



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Biotecnología

**Caracterización de la Cascada de Señalización Celular de la
Reacción Acrosomal en Espermatozoides de Humano.**

TESIS

**Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Bioquímicas.**

Presenta: Alejandra Solís López.

**Tutora: Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz.
Laboratorio del Dr. Alberto Darszon.**

Sinodales:

**Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay
Dr. Christopher Wood**

Miembros del Comité evaluador:

**Dr. Juan Enrique Morett Sánchez
Dr. Ignacio López González
Dra. Liliana Pardo López
Dr. Ernesto Ortiz Suri**

Noviembre del 2010



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.

*A mi familia: Pedro, Blanca y Adriana
por su amor y apoyo incondicional.*

Agradecimientos

A la Dra. Claudia Treviño, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, consejos y afecto.

A mis sinodales, Dr. Carlos Muñoz y Dr. Christopher Wood, por su importante aporte y participación en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Alberto Darszon, Dr. Takuya Nishigaki y Dra. Carmen Beltrán, por permitirme formar parte de su grupo de investigación y contribuir a mi formación como científica.

A los miembros de mi Comité evaluador: Dr. Juan Enrique Morett Sánchez, Dr. Ignacio López González, Dra. Liliana Pardo López y Dr. Ernesto Ortiz Suri, por sus valiosos comentarios para mejorar este trabajo.

A Guillermo Santamaría Bonfil, por su amor, consejos y apoyo incondicional.

A mis amigos por su apoyo incondicional y compartir conmigo tantas aventuras y experiencias.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo, consejos y enseñanzas.

Índice

Índice de Figuras y Tabla.....	6
Abreviaturas.....	9
Resumen.....	12
I. Introducción.....	13
A. Espermatogénesis.....	14
B. Estructura de los espermatozoides humanos.....	14
C. Estructura de los óvulos humanos.....	16
D. Fecundación.....	18
E. Eventos indispensables para que ocurra la fecundación en mamíferos.....	19
F. Modelo propuesto de la vía de señalización que ocurre durante la reacción acrosomal.....	24
II. Antecedentes.....	30
III. Hipótesis.....	32
IV. Objetivos.....	32
V. Metodología.....	32
A. Reactivos y soluciones.....	32
B. Obtención de espermatozoides.....	33
C. Incorporación del indicador fluorescente.....	34
D. Medición del cambio de la $[Ca^{2+}]_i$	35
E. Medición de la reacción acrosomal.....	36
F. Condiciones experimentales.....	39
G. Interpretación de datos.....	39
VI. Resultados.....	42
A. El OMecAMP induce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides de humano maduros.....	42
B. Determinación de la EC_{50} del OMecAMP en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ e inducción de la reacción acrosomal en los espermatozoides de humano maduros.....	43
C. La respuesta inducida por OMecAMP es independiente del proceso de capacitación.....	45

D. La magnitud de la respuesta inducida por OMecAMP depende de la $[Ca^{2+}]$ extracelular.....	47
E. Adiciones Sucesivas de OMecAMP y Progesterona en 2mM de Ca^{2+} externo.....	48
F. La PKA no participa en la vía de señalización inducida por OMecAMP.....	50
G. Los canales tipo SOC participan en la vía de señalización inducida por OMecAMP y Progesterona.....	53
H. Los IP_3R participan en la vía de señalización inducida por OMecAMP y Progesterona.....	60
I. Los RyR no participan en la vía de señalización inducida por OMecAMP ni Progesterona.....	62
J. Los TPC participan en la vía de señalización inducida por OMecAMP y Progesterona.....	64
K. Los canales Ca_v no participan en la vía de señalización inducida por OMecAMP y Progesterona.....	66
L. Canales implicados en la RA inducida por OMecAMP.....	68
VII. Discusión.....	70
VIII. Conclusiones.....	77
IX. Perspectivas.....	78
X. Bibliografía.....	79

Índice de Figuras y Tabla

Figura 1. Estructura del espermatozoide humano.....	11
Figura 2. Estructura del óvulo humano.....	12
Figura 3. Aparato reproductor femenino de los mamíferos y posibles mecanismos que guían a los espermatozoides.....	12
Figura 4. Reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero.....	12
Figura 5. Modelo de la cascada de señalización celular durante la reacción acrosomal.....	17
Figura 6. Estructura química del cAMP y del 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP.....	18
Figura 7. Propiedades moleculares de Epac1 y Epac2.....	19
Figura 8. Epac podría inducir un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ mediante dos mecanismos distintos.....	19
Figura 9. Metodología para la obtención de espermatozoides maduros cargados con el colorante Fluo3-AM.....	24
Figura 10. Esquema del espectrofluorómetro.....	25
Figura 11. Protocolos para probar la inhibición de la respuesta inducida por OMecAMP.....	27
Figura 12. Tinción de espermatozoides con FITC-PSA.....	27
Figura 13. Definición de las deltas parciales.....	27
Figura 14. Dinámica espacio-temporal del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ después de la adición de 30 μ M de OMecAMP.....	27
Figura 15. La EC_{50} de OMecAMP en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en 2mM de Ca^{2+} externo es $\sim 2\mu$ M.....	27
Figura 16. La EC_{50} de OMecAMP en la inducción de la RA en 2mM de Ca^{2+} externo es $\sim 15\mu$ M.....	27
Figura 17. La respuesta inducida por OMecAMP es independiente del proceso de capacitación.....	27
Figura 18. La magnitud del incremento de Ca^{2+} inducido por OMecAMP y Pg depende de la $[Ca^{2+}]$ externo.....	27
Figura 19. Adiciones Sucesivas de OMecAMP y Pg en 2mM de Ca^{2+} externo.....	27
Figura 20. El H-89 no inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca^{2+} externo.....	27

