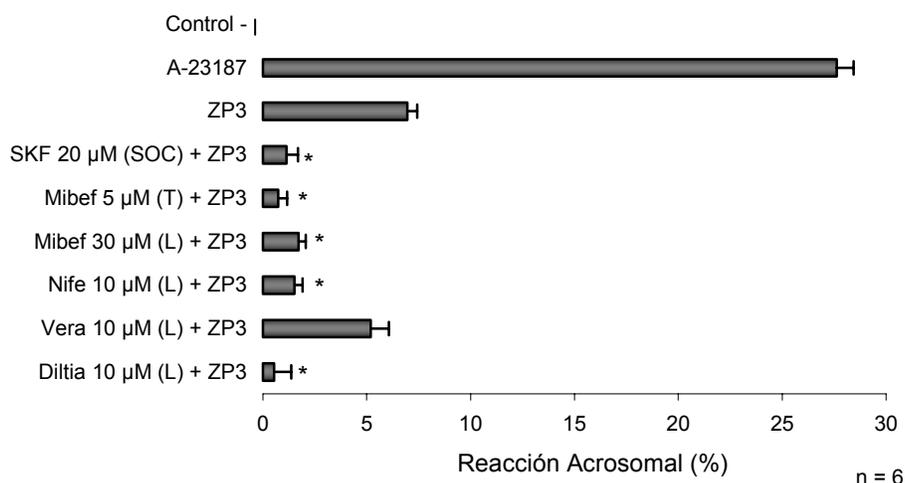


Figura 14. Efecto de SKF96365, Mibefradil, Nifedipina, Verapamil y Diltiazem en la RA inducida por ZP3 (INNSZ). Espermatozoides humanos capacitados se incubaron en presencia de cinco distintos inhibidores de canales de Ca^{2+} . El estado del acrosoma se evaluó después de teñir a las células con FITC-PSA. El SKF96365 (20 μ M), el Mibefradil (5 μ M, 30 μ M), la Nifedipina (10 μ M) y el Diltiazem (10 μ M) redujeron de manera significativa la RA inducida por ZP3 recombinante en espermatozoides humanos capacitados. Por otro lado, el Verapamil (10 μ M) no inhibió la RA. Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea. n = 6, *P<0.05.

8. DISCUSIÓN

En todas las especies en las cuales el espermatozoide tiene acrosoma, la RA es un evento esencial para que el espermatozoide fecunde al óvulo. A pesar de que este proceso se ha estudiado en muchas especies de mamífero, nuestros conocimientos sobre los eventos que suceden durante la RA en el espermatozoide de ratón son por mucho, los que se comprenden con mayor detalle. Se ha propuesto que la unión a la ZP3 (el principal inductor fisiológico de la RA) provoca en el espermatozoide de ratón la apertura de al menos tres tipos distintos de canales de Ca^{2+} , dos de los cuales están localizados en la membrana plasmática y cuya función es regular el ingreso de Ca^{2+} al espermatozoide. Se ha propuesto que el primer ingreso de Ca^{2+} es modulado por canales Ca_v3 (LVA)^(46-48,92), mientras que en la segunda entrada están involucrados, entre otros, los canales TRPC2⁽²⁰⁾.

Por otro lado, en el espermatozoide humano el entendimiento de la RA aún es muy deficiente, lo cual resalta la importancia de este trabajo. El atraso en el estudio de la vía de señalización de este proceso en el espermatozoide humano se debe principalmente a la dificultad que representa el purificar la ZP nativa y las glicoproteínas que la constituyen, a partir de óvulos humanos. Dada la importancia de comprender los eventos que suceden durante la fecundación, en los últimos años algunos grupos de investigación han logrado expresar *in vitro* las glicoproteínas que conforman a la ZP humana, utilizando distintos sistemas de expresión para cumplir esta meta⁽⁸⁰⁻⁸⁵⁾. Entre tales estudios destaca uno en particular, en el cual se expresaron las proteínas recombinantes humanas ZP2, ZP3 y ZP4 en células Sf9, utilizando el sistema de expresión de baculovirus⁽⁸⁵⁾. Debido a la disponibilidad de estas glicoproteínas, decidimos hacer uso de ellas para cumplir las metas planteadas en este proyecto.

Iniciamos la investigación incubando espermatozoides humanos capacitados y no capacitados con cada una de las tres glicoproteínas recombinantes (ZP2, ZP3 o ZP4) para verificar su funcionalidad. Con ZP3 y ZP4 obtuvimos valores significativos de RA, siendo ZP3 la glicoproteína con la cual se obtuvo el máximo porcentaje de RA. Por otro lado, ZP2 no indujo la RA de manera significativa. Los valores de RA que obtuvimos en este trabajo utilizando las tres glicoproteínas de manera independiente, son consistentes

con datos obtenidos en la investigación mencionada previamente⁽⁸⁵⁾, en la cual demostraron que las glicoproteínas ZP3 y ZP4 expresadas en células Sf9 son las únicas capaces de estimular la RA en espermatozoides capacitados. La propuesta de que ZP3 es el ligando primario involucrado en el reconocimiento de la ZP por el espermatozoide de mamífero, debería reexaminarse, debido a que un estudio reciente⁽⁸³⁾ en el cual se expresaron las glicoproteínas ZP humanas en células Sf21 también reportó que ZP4 era capaz de estimular la RA en espermatozoides humanos.

En nuestro trabajo también observamos que ZP3 y ZP4 expresadas en células Sf9, inducen la RA más allá del valor de RA espontánea, en espermatozoides humanos no capacitados. Este resultado fue inesperado, debido a que se ha demostrado que la capacitación es un evento fundamental previo a la RA inducida por la ZP en espermatozoides de mamífero⁽⁹³⁾. Incluso algunos investigadores consideran a la RA acrosomal como indicador de una capacitación completa. Sin embargo los valores de inducción son evidentemente menores a los observados en espermatozoides capacitados, lo que nos permite concluir que la capacitación prepara al espermatozoide para llevar a cabo la RA. Tal vez experimentos posteriores en donde analicemos el papel que cada uno de los factores capacitantes *in vitro* (Ca^{2+} , BSA, HCO_3^-) desempeña durante la RA inducida por ZP3 (INNSZ) en espermatozoides humanos, nos ayuden a explicar estos resultados.