Figura 21. El RpcAMP no inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 22. El H-89 no inhibe la respuesta inducida por OMecAMP pero si inhibe la respuesta inducida por Pg en bajo Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 23. El RpcAMP no inhibe la respuesta inducida por OMecAMP pero si inhibe la respuesta inducida por Pg en bajo Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 24. El SKF no inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 25. El SKF inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en bajo Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 26. El 2APB inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 27. El 2APB inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en bajo Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 28. El Gd ³⁺ inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 29. El Gd ³⁺ inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en bajo Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 30. Los IP ₃ R participan en la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 31. Los IP ₃ R participan en la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en bajo Ca ²⁺ externo	27
Figura 32. Los RyR no participan en la respuesta inducida por OMecAMP ni Pg en 2mM de Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 33. Los RyR no participan en la respuesta inducida por OMecAMP ni Pg en bajo Ca ²⁺ externo	27
Figura 34. Los TPCs participan en la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca ²⁺	27
Figura 35. Los TPCs participan en la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en bajo Ca ²⁺ externo	27
Figura 36. La Nifedipina no inhibe la respuesta inducida por OMecAMP ni Pg en 2mM de Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 37. El Mibefradil no inhibe la respuesta inducida por OMecAMP ni Pg en 2mM de Ca ²⁺ externo.....	27
Figura 38. Inducción de la RA por OMecAMP en presencia de SKF, 2APB y Gd ³⁺ en 2mM de Ca ²⁺ externo.....	27

Figura 39. Inducción de la RA por OMecAMP en presencia de XC y Ned19 en 2mM de Ca^{2+} externo	27
Tabla1 Inhibidores empleados en este trabajo.....	28

Abreviaturas

[Ca²⁺]_i	Concentración de Ca ²⁺ intracelular
2APB	2-Aminoetildifenil Borano
A	Acrosoma
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albúmina Sérica Bovina (del inglés, "Bovine Serum Albumin").
cAMP	Monofosfato Cíclico de Adenosina (del inglés, "Cyclic Adenosine Monophosphate")
CatSper	Canal Catiónico del Espermatozoide (del inglés, "Cation Channel of Sperm")
Ca_v	Canal de Ca ²⁺ modulado por Voltaje (del inglés, "Voltage-sensitive Calcium channel")
CFTR	Regulador transmembranal de la conductancia de la fibrosis quística (del inglés, "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator")
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetil Sulfóxido
Em	Potencial de membrana
ENaC	Canales Epiteliales de Na ⁺ (del inglés, "Epithelial Na ⁺ Channels")
Epac	Proteína intercambiadora directamente activada por cAMP (del inglés, "Exchange protein directly activated by cAMP")
ER	Retículo Endoplásmico (del inglés, "Endoplasmic Reticulum")
ES	Error estándar
H-89	H-89 Dihidrocloruro Hidratado
HVA	Canal de Alto Umbral de Activación (del inglés, "High Voltage-activated Channel")
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato (del inglés, "Inositol 1,4,5-trisphosphate")
K_{ATP}	Canales de K ⁺ Rectificadores dependientes de ATP
LVA	Canal de Bajo Umbral de Activación (del inglés, "Low Voltage-

	Activated Channel")
MA_e	Membrana Acrosomal externa
MA_i	Membrana Acrosomal interna
Mb	Mibefradil
MP	Membrana Plasmática
MRH	Medio de Registro para espermatozoides Humanos
NAADP	Nicotinamida Ácida Adenina Dinucleótido Fosfato (del inglés, "Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate")
Nf	Nifedipina
NO	Óxido Nítrico
NSF	Factor sensible a N-etilmaleimida
OMecAMP	8-pCPT-2'-O-Me-cAMP
Pg	Progesterona
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-difosfato (del inglés, "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate")
PKA	Proteína Cinasa A (del inglés, "Protein Kinase A")
PKT	Proteína Tirosincinasa (del inglés, "Protein Tyrosine Kinase")
PLC-ε	Fosfolipasa C-ε (del inglés, "Phospholipase C-ε")
RA	Reacción Acrosomal
RpcAMP	Rp-3',5'-Adenosín monofosfato cíclico trietilamonio (del inglés, "Rp-Adenosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate triethylammonium salt hydrate")
RyR	Receptor de Rianodina
sAC	Adenilato Ciclasa soluble (del inglés, "Soluble Adenylate Cyclase")
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del Retículo Sarcoplásmico y Endoplásmico (del inglés "Sarcoplasmic/Endoplasmic-reticulum Ca ²⁺ -ATPase")
SKF	SK&F 96364
SNARE	Proteínas Receptoras de Unión a NSF Soluble (del inglés, "Soluble NSF Attachment Protein Receptors")
SOC	Canal Operado por Poza (del inglés, "Store Operated Channel")