Es importante enfatizar que el valor de RA que obtuvimos al incubar células capacitadas en presencia de ZP3 recombinante (~10%) expresada en células Sf9, es de gran relevancia por dos razones. Por un lado, este valor elevado de RA resulta muy útil para el desarrollo de estudios sobre fisiología molecular en el espermatozoide humano. Por ejemplo, el efecto inhibitorio de determinadas drogas en los espermatozoides se vería reflejado de manera conspicua al evaluar el estado del acrosoma en una población de células después de inducir la RA con ZP3 (INNSZ). Además, el valor de RA generado por ZP3 (INNSZ) también representa un gran logro, debido a que es proporcional al porcentaje de espermatozoides que llevan a cabo la RA *in vivo*. Un eyaculado humano contiene en promedio 250×10^6 espermatozoides, de los cuales ~30% logra capacitarse durante su desplazamiento a través del tracto genital femenino. Al final, ~10% de la población total de espermatozoides lleva a cabo la RA iniciada por inductores fisiológicos como ZP3.

La segunda meta de este trabajo fue intentar reproducir el valor de RA obtenido por otro grupo de investigación, el cual obtuvo un valor neto de ~32% de espermatozoides con acrosoma reaccionado al incubar las células en presencia de ZP3 (Murcia) humana expresada en células CHO (*artículo en vía de publicación*). En el presente estudio incubamos en presencia de la ZP3 (Murcia) a espermatozoides humanos capacitados y los resultados confirmaron que la proteína recombinante induce la RA de manera significativa, sin embargo el valor neto de RA obtenido (4.3%) fue 87% menor que el reportado. Existen diferencias metodológicas que pensamos influyen en la discrepancia de nuestros resultados. Por un lado, desconocíamos la concentración de la proteína ZP3 (Murcia) en el stock liofilizado que se nos proporcionó para llevar a cabo las pruebas de inducción de RA, por lo cual nos fue imposible controlar la concentración de ZP3 (Murcia) utilizada en cada ensayo. Además, el grupo de la Universidad de Murcia (España) lleva a cabo los ensayos de inducción de RA con ZP3 (Murcia) después de capacitar a los espermatozoides durante 1 hora, en un medio cuya concentración de Ca^{2+} es 22 mM. Estos valores se encuentran lejos de las condiciones fisiológicas que nosotros tratamos de reproducir en nuestros ensayos (mínimo 4 horas de capacitación y medio con 2 mM de Ca^{2+}).

Después de conocer las condiciones de capacitación utilizadas en las pruebas originales, decidimos tomarlas en cuenta para tratar de verificar nuevamente la reproducibilidad de los valores de RA obtenidos por el grupo que desarrolló la proteína ZP3 (Murcia). A pesar de que las condiciones utilizadas por el grupo de la Universidad de Murcia no eran útiles para nuestra investigación, decidimos tratar de reproducir sus resultados. Estos experimentos los realizó el Dr. Gerardo De Blas en el laboratorio en donde desarrollamos la presente investigación y arrojaron un valor neto promedio ($n = 3$) de 8% de RA al incubar con ZP3 (Murcia), a los espermatozoides capacitados durante 1 hora y en un medio con una concentración de 22 mM de Ca^{2+} . El valor crudo promedio obtenido en estos experimentos fue 51% de RA, sin embargo esta cantidad se normalizó en nuestro estudio con respecto a la RA espontánea (43% de RA). Por lo tanto, a pesar de que el valor neto de RA obtenido es similar al generado por la ZP3 (INNSZ), no logramos reproducir el valor de RA reportado, aún al utilizar las mismas condiciones experimentales que el grupo de la Universidad de Murcia.

También es importante considerar que el uso de una concentración de Ca^{2+} de 22 mM en un medio capacitante, resulta muy elevado si se toma en cuenta que los medios simples o compuestos (e. g., HTF, HAM's F-10) diseñados para manipular a los gametos humanos en los protocolos de reproducción asistida, usualmente incluyen una concentración de Ca^{2+} similar a la fisiológica, es decir, 2 mM⁽⁸⁵⁾. Por esta razón no podemos descartar la posibilidad de que el valor de RA obtenido por el grupo de la Universidad de Murcia sea un artefacto ocasionado por la elevada concentración de Ca^{2+} extracelular durante el proceso de capacitación en los espermatozoides. Por todas estas razones, decidimos continuar el proyecto utilizando ZP3 (INNSZ) como inductor de la RA.

La siguiente fase experimental consistió en probar el efecto de distintos inhibidores de los canales de Ca^{2+} que se piensa, participan en la RA del espermatozoide humano. Utilizamos inicialmente tres drogas, cuya actividad disminuiría la función de dichos canales: SKF96365 (20 μM)⁽⁵³⁾ y Nifedipina (10 μM)⁽⁴⁴⁾, bloquean canales SOC y Ca_v1 , respectivamente. Mibefradil 5 μM ⁽⁴²⁾ bloquea canales Ca_v3 , mientras que a una concentración más alta (30 μM)⁽⁴⁴⁾, bloquea canales Ca_v1 . Los resultados obtenidos mostraron una inhibición significativa de la RA, al incubar a las células en presencia de cada uno de los tres inhibidores. Estos datos sugieren tanto la presencia de canales funcionales Ca_v1 , Ca_v3 y SOC's en el espermatozoide humano, como la posible participación de los mismos en la RA. Además, los resultados que involucran a los canales Ca_v1 y SOC's, son consistentes con datos obtenidos en investigaciones previas.

Hasta ahora se considera que la entrada de Ca^{2+} externo a través de canales de Ca^{2+} modulados por voltaje es esencial para inducir la RA en espermatozoides de mamífero^(2,13,94). En un estudio previo se demostró que al menos seis subtipos de transcritos de canales de Ca^{2+} modulados por voltaje (HVA y LVA), se expresan en el espermatozoide humano⁽⁹⁵⁾. Los niveles de expresión detectados mediante RT-PCR y comparados al elaborar ensayos de protección de RNasa, quedaron de la siguiente manera: $\alpha1H \geq \alpha1G \geq \alpha1E \geq \alpha1B \geq \alpha1C \geq \alpha1I$. Esto sugiere que ambas subfamilias de canales de Ca^{2+} (HVA y LVA) podrían desempeñar funciones importantes en la entrada de Ca^{2+} a la célula. Resultados de otra investigación demostraron la presencia de canales $\text{Ca}_v1.2$ en la región acrosomal del espermatozoide humano⁽⁹⁶⁾. El uso de anticuerpos específicos en un estudio posterior reveló la presencia del canal $\text{Ca}_v1.2$ en la pieza media y en la pieza principal de espermatozoides⁽⁴⁴⁾, pero ninguna señal específica para el canal

Ca_v1.3. Hasta ahora se desconoce si los canales Ca_v1.1 y Ca_v1.4 están presentes en el espermatozoide humano. Anticuerpos específicos contra Ca_v3.1 en el espermatozoide de humano⁽⁴⁴⁾ detectaron al canal en la cabeza y pieza media. El anticuerpo específico para el canal Ca_v3.2 dio una señal intensa en la pieza media y tenue en la base de la cabeza del espermatozoide, mientras que la señal del anticuerpo dirigido al canal Ca_v3.3 se situó solo en la pieza media.

La fase de incremento sostenido del Ca²⁺ intracelular durante la RA, depende del incremento transitorio inicial de Ca²⁺. Esta segunda fase es dependiente del ingreso de Ca²⁺ a la célula, y en el espermatozoide de ratón se sabe que involucra la participación de canales TRPC2⁽²⁰⁾, los cuales forman canales tipo SOC's cuando se transfectan a células en cultivo⁽⁹⁷⁾. En un estudio se diseñó una serie de oligonucleótidos para amplificar, utilizando RT-PCR, los seis genes TRPC de mamífero (*hTRPC2* no, porque es un pseudogen) a partir de eyaculados humanos⁽⁹⁸⁾. Los resultados demostraron la presencia de los genes *TRPC1*, 3, 6 y 7 en células espermátogénicas humanas. También se utilizaron anticuerpos anti TRPC1, 3, 4 y 6 para investigar la expresión de estas proteínas en el espermatozoide humano⁽⁹⁸⁾. TRPC1 generó un patrón en forma de anillo en la región del segmento ecuatorial. La señal de TRPC3 se presentó tanto en la región acrosomal, como en la pieza media, mientras que las zonas de distribución de TRPC4 fueron la región acrosomal, la pieza media y la pieza principal. Finalmente, TRPC6 produjo un patrón de tinción en la pieza principal, pieza media y cabeza. Además, la presencia de TRPC1 y TRPC3 en la cabeza del espermatozoide humano también se demostró utilizando microscopía electrónica y anticuerpos secundarios acoplados a partículas coloidales de oro.

Por otro lado, el acrosoma se ha considerado durante mucho tiempo como un organelo capaz de almacenar Ca²⁺ debido a que presenta bombas de Ca²⁺ sensibles a taspigargina⁽⁹⁹⁾ y receptores de IP₃ (IP₃R)^(18,100,101). También se ha propuesto que la putativa poza de Ca²⁺ acrosomal cumple un papel muy importante durante la RA, ya que la disminución de Ca²⁺ en el acrosoma es capaz de mediar la apertura de canales SOC's en la membrana plasmática de los espermatozoides, lo cual tal vez ocasiona el incremento sostenido de Ca²⁺ durante la RA. Tomando en cuenta todos estos antecedentes sobre canales TRPC y SOC's, no es aventurado suponer que en el

espermatozoide humano algún miembro de la familia TRPC probablemente cumple el papel de canal SOC durante la RA.

Las primeras evidencias directas de que el ingreso de Ca^{2+} a las células era ocasionado por el agotamiento de Ca^{2+} de las pozas internas, se obtuvieron de estudios electrofisiológicos, los cuales establecieron que el proceso de vaciamiento de pozas era capaz de activar una corriente de Ca^{2+} llamada corriente de liberación de Ca^{2+} activada por Ca^{2+} o $I_{\text{CRAC}}^{(102)}$. La corriente I_{CRAC} no se activa por voltaje y es selectiva para Ca^{2+} , sin embargo no es la única corriente operada por pozas. Ahora se sabe que el ingreso de Ca^{2+} mediado por pozas comprende a una familia de canales permeables a Ca^{2+} con distintas propiedades y en distintos tipos celulares, por lo que es necesario considerar la posibilidad de que no todos los SOC's sean TRP's.

Los primeros indicios que obtuvimos sobre la presencia de canales SOC's, Ca_v1 y Ca_v3 en espermatozoides humanos, así como de su posible participación en la RA inducida por ZP3 (INNSZ), nos motivaron a realizar pruebas con inhibidores distintos a los probados en los primeros ensayos, los cuales nos ayudarían a corroborar los datos obtenidos con SKF96365, Mibefradil y Nifedipina. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue emplear distintas concentraciones de Ni^{2+} para registrar con mayor detalle la forma de inhibición de canal(es) Ca_v3 durante la RA. Los resultados que obtuvimos demostraron una inhibición dosis dependiente de este proceso, lo cual sugiere la participación de canal(es) Ca_v3 en la RA. Para determinar con precisión la identidad del o los canales involucrados en este proceso, utilizamos los valores de RA de la curva dosis respuesta de Ni^{2+} para calcular la IC_{50} de inhibición; esto último se hizo utilizando una gráfica de regresión no lineal generada por el programa *SigmaPlot 9.0*. Para elaborar la gráfica empleamos la ecuación de una curva logística de cuatro parámetros, debido a que los valores de RA para el Ni^{2+} se ajustaron mejor a esta expresión matemática. La IC_{50} que obtuvimos fue de $23 \pm 10 \mu\text{M}$. La IC_{50} reportada para el canal $\text{Ca}_v3.2$ utilizando Ni^{2+} como inhibidor, es de $13 \pm 2 \mu\text{M}^{(43)}$. Tomando estos valores en cuenta es fácil notar el parecido entre la magnitud de la IC_{50} de inhibición que obtuvimos y la IC_{50} de inhibición reportada para el canal $\text{Ca}_v3.2$, por lo que es posible que este canal participe en la fase inicial de la RA.

Estos resultados concuerdan con los hallazgos de otros grupos de investigación, los cuales han utilizado agonistas alternativos a la ZP3 para inducir la RA. Varios grupos han reportado que la RA inducida por neoglicoproteínas en espermatozoides humanos se inhibe por concentraciones micromolares de drogas que se sabe, afectan la actividad de los canales Ca_v3 (e. g., Mibefradil, Ni^{2+} y Nifedipina)^(103,104). De manera particular, en una investigación identificaron canales Ca_v3 en testículos humanos y demostraron la participación de estos, en la RA inducida por BSA manosilada⁽¹⁰⁴⁾. Estudios de biología molecular sugieren que estos canales de Ca^{2+} modulados por voltaje expresados en testículos humanos, son canales $Ca_v3.2$; además, pruebas farmacológicas demostraron la alta sensibilidad de estos canales al Mibefradil durante la RA⁽¹⁰⁴⁾ inducida por neoglicoproteínas.