Tx-100	TritónX-100
TPC	Canales de Dos Poros (del inglés, "Two Pore Channel")
TRP	Receptor de Potencial Transitorio (del inglés, "Transient Receptor Potential")
XC	Xestopongina-C
ZP	Zona Pelúcida
ZP3	Glicoproteína 3 de la Zona Pelúcida

Resumen

A pesar de que la reacción acrosomal (RA) es un evento fundamental para la fertilización, la vía de señalización implicada en este proceso no se conoce por completo. La inducción fisiológica de la RA provoca un aumento de Ca^{2+} bifásico. Sin embargo, las entidades moleculares implicadas en este proceso no han sido claramente identificadas. Un modelo de la vía de señalización de la RA propone la participación de Epac (del inglés, "Exchange protein directly activated by cAMP"). Especulamos que Epac activa dos vías de señalización paralelas; una vía que activa a la maquinaria de fusión de membranas (proteínas SNARES) y otra vía que induce un aumento en la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Finalmente las dos vías de señalización convergen para concluir el proceso de la RA. En este trabajo empleamos un análogo del cAMP denominado 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (OMecAMP), que activa específicamente a Epac y caracterizamos este proceso utilizando dos métodos: 1) Midiendo el cambio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides cargados con un indicador fluorescente sensible a Ca^{2+} y 2) Evaluando el porcentaje de inducción de la RA en presencia o ausencia de inhibidores específicos para evaluar la participación de ciertas entidades moleculares en la vía de señalización. Nuestros resultados sugieren que los canales tipo SOC, TPC y los IP_3R están implicados en la vía de señalización inducida por Epac.

I. Introducción

La reproducción sexual es un proceso biológico altamente modulado. El resultado es una nueva célula que contiene los cromosomas de los dos gametos, posteriormente ésta célula da lugar a un nuevo organismo genéticamente único. A pesar de que éste es un proceso del cual depende la perpetuidad de la especie, aún no se han dilucidado por completo muchos de los eventos que lo regulan.

En los mamíferos se han descrito tres eventos que son indispensables para que ocurra la fecundación: la activación de la motilidad, la capacitación y la reacción acrosomal (RA). La activación de la motilidad ocurre cuando los espermatozoides del epidídimo se eyaculan en el tracto femenino. Conforme los espermatozoides se desplazan a lo largo del tracto genital femenino, para llegar finalmente al ámpula (lugar del oviducto donde ocurre la fecundación), desarrollan un conjunto de cambios denominados capacitación. Estos cambios son indispensables para que el espermatozoide adquiera la capacidad de fecundar al óvulo, ya que solamente los espermatozoides que se han capacitado pueden llevar a cabo la RA. La RA es un proceso que involucra la fusión de la membrana plasmática (MP) y la membrana externa del acrosoma (MA_e) del espermatozoide, en este proceso se liberan enzimas hidrolíticas que le permiten al espermatozoide atravesar la matriz extracelular del óvulo, denominada zona pelúcida (ZP). De tal forma, que la MP del espermatozoide pueda tener contacto con la MP del óvulo y se puedan fusionar [1, 2]. A pesar de que la RA es esencial en la fecundación, aún no se conocen con detalle todas las entidades moleculares y las cascadas de señalización que están involucradas en este proceso. El presente proyecto tiene la intención de caracterizar algunas de las proteínas que participan en la cascada de señalización de la RA en espermatozoides de humano.

En este año se reportó que el 15% de las parejas en el mundo son infértiles y el 50% de los casos se deben a infertilidad masculina. En más de la mitad de los casos de infertilidad se desconoce la causa [3]. El estudio de la fisiología del espermatozoide es importante para ayudar a entender y resolver

las causas de infertilidad, además de contribuir en el desarrollo de un anticonceptivo masculino. Un fármaco que inhiba de forma específica una entidad molecular que sea indispensable para la fertilización y que no se encuentre en ningún otro tipo celular sería deseable, ya que reduciría la probabilidad de tener efectos secundarios.

A. Espermatogénesis

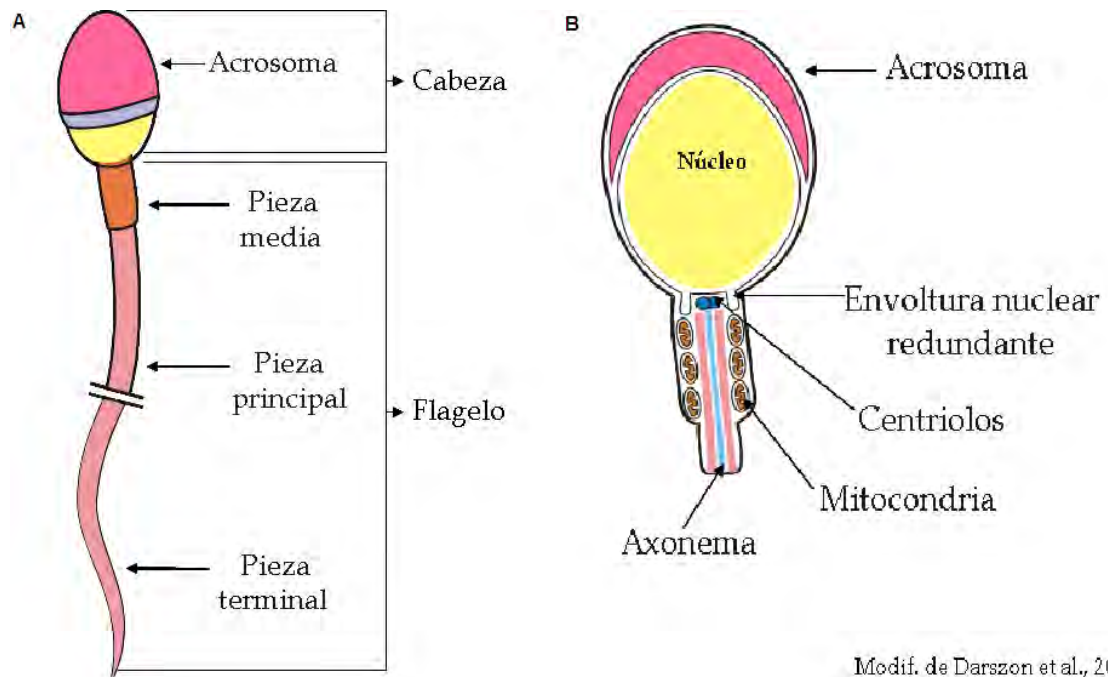
La espermatogénesis es el proceso mediante el cual se da la diferenciación y maduración de los gametos masculinos que se denominan espermatozoides. En mamíferos este proceso se lleva a cabo en los túbulos seminíferos que se encuentran en los testículos. En estos túbulos se encuentran las células llamadas espermatogonias, las cuales proliferan continuamente por mitosis, hasta que el organismo alcanza su madurez sexual y entonces estas células dejan de proliferar, aumentan su tamaño y se diferencian en espermatoцитos de primer orden. En estos últimos se produce la meiosis I que da lugar a dos espermatoцитos de segundo orden, los cuales desarrollan la meiosis II que finalmente resulta en la producción de cuatro espermátidas [4, 5].

Las espermátidas son células haploides que se diferencian en espermatozoides: durante la diferenciación, entre otros cambios, se observa una reducción en el volumen del citoplasma, compactación del ADN (ácido desoxirribonucleico), se forma la cabeza del espermatozoide y las mitocondrias se agrupan en la pieza media del flagelo de la célula (ver Figura 1). Posteriormente, los espermatozoides se desplazan al epidídimo, donde completan su proceso de maduración y adquieren la capacidad de moverse [6].

B. Estructura de los espermatozoides de humano.

El espermatozoide de humano mide aproximadamente 55 μm de largo y la estructura de la célula se puede dividir en dos partes; la cabeza (con forma ovalada) y el flagelo, que a su vez se divide en la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Figura 1). En la cabeza se encuentran los 23 cromosomas condensados, dos centriolos y dos organelos, el acrosoma y la envoltura nuclear redundante (ENR), que funcionan como pozas de Ca^{2+} . El acrosoma se origina a partir del aparato de Golgi y contiene enzimas hidrolíticas que le permiten al espermatozoide penetrar al óvulo durante la fecundación [6]. La ENR se forma durante la espermatogénesis a partir del excedente de envoltura nuclear, que resulta de la condensación de la cromatina [7]. Se piensa que este organelo, además de funcionar como reservorio de Ca^{2+} , también está encargado de la degradación de nucleoproteínas durante etapas tardías de la espermatogénesis [8]. El flagelo es una estructura que está involucrada en la motilidad del espermatozoide, en el cual se encuentra el axonema, maquinaria que se requiere para el desplazamiento del espermatozoide. En la pieza media del flagelo se encuentran las mitocondrias que proporcionan la energía necesaria para el funcionamiento del espermatozoide [6].

Los espermatozoides carecen de ribosomas, retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Por esta razón, se propone que toda las proteínas que requiere el espermatozoide para funcionar apropiadamente son sintetizadas en etapas previas de diferenciación celular [9].



Modif. de Darszon et al., 2005

Figura1. Estructura del espermatozoide humano. A) El espermatozoide se puede dividir en dos partes; la cabeza y el flagelo, que a su vez se divide en la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. B) Corte transversal de la cabeza y de la pieza media del espermatozoide [1].