La última meta de este proyecto fue profundizar en el estudio de la participación de los canales Ca_v1 durante la RA en espermatozoides humanos. Por tal motivo utilizamos dos compuestos, los cuales a determinadas concentraciones, inhiben la actividad de esta subfamilia de canales de Ca^{2+} modulados por voltaje: Verapamil (10 μ M, 80 μ M)^(42,105,106) y Diltiazem (10 μ M, 80 μ M)^(107,108). Es importante mencionar que probamos dos distintas concentraciones de cada droga, debido a que la literatura reporta inhibición de la actividad de sus canales blanco a concentraciones ubicadas entre ~10 μ M y ~80 μ M, en ambos casos. Los resultados que obtuvimos mostraron que solamente la incubación de espermatozoides en presencia de Diltiazem, inhibe la RA de manera significativa. En contraste, ninguna de las dos concentraciones utilizadas de Verapamil, fue capaz de inhibir la RA.

La inhibición de la RA con Diltiazem, es consistente con datos publicados. Además de la detección del canal $Ca_v1.2$ con anticuerpos en la región acrosomal del espermatozoide humano^(44,96), resultados de varios estudios sugieren la participación de canal(es) Ca_v1 en la RA inducida por ZP y neoglicoproteínas en el espermatozoide humano. Esta conclusión se derivó de los efectos inhibitorios que la Nifedipina y el Verapamil tienen sobre la RA^(96,103). Por otro lado, los valores que obtuvimos con el Verapamil fueron completamente inesperados ya que como se mencionó anteriormente, estudios previos han demostrado que esta droga inhibe canales Ca_v1 ^(107,108).

La primera hipótesis que propusimos para intentar explicar los datos obtenidos con el Verapamil, fue la carencia de actividad del reactivo *per se*. Sin embargo esto se descartó poco tiempo después, debido a que una curva dosis respuesta realizada por el grupo de investigación del Dr. Ricardo Félix (Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Cinvestav, D. F.) en la cual se registró el efecto de nuestro stock de Verapamil en células GH3 que expresan corrientes de Ca^{2+} moduladas por voltaje (HVA: $\alpha 1C$, $\alpha 1D$; LVA: $\alpha 1G$), demostró que la droga es perfectamente funcional. Una hipótesis alternativa es que el Verapamil sea responsable de alcalinizar el pH_i y tenga un efecto dual, inhibiendo a los canales Ca_v1 y quizá estimulando a los canales CatSper y/o SOC's. Otra posible explicación es que el canal Ca_v1 que tal vez participa en la RA del espermatozoide humano, sea un canal poco sensible al Verapamil, pero sensible al Diltiazem. A pesar de que estas dos últimas hipótesis aún no se han comprobado experimentalmente, son muy interesantes y merecen ser estudiadas a fondo.

Tomando en cuenta los resultados de esta investigación, podemos afirmar que de entre los distintos canales de Ca^{2+} asociados a la RA del espermatozoide humano, los canales Ca_v3 parecen cumplir un papel importante durante la fase inicial de este proceso. Proponemos que debido a su bajo umbral de activación por voltaje, estos canales podrían activarse por la despolarización inicial inducida por ZP3 a través de un mecanismo hasta ahora desconocido. Además, nuestros resultados también sugieren la participación de canales Ca_v1 durante la RA. De ser así, el ingreso inicial de Ca^{2+} modulado por los canales Ca_v3 provocaría una segunda despolarización, tal vez responsable de activar a los canales Ca_v1 en la membrana plasmática del espermatozoide. Si el ingreso del Ca^{2+} a la célula durante la RA estuviera modulado únicamente por canales Ca_v3 , la concentración intracelular de Ca^{2+} disminuiría en poco tiempo debido a las propiedades de cierre rápido de estos canales. En cambio, la posible activación posterior de canales Ca_v1 podría contribuir a incrementar y mantener una concentración crítica de Ca^{2+} en el citoplasma del espermatozoide, lo cual más adelante y probablemente mediante la participación de PLC, facilitaría el vaciamiento del Ca^{2+} acrosomal y la posterior apertura de canales SOC's.

Por último, es importante mencionar que los resultados de un reporte reciente⁽¹⁰⁹⁾ sugieren que la unión del espermatozoide a la zona pelúcida disminuye o detiene la progresión lineal de los espermatozoides motiles, y el empuje vigoroso del flagelo

transduce una señal mecanosensorial que ocasiona la movilización del Ca^{2+} acrosomal⁽¹¹⁰⁾ y la inducción de la RA. A diferencia de la transducción de señales a partir de la unión de un ligando a su receptor, los canales modulados por estímulos mecánicos pueden responder a fuerzas impuestas en la bicapa lipídica para regular los flujos de iones. Múltiples mecanotransductores se han descrito en animales, incluyendo policistinas⁽¹¹¹⁾ y miembros de la familia de receptores de potencial transitorio⁽¹¹²⁾. Este nuevo modelo de inducción de la RA difiere en gran medida de los modelos en los cuales la ZP3 actúa como ligando para la unión del espermatozoide y la inducción de la RA. Tomando esto en cuenta, es evidente que la validez de ambos modelos requiere desarrollar investigaciones posteriores.

9. CONCLUSIONES

- Las glicoproteínas ZP3 y ZP4 recombinantes (INNSZ) estimulan la reacción acrosomal en espermatozoides humanos capacitados.
- La ZP3 recombinante (INNSZ) produce el valor más elevado de reacción acrosomal en espermatozoides humanos capacitados.
- La ZP3 recombinante producida en Murcia, genera valores de reacción acrosomal similares a los obtenidos con la ZP3 recombinante producida en el INNSZ, sin embargo el valor reportado no es reproducible.
- El efecto de distintas drogas probadas en espermatozoides humanos capacitados, sugiere la participación de canales tipo SOC's, $Ca_v3.2$ (corriente tipo T) y Ca_v1 (corriente tipo L) en la vía de señalización de la reacción acrosomal inducida por ZP3 recombinante (INNSZ).

10. APÉNDICES

APÉNDICE I

El campo de la Andrología avanza rápidamente, y cada vez se tiene una conciencia más amplia sobre la importancia que conlleva el análisis objetivo de la calidad y las características funcionales de los espermatozoides, además de aquellas variables relacionadas con la función secretora de las glándulas accesorias. Es indispensable considerar esto al evaluar parejas infértiles y al analizar la fertilidad en hombres cuya producción espermática se encuentra suprimida por distintos compuestos. También se debe de tomar en cuenta al realizar ensayos de fecundación *in vitro* (IVF), inseminación artificial y estudios de fisiología molecular en el espermatozoide.