C. Estructura de los óvulos de humano.

El óvulo es el gameto femenino, ésta célula mide aproximadamente 100 μm de diámetro. Está constituido por un núcleo, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico (ER), gránulos corticales y rodeado por la zona pelúcida (ZP), que es la matriz extracelular (Figura 2). El óvulo necesita prepararse para poder desarrollarse en un nuevo organismo una vez sea fecundado por lo que debe acumular energía y aumentar su tamaño. El óvulo le proporciona al embrión la mayor parte del material que necesita para su desarrollo, como por ejemplo: proteínas, ribosomas, ácidos desoxiribonucleicos mensajeros y factores morfogénicos. Además, las mitocondrias del nuevo embrión van a ser heredadas casi exclusivamente del óvulo [10].

El óvulo humano está rodeado por capas de células denominadas en conjunto como *cumulus*. A la capa que está directamente en contacto con la ZP se le denomina corona radiata. Cuando el óvulo se libera de los ovarios

algunas células del *cumulus* siguen rodeando al óvulo, juntos se transportan a través del oviducto mediante la actividad de los cilios y contracciones musculares del oviducto, hasta llegar al ámpula (región del oviducto donde ocurre la fecundación) [11].

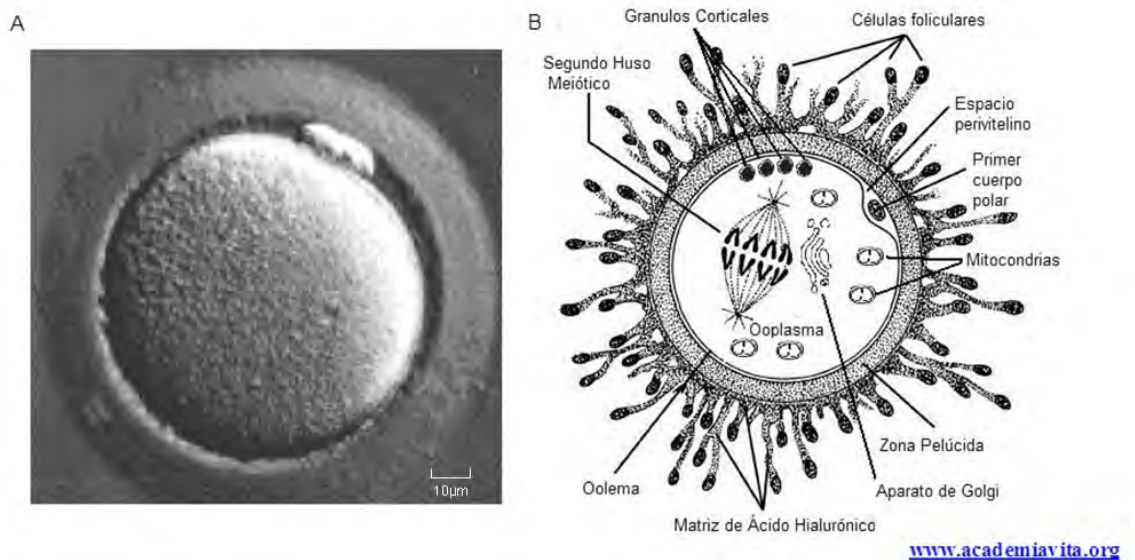


Figura 2. Estructura del óvulo humano. En el panel A se muestra una imagen de contraste de fase de un óvulo humano que se encuentra detenido en la meiosis II. En el panel B se muestra un esquema de las principales estructuras celulares que conforman al óvulo.

La ZP es la matriz extracelular que recubre a los óvulos de los mamíferos y tiene un espesor de 1 a 25 µm, dependiendo de la especie. La ZP de la mayoría de los mamíferos está constituida principalmente por cuatro glicoproteínas: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4. La ZP del ratón es la más estudiada, sin embargo, esta matriz extracelular sólo contiene tres glicoproteínas. La ZP1 se encarga de mantener la estructura de la ZP [12]. La ZP3 es la glicoproteína que une e induce la RA en el espermatozoide [13]. Se ha propuesto que el espermatozoide se puede unir a la ZP2 una vez que ha finalizado la RA [14, 15]. Recientemente se ha descrito que la ZP4 también induce la RA [16]. Cuando un espermatozoide fecunda al óvulo ocurre una modificación en la ZP, de tal forma que otro espermatozoide que se encuentre cerca del óvulo ya no pueda unirse a la ZP. Por lo tanto, esta modificación de la ZP es importante para evitar la polispermia en mamíferos [17].

D. Fecundación

La fecundación es la fusión del gameto femenino y el gameto masculino para dar lugar a una célula denominada cigoto [18]. En el caso del ratón, la fecundación ocurre pocas horas después de la eyaculación, en cambio en humanos puede ocurrir hasta 6 días después [11]. Para que la fecundación se lleve a cabo se requiere una fina comunicación entre el espermatozoide y el óvulo [6].