La creciente necesidad de estandarizar los procedimientos para la evaluación del semen humano, justificó la publicación del *Manual de laboratorio para la examinación de semen humano y la interacción entre semen y moco cervical* de la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁽⁸⁹⁾.

En dicho manual, la OMS establece los procedimientos y parámetros considerados como estándares en la evaluación del semen humano. Dichos valores se enlistan en la siguiente tabla:

Parámetro	Valor
Volumen	≥ 2 ml
pH	7.2 - 7.8
Concentración espermática	≥ 20 x 10 ⁶ espermatozoides/ml
Cantidad total de espermatozoides	≥ 40 x 10 ⁶
Movilidad	≥ 50% con movilidad progresiva o ≥ 25% con movilidad progresiva lineal
Morfología	≥ 50% espermatozoides con morfología normal
Viabilidad	≥ 50% espermatozoides vivos

Tabla II. Parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud⁽⁸⁹⁾.

APÉNDICE II

Existen dos clases de pruebas fluorescentes para evaluar el estado del acrosoma en el espermatozoide: aquellas que detectan el material intracelular asociado al acrosoma (y en consecuencia requieren que la célula sea permeabilizada antes de marcarla) y aquellas que pueden usarse en células vivas, no permeabilizadas. En la primera categoría se encuentran las lectinas. Las lectinas son las sustancias más accesibles de este grupo, ya que se unen a glicoconjugados de la matriz acrosomal o de la membrana acrosomal externa. De manera específica, la aglutinina de *Pisum sativum* asociada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) es una lectina que se une específicamente a los residuos de manosa y glucosa que forman parte del contenido acrosomal⁽¹¹³⁾.

Ciertos lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide se pueden disolver con sustancias orgánicas como los alcoholes. Por este motivo, antes de marcar a los espermatozoides con FITC-PSA, las células se expusieron a volúmenes discretos de metanol frío. De esta manera se generan orificios en la membrana plasmática del espermatozoide y en la membrana acrosomal externa, a través de los cuales se desplaza FITC-PSA hasta llegar a la matriz del acrosoma.

La tinción con FITC-PSA es una tinción negativa, debido a que la reacción acrosomal se comprueba mediante la desaparición de la tinción al observar las células en un microscopio de fluorescencia. El marcado de espermatozoides permeabilizados, con pruebas como FITC-PSA, deja a las células de acrosoma intacto con una marca fluorescente sobre el área anterior de la cabeza del espermatozoide. Por otro lado, los espermatozoides con acrosoma reaccionado no presentan ninguna marca fluorescente en el acrosoma, o solo una marca en el segmento ecuatorial (Ver **Figura 15**)⁽¹¹⁴⁾.

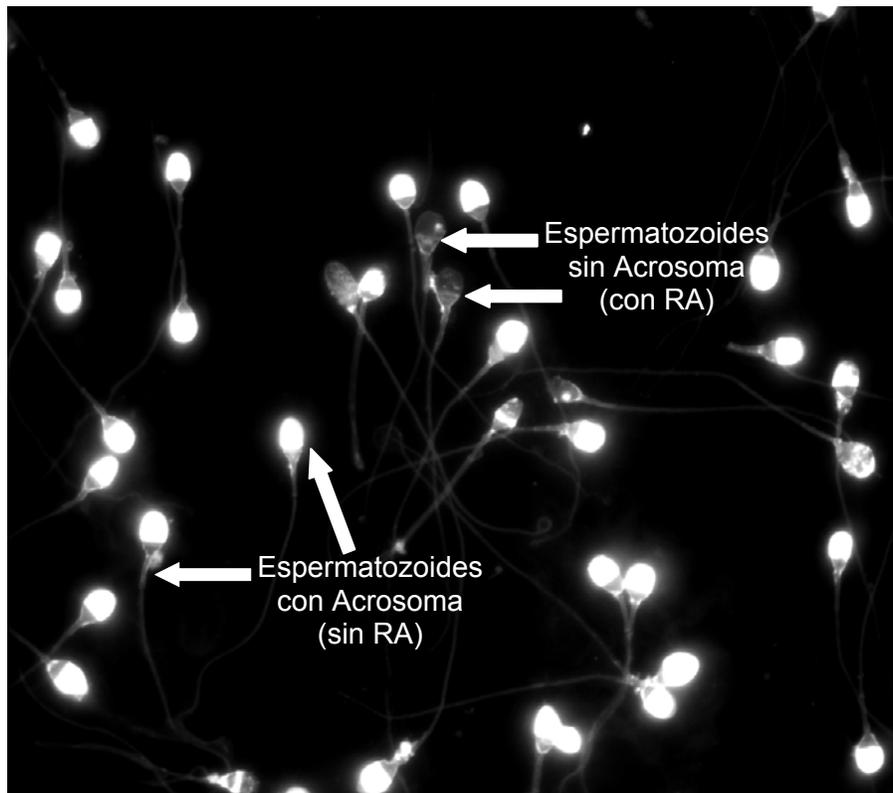


Figura 15. Evaluación de la RA con FITC-PSA. Espermatozoides capacitados se incubaron en presencia de ZP3 (INNSZ) y posteriormente se permeabilizaron con metanol absoluto frío (-20°C). Después de fijar las células sobre un portaobjetos, los espermatozoides se marcaron utilizando una aglutinina de *Pisum sativum* asociada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA; 25 µg/ml). La placa se observó en un microscopio de fluorescencia con un objetivo de 100X. La imagen muestra los posibles patrones de marcado que se obtienen al teñir espermatozoides mediante esta técnica.

APÉNDICE III

Inhibidor	Canal (corriente)	IC ₅₀	Referencia
SKF96365	SOC	20 µM	(53)
Mibefradil	Ca _v 3 (T)	5 µM	(42)
Mibefradil	Ca _v 1 (L)	30 µM	(44)
Nifedipina	Ca _v 1 (L)	10 µM	(44)
Ni ²⁺	Ca _v 3.1 (T)	250 µM	(43)
Ni ²⁺	Ca _v 3.2 (T)	13 µM	(43)
Ni ²⁺	Ca _v 3.3 (T)	216 µM	(43)
Verapamil	Ca _v 1 (L)	10 µM, 70 µM	(42,105,106)
Diltiazem	Ca _v 1 (L)	10 µM, 70 µM	(107,108)

Tabla III. Inhibidores de canales de Ca²⁺ utilizados en este trabajo.

11. ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de Adenosina (ing. Adenosine triphosphate).
BSA	Albúmina Sérica Bovina (ing. Bovine Serum Albumin).
Cal	Ionóforo de Calcio (ing. Calcium ionophore).
cAMP	Monofosfato Cíclico de Adenosina (ing. Cyclic Adenosine Monophosphate).
CatSper	Canal Catiónico del Espermatozoide (ing. Cation Channel of Sperm).
Ca_v	Canal de Calcio modulado por Voltaje (ing. Voltage-sensitive Calcium channel).
cDNA	Acido Desoxirribonucleico complementario (ing. complementary Deoxyribonucleic Acid).
CHO	Ovario de Hámster Chino (ing. Chinese Hamster Ovary).
DAG	Diacilglicerol (ing. Diacylglycerol).
DHP	Dihidropiridina (ing. Dihydropyridine).
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico (ing. Epidermal Growth Factor).
Em	Potencial de membrana (ing. Membrane Potential).
ER	Retículo Endoplásmico (ing. Endoplasmic Reticulum).
FITC-PSA	Aglutinina de <i>Pisum Sativum</i> asociada a Isotiocianato de Fluoresceína (ing. Fluorescein-Conjugated <i>Pisum sativum</i> Agglutinin).
GABA	Ácido Gama Aminobutírico (ing. Gamma-aminobutyric Acid).
HVA	Canal de Alto Umbral de Activación (ing. High Voltage-activated Channel)
hZP	Zona Pelúcida humana (ing. human Zona Pellucida).
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato (ing. Inositol 1,4,5-trisphosphate).
IRA	Índice de Reacción Acrosomal.
LVA	Canal de Bajo Umbral de Activación (ing. Low Voltage-Activated Channel).
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero (ing. messenger Ribonucleic Acid).
mZP	Zona Pelúcida de ratón (ing. murine Zona Pellucida).
NCBI	Centro Nacional para la Información en Biotecnología (ing. National Center for Biotechnology Information).

PAF	Factor Activador de Plaqueta (ing. Platelet Activating Factor).
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (ing. Polymerase Chain Reaction).
pH_i	Potencial Intracelular de Hidrógeno (ing. Intracellular Hydrogen Potential).
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-difosfato (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate).
PKA	Proteína Cinasa A (ing. Protein Kinase A).
PLCδ4	Fosfolipasa C δ 4 (ing. Phospholipase C δ 4).
PTx	Toxina Pertusis (ing. Pertussis Toxin).
rhZP	Zona Pelúcida humana recombinante (ing. recombinant human Zona Pellucida).
RA	Reacción Acrosomal (ing. Acrosome Reaction).
sAC	Adenilato Ciclasa soluble (ing. soluble Adenylate Cyclase).
Ser	Serina (ing. Serine).
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del Retículo Sarcoplásmico y Endoplásmico (ing. Sarcoplasmic/Endoplasmic-reticulum Ca ²⁺ -ATPase).
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i> .
SNARE	Proteínas Receptoras de Unión a NSF Soluble (ing. Soluble NSF Attachment Protein Receptors).
SOC	Canal Operado por Poza (ing. Store Operated Channel).
STIM	Molécula de Interacción con el Estroma (ing. Stromal Interaction Molecule).
Thr	Treonina (ing. Threonine).
TMD	Dominio Transmembranal (ing. Transmembrane Domain).
TRP	Receptor de Potencial Transitorio (ing. Transient Receptor Potential).
Tyr	Tirosina (ing. Tyrosine).
ZP	Zona Pelúcida (ing. Zona Pellucida).
ZP1-4	Glicoproteína 1-4 de la Zona Pelúcida (ing. Zona Pellucida Glycoprotein 1-4).

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Darszon, A. et al. Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* **243**, 79-172 (2005).
2. Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T. & Espinosa, F. Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev* **79**, 481-510 (1999).
3. Darszon, A., Beltran, C., Felix, R., Nishigaki, T. & Trevino, C.L. Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol* **240**, 1-14 (2001).
4. Yoshida, M., Ishikawa, M., Izumi, H., De Santis, R. & Morisawa, M. Store-operated calcium channel regulates the chemotactic behavior of ascidian sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 149-54 (2003).
5. Turner, R.M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* **18**, 25-38 (2006).
6. Esposito, G. et al. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2993-8 (2004).
7. Suarez, S.S. & Ho, H.C. Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **49**, 351-6 (2003).
8. Darszon, A. et al. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* **131**, 977-88 (2006).
9. Visconti, P.E. et al. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* **53**, 133-50 (2002).
10. Harrison, R.A. & Gadella, B.M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* **63**, 342-51 (2005).
11. Wassarman, P.M. Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *J Cell Physiol* **204**, 388-91 (2005).
12. Schuffner, A.A. et al. Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Mol Hum Reprod* **8**, 722-7 (2002).
13. Arnoult, C. 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 U S A* **96**, 6757-62 (1999).
14. Chen, C.C. et al. Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca^{2+} channels. *Science* **302**, 1416-8 (2003).

15. Stamboulian, S. et al. Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the Ca_v3.1 (alpha1G) calcium channel: Ca_v3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. *J Cell Physiol* **200**, 116-24 (2004).
16. Lobley, A., Pierron, V., Reynolds, L., Allen, L. & Michalovich, D. Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 53 (2003).
17. Guzman-Grenfell, A.M. & Gonzalez-Martinez, M.T. Lack of voltage-dependent calcium channel opening during the calcium influx induced by progesterone in human sperm. Effect of calcium channel deactivation and inactivation. *J Androl* **25**, 117-22 (2004).
18. Walensky, L.D. & Snyder, S.H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol* **130**, 857-69 (1995).
19. De Blas, G. et al. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem* **277**, 49326-31 (2002).
20. Jungnickel, M.K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J.R. & Florman, H.M. Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* **3**, 499-502 (2001).
21. Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C. & Koentges, G. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* **295**, 1493-500 (2002).
22. Nilius, B. & Voets, T. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch* **451**, 1-10 (2005).
23. Bleil, J.D. & Wassarman, P.M. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zona pellucida possessing receptor activity for sperm. *Cell* **20**, 873-82 (1980).
24. Wassarman, P.M. Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **57**, 415-42 (1988).
25. Hughes, D.C. & Barratt, C.L. Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida? *Biochim Biophys Acta* **1447**, 303-6 (1999).
26. Bausek, N., Waclawek, M., Schneider, W.J. & Wohlrab, F. The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. *J Biol Chem* **275**, 28866-72 (2000).
27. Lefievre, L. et al. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod* **19**, 1580-6 (2004).

28. Swanson, W.J. & Vacquier, V.D. The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genet* **3**, 137-44 (2002).
29. Greve, J.M. & Wassarman, P.M. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol* **181**, 253-64 (1985).
30. Bleil, J.D., Greve, J.M. & Wassarman, P.M. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol* **128**, 376-85 (1988).
31. Mortillo, S. & Wassarman, P.M. Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development* **113**, 141-9 (1991).
32. Tsubamoto, H. et al. Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol Reprod* **61**, 1649-54 (1999).
33. Bleil, J.D. & Wassarman, P.M. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* **95**, 317-24 (1983).
34. Florman, H.M., Arnoult, C., Kazam, I.G., Li, C. & O'Toole, C.M. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* **59**, 12-6 (1998).
35. Rankin, T.L. et al. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell* **5**, 33-43 (2003).
36. Prasad, S.V., Wilkins, B., Skinner, S.M. & Dunbar, B.S. Evaluating zona pellucida structure and function using antibodies to rabbit 55 kDa ZP protein expressed in baculovirus expression system. *Mol Reprod Dev* **43**, 519-29 (1996).
37. Topper, E.K. et al. Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Mol Reprod Dev* **46**, 344-50 (1997).
38. Govind, C.K., Hasegawa, A., Koyama, K. & Gupta, S.K. Delineation of a conserved B cell epitope on bonnet monkey (*Macaca radiata*) and human zona pellucida glycoprotein-B by monoclonal antibodies demonstrating inhibition of sperm-egg binding. *Biol Reprod* **62**, 67-75 (2000).
39. Yurewicz, E.C., Sacco, A.G., Gupta, S.K., Xu, N. & Gage, D.A. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem* **273**, 7488-94 (1998).
40. Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P. & Striessnig, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 411-25 (2005).
41. Hofmann, F., Lacinova, L. & Klugbauer, N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **139**, 33-87 (1999).

42. Arnoult, C., Villaz, M. & Florman, H.M. Pharmacological properties of the T-type Ca^{2+} current of mouse spermatogenic cells. *Mol Pharmacol* **53**, 1104-11 (1998).
43. Lee, J.H., Gomora, J.C., Cribbs, L.L. & Perez-Reyes, E. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block $\alpha 1\text{H}$. *Biophys J* **77**, 3034-42 (1999).
44. Trevino, C.L. et al. Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca^{2+} channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett* **563**, 87-92 (2004).
45. Lievano, A., Bolden, A. & Horn, R. Calcium channels in excitable cells: divergent genotypic and phenotypic expression of $\alpha 1$ -subunits. *Am J Physiol* **267**, C411-24 (1994).
46. Santi, C.M., Darszon, A. & Hernandez-Cruz, A. A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am J Physiol* **271**, C1583-93 (1996).
47. Arnoult, C., Cardullo, R.A., Lemos, J.R. & Florman, H.M. Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13004-9 (1996).
48. Lopez-Gonzalez, I. et al. Calmodulin antagonists inhibit T-type $\text{Ca}^{(2+)}$ currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction. *Dev Biol* **236**, 210-9 (2001).
49. Cosens, D.J. & Manning, A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**, 285-7 (1969).
50. Wissenbach, U., Niemeyer, B.A. & Flockerzi, V. TRP channels as potential drug targets. *Biol Cell* **96**, 47-54 (2004).
51. Tsiokas, L. et al. Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3934-9 (1999).
52. Montell, C. et al. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* **9**, 229-31 (2002).
53. Trevino, C.L., De la Vega-Beltran, J.L., Nishigaki, T., Felix, R. & Darszon, A. Maitotoxin potently promotes Ca^{2+} influx in mouse spermatogenic cells and sperm, and induces the acrosome reaction. *J Cell Physiol* **206**, 449-56 (2006).
54. Roe, M.W. et al. Characterization of a Ca^{2+} release-activated nonselective cation current regulating membrane potential and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in transgenically derived beta-cells. *J Biol Chem* **273**, 10402-10 (1998).
55. Brereton, H.M., Chen, J., Rychkov, G., Harland, M.L. & Barritt, G.J. Maitotoxin activates an endogenous non-selective cation channel and is an effective initiator of the activation of the heterologously expressed hTRPC-1 (transient receptor potential)

- non-selective cation channel in H4-IIIE liver cells. *Biochim Biophys Acta* **1540**, 107-26 (2001).
56. Chen, J. & Barritt, G.J. Evidence that TRPC1 (transient receptor potential canonical 1) forms a Ca²⁺-permeable channel linked to the regulation of cell volume in liver cells obtained using small interfering RNA targeted against TRPC1. *Biochem J* **373**, 327-36 (2003).
 57. Putney, J.W., Jr. Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol Interv* **1**, 84-94 (2001).
 58. Yuan, J.P., Zeng, W., Huang, G.N., Worley, P.F. & Muallem, S. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* **9**, 636-45 (2007).
 59. Quill, T.A., Ren, D., Clapham, D.E. & Garbers, D.L. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12527-31 (2001).
 60. Ren, D. et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**, 603-9 (2001).
 61. Carlson, A.E. et al. CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14864-8 (2003).
 62. Quill, T.A. et al. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14869-74 (2003).
 63. Baldi, E., Luconi, M., Muratori, M. & Forti, G. A novel functional estrogen receptor on human sperm membrane interferes with progesterone effects. *Mol Cell Endocrinol* **161**, 31-5 (2000).
 64. Blackmore, P.F., Beebe, S.J., Danforth, D.R. & Alexander, N. Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem* **265**, 1376-80 (1990).
 65. Meizel, S., Turner, K.O. & Nuccitelli, R. Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev Biol* **182**, 67-75 (1997).
 66. Meizel, S. Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. *Biol Reprod* **56**, 569-74 (1997).
 67. Shi, Q.X., Yuan, Y.Y. & Roldan, E.R. gamma-Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **3**, 677-83 (1997).
 68. Wistrom, C.A. & Meizel, S. Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl⁻ channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev Biol* **159**, 679-90 (1993).