La fecundación en mamíferos es interna, es decir, los machos eyaculan los espermatozoides directamente en la vagina de la hembra. A continuación, los espermatozoides tienen que trasladarse desde la vagina hasta el cuello uterino (es la parte más baja del útero que se proyecta dentro de la vagina). Posteriormente las contracciones musculares del útero transportan a los espermatozoides al oviducto, a partir de ahí, el espermatozoide se tiene que desplazar hasta el ampulla. Se ha propuesto que esto lo hace mediante termo y quimiotaxis y que la progesterona (Pg) podría ser uno de los quimio-atrayentes (Figura 3) [19]. En mamíferos, el espermatozoide fecunda al óvulo cuando éste se encuentra en la metafase de la meiosis II y esto activa al óvulo para concluir la meiosis y finalmente los pronúcleos de los dos gametos se fusionan [11]. El mecanismo preciso de la fusión de la MP del espermatozoide y del óvulo no ha sido claramente descrito, se ha reportado que las proteínas IZUMO1 [20] y SPESP1 (del inglés, "Sperm Equatorial Segment Protein") en el espermatozoide y CD9 en el óvulo, son indispensables para que ocurra la fertilización [21].

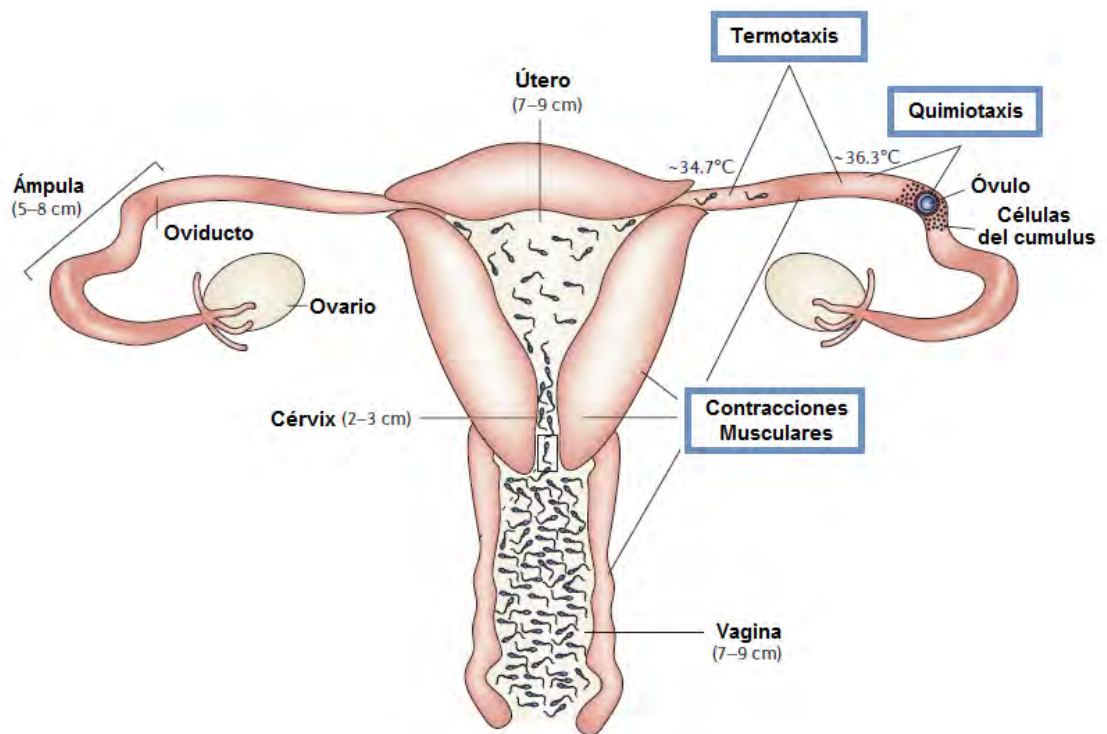


Figura 3. Aparato reproductor femenino de los mamíferos y posibles mecanismos que guían a los espermatozoides al ampulla. Se muestran las principales estructuras que forman parte del aparato reproductor femenino de los mamíferos, el trayecto y los tres mecanismos que guían a los espermatozoides al ampulla (zona del oviducto donde se lleva a cabo la fecundación) [22].

E. Eventos indispensables para que ocurra la fecundación en mamíferos.

Activación de la motilidad.

Los espermatozoides que se encuentran en los testículos son inmaduros y no tienen motilidad. Posteriormente abandonan el testículo para continuar su maduración en el epidídimo, donde adquieren la capacidad de moverse. Cuando los espermatozoides son eyaculados en el tracto genital femenino se activa la motilidad a consecuencia del pH más alcalino del tracto reproductor femenino. Asimismo, durante la activación de la motilidad, se ha reportado aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en el espermatozoide [6].