69. Sato, Y., Son, J.H. & Meizel, S. The mouse sperm glycine receptor/chloride channel: cellular localization and involvement in the acrosome reaction initiated by glycine. *J Androl* **21**, 99-106 (2000).
70. Sato, Y., Son, J.H., Tucker, R.P. & Meizel, S. The zona pellucida-initiated acrosome reaction: defect due to mutations in the sperm glycine receptor/Cl⁽⁻⁾ channel. *Dev Biol* **227**, 211-8 (2000).
71. Lax, Y., Rubinstein, S. & Breitbart, H. Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm. *FEBS Lett* **339**, 234-8 (1994).
72. Foresta, C., Rossato, M., Chiozzi, P. & Di Virgilio, F. Mechanism of human sperm activation by extracellular ATP. *Am J Physiol* **270**, C1709-14 (1996).
73. Luria, A., Rubinstein, S., Lax, Y. & Breitbart, H. Extracellular adenosine triphosphate stimulates acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa via P2 purinoceptor. *Biol Reprod* **66**, 429-37 (2002).
74. Huo, L.J. & Yang, Z.M. Effects of platelet activating factor on capacitation and acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **56**, 436-40 (2000).
75. Kordan, W., Strzerek, J. & Fraser, L. Functions of platelet activating factor (PAF) in mammalian reproductive processes: a review. *Pol J Vet Sci* **6**, 55-60 (2003).
76. Sengoku, K. et al. Involvement of protein kinases in platelet activating factor-induced acrosome reaction of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **2**, 401-4 (1996).
77. Son, J.H. & Meizel, S. Evidence suggesting that the mouse sperm acrosome reaction initiated by the zona pellucida involves an alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Biol Reprod* **68**, 1348-53 (2003).
78. Roldan, E.R., Murase, T. & Shi, Q.X. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* **266**, 1578-81 (1994).
79. Kim, K.S. & Gerton, G.L. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev Biol* **264**, 141-52 (2003).
80. van Duin, M. et al. Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod* **51**, 607-17 (1994).
81. Brewis, I.A., Clayton, R., Barratt, C.L., Hornby, D.P. & Moore, H.D. Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **2**, 583-9 (1996).
82. Bray, C., Son, J.H., Kumar, P., Harris, J.D. & Meizel, S. A role for the human sperm glycine receptor/Cl⁽⁻⁾ channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. *Biol Reprod* **66**, 91-7 (2002).

83. Chakravarty, S., Suraj, K. & Gupta, S.K. Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Mol Hum Reprod* **11**, 365-72 (2005).
84. Martic, M. et al. Recombinant human zona pellucida proteins ZP1, ZP2 and ZP3 co-expressed in a human cell line. *Asian J Androl* **6**, 3-13 (2004).
85. Caballero-Campo, P. et al. Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biol Reprod* **74**, 760-8 (2006).
86. Maymon, B.B. et al. Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. *J Reprod Fertil* **102**, 81-6 (1994).
87. Jimenez-Movilla, M. et al. Carbohydrate analysis of the zona pellucida and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry. *Hum Reprod* **19**, 1842-55 (2004).
88. González-González, M.E. Inducción de la reacción acrosomal por proteínas recombinantes de la zona pelúcida en espermatozoides humanos: papel de los carbohidratos. Universidad Nacional Autónoma de México (2007).
89. WHO. *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, 128 (Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press, Cambridge, U. K.; New York, N. Y., 1999).
90. Makler, A. et al. Improved techniques for collecting motile spermatozoa from human semen. I. A self-migratory method. *Int J Androl* **7**, 61-70 (1984).
91. Darszon, A., Lopez-Martinez, P., Acevedo, J.J., Hernandez-Cruz, A. & Trevino, C.L. T-type Ca^{2+} channels in sperm function. *Cell Calcium* **40**, 241-52 (2006).
92. Lievano, A. et al. T-type Ca^{2+} channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* **388**, 150-4 (1996).
93. Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. in *The physiology of reproduction*, Vol. I (ed. Press, R.) 189-317 (New York, 1994).
94. Florman, H.M. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{2+} are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol* **165**, 152-64 (1994).
95. Park, J.Y. et al. Molecular identification of Ca^{2+} channels in human sperm. *Exp Mol Med* **35**, 285-92 (2003).
96. Goodwin, L.O. et al. Alternative splicing of exons in the alpha1 subunit of the rat testis L-type voltage-dependent calcium channel generates germ line-specific dihydropyridine binding sites. *Mol Hum Reprod* **4**, 215-26 (1998).

97. Vannier, B. et al. Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca^{2+} entry channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2060-4 (1999).
98. Castellano, L.E. et al. Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett* **541**, 69-74 (2003).
99. Rossato, M., Di Virgilio, F., Rizzuto, R., Galeazzi, C. & Foresta, C. Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol Hum Reprod* **7**, 119-28 (2001).
100. Dragileva, E., Rubinstein, S. & Breitbart, H. Intracellular $\text{Ca}^{(2+)}\text{-Mg}^{(2+)}\text{-ATPase}$ regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod* **61**, 1226-34 (1999).
101. Trevino, C.L. et al. Localisation of inositol trisphosphate and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: possible functional implications. *Zygote* **6**, 159-72 (1998).
102. Hoth, M. & Penner, R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**, 353-6 (1992).
103. Brandelli, A., Miranda, P.V. & Tezon, J.G. Voltage-dependent calcium channels and G_i regulatory protein mediate the human sperm acrosomal exocytosis induced by N-acetylglucosaminyl/mannosyl neoglycoproteins. *J Androl* **17**, 522-9 (1996).
104. Blackmore, P.F. & Eisoldt, S. The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-type calcium channels in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **5**, 498-506 (1999).
105. O'Toole, C.M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R.A. & Florman, H.M. $\text{Ca}^{(2+)}$ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* **11**, 1571-84 (2000).
106. Ni, Y. et al. Acrosome reaction induced by recombinant human zona pellucida 3 peptides rhuZP3a22 approximately 176 and rhuZP3b177 approximately 348 and their mechanism. *J Androl* **28**, 381-8 (2007).
107. Glossmann, H. & Striessnig, J. Calcium channels. *Vitam Horm* **44**, 155-328 (1988).
108. Hockerman, G.H., Johnson, B.D., Abbott, M.R., Scheuer, T. & Catterall, W.A. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment III S6 and the pore region of the α_1 subunit. *J Biol Chem* **272**, 18759-65 (1997).
109. Baibakov, B., Gauthier, L., Talbot, P., Rankin, T.L. & Dean, J. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* **134**, 933-43 (2007).

110. Herrick, S.B. et al. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol* **202**, 663-71 (2005).
111. Delmas, P. Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell* **118**, 145-8 (2004).
112. Barritt, G. & Rychkov, G. TRPs as mechanosensitive channels. *Nat Cell Biol* **7**, 105-7 (2005).
113. Benoff, S. Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod* **3**, 599-637 (1997).
114. Cross, N.L. & Meizel, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* **41**, 635-41 (1989).