Cuando la curvatura del flagelo es simétrica, rápida y con una amplitud pequeña, se le denomina movilidad activada. Posteriormente, el batido del flagelo se vuelve asimétrico, lento y con una mayor amplitud, este nuevo tipo de movimiento ondular caracteriza a la movilidad hiperactivada. Se piensa que la movilidad hiperactivada es importante para que el espermatozoide pueda desplazarse a través del oviducto, ya que es un ambiente viscoso. Además se ha visto que los espermatozoides que no presentan una movilidad hiperactivada se mantienen adheridos en el epitelio. Esto sugiere que la hiperactivación permite que los espermatozoides se despeguen del epitelio y puedan desplazarse hasta el ampulla [23]. También se propone que este tipo de movilidad es necesaria para que el espermatozoide pueda penetrar las capas externas del óvulo, entre otras funciones [24].

Capacitación.

Al conjunto de cambios bioquímicos, moleculares y fisiológicos que el espermatozoide maduro desarrolla durante su tránsito por el tracto reproductor femenino para poder fecundar al óvulo se le denomina capacitación. Durante la capacitación se observan diferentes cambios en los espermatozoides, entre los que destacan: disminución del colesterol en la MP, aumento del pH intracelular (pH_i), fosforilación de proteínas, aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, aumento de Cl^- intracelular y una hiperpolarización de la MP [1, 25, 26]. No se conoce con certeza cuáles son todas las entidades moleculares que causan todos estos cambios durante la capacitación y cómo se sincronizan entre ellos. Sin embargo, se sabe que la participación de los canales CFTR (del inglés, Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) [27-29] y los canales ENAC (del inglés, "Epithelial Sodium Channels") [30], [31, 32] son indispensables para que los espermatozoides de ratón y de humano se capaciten y fertilicen al óvulo.

Otros de los cambios que ocurren durante la capacitación son rearrreglos en la cantidad y distribución de los lípidos de la membrana. Por ejemplo, hay un notable decremento de la cantidad de fosfatidilcolina. También se ha observado que la proporción colesterol/fosfolípidos disminuye después de la capacitación.

Se sabe que la albúmina remueve el colesterol de la PM, lo que ocasiona cambios en su fluidez [6, 33].

La activación de un simporter que introduce Na^+ y HCO_3^- a la célula podría ser el responsable del aumento del pH_i . El HCO_3^- que entra a la célula activa directamente a la adenilato ciclasa soluble (se ha reportado que esta enzima también es activada por Ca^{2+} [34]). La cual transforma al ATP en cAMP. El cAMP tiene diversos blancos, pero se ha propuesto que activa a la proteína cinasa A (PKA) desencadenando una serie de eventos aún desconocidos para que finalmente se active la proteína tirosin cinasa (PKT), la cual fosforila a proteínas específicas [35].

La capacitación es un requisito indispensable para que un espermatozoide fecunde al óvulo. Solamente ~10% de una población de espermatozoides humanos se capacitan *in vitro* [22]. El tiempo que tardan los espermatozoides en capacitarse *in vivo* es variable (desde horas hasta días). Por ejemplo, los espermatozoides que pasan del útero al oviducto se capacitan más rápido que los espermatozoides que se quedan en el útero [6].

Reacción acrosomal

La RA es un evento excitotico que, como ya se había mencionado, involucra la fusión de MP y la MA_e , liberando así enzimas hidrolíticas que ayudan al espermatozoide a penetrar al óvulo. Se piensa que el inductor fisiológico de este proceso es la ZP3. Sin embargo, se ha probado que otros compuestos presentes en el tracto genital femenino también inducen la RA, como por ejemplo: la Pg y el NO (óxido nítrico) [36].

Para poder caracterizar la RA adecuadamente se requiere contar con el inductor fisiológico o compuestos análogos que activen las mismas vías de señalización que la ZP3. En humanos es muy difícil obtener la ZP3, principalmente por razones éticas. Además, cuando esto se puede lograr de cadáveres u ovocitos excedentes de fecundación asistida, la cantidad de ZP3 que se puede recuperar a partir de ellos es insuficiente. Por otro lado, las

proteínas recombinantes de ZP (rhZP) han mostrado ser una herramienta valiosa para estudiar la inducción de la RA [15]. Sin embargo, estas proteínas recombinantes no siempre son equivalentes a las proteínas nativas [15, 37]. Por ejemplo, cuando se expresa las proteínas rhZP3 y rhZP2 en óvulos de ratón, los espermatozoides de humano no se unen ni fecundan estos óvulos. En cambio, los espermatozoides de ratón sí se unen y son capaces de fecundar estos óvulos [38]. Por lo tanto, contar con agonistas alternativos de la RA, como la Pg, es de gran utilidad para caracterizar este fenómeno.

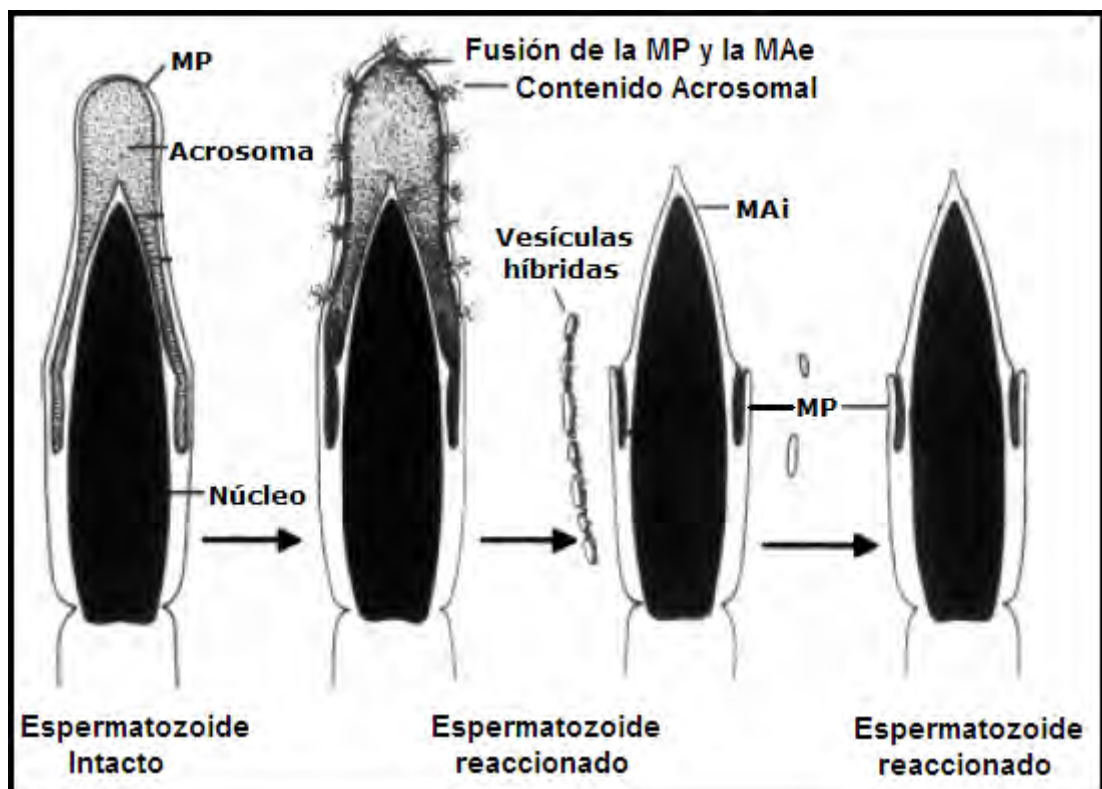


Figura 4. Reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero. En la figura se muestra un espermatozoide intacto (presencia de acrosoma) que lleva a cabo la RA. Durante este proceso la MP y la MAe se fusionan en diferentes puntos de la cabeza del espermatozoide, dando lugar a las vesículas híbridas. Al concluir este proceso la MAi queda expuesta al medio extracelular. MP= Membrana Plasmática, MA= Membrana Acrosoma, MAe= MA externa, MAi= MA interna. Figura modificada de [2].

Hasta la fecha, se desconoce al receptor de la ZP3 que desencadena la RA en el espermatozoide. Entre otros, se ha propuesto que la β 1,4-galactosiltransferasa actúa como su receptor [39], no obstante, el ratón nulo

para esta proteína es capaz de desarrollar la RA. Esto sugiere que la β 1,4-galactosiltransferasa no es su receptor o que existe más de un receptor de la ZP3 que actúan de forma complementaria o sinérgica. Hasta el momento seis diferentes proteínas que interactúan con la ZP3 han sido aisladas a partir de espermatozoides de humano [40].

El modelo actual de la vía de señalización celular que induce la RA, propone que la unión de ZP3 a su receptor provoca un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ bifásico. En la primera fase, la entrada de Ca^{2+} es rápida y transitoria (dura aproximadamente 100 ms) y en la segunda fase la entrada de Ca^{2+} es lenta y sostenida (de segundos (s) a minutos (min)). Hasta ahora no se han podido identificar con certeza a los canales responsables de la entrada de Ca^{2+} en la primera fase. Sin embargo, se ha propuesto, al menos en espermatozoides de ratón, que los canales activados por voltaje (Ca_v) son los responsables. Los canales Ca_v se clasifican en canales de alto umbral de activación (HVA, del inglés "*High Voltage-Activated channels*") y canales de bajo umbral de activación (LVA, del inglés "*Low Voltage-Activated channels*"). Los canales HVA se abren con potenciales despolarizantes de ≥ -30 mV y se dividen a su vez en: L (Long-lasting), N (Neuronal), P (Purkinje) /Q y R (Resistentes a la mayoría de bloqueadores de canales Ca_v). Por otro lado, los canales LVA se activan en respuesta a potenciales despolarizantes de ≥ -70 mV, a estos canales también se les conoce como canales tipo T, ya que presentan una corriente transitoria. Se piensa que específicamente los canales tipo T son los responsables de la entrada de Ca^{2+} en la primera fase de la RA. De hecho, las corrientes de estos canales Ca_v ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$) se han registrado en células espermatogénicas de ratón mediante la técnica de "Patch-Clamp" (fijación de voltaje en micro áreas de membrana) [41, 42] y se han identificado estas proteínas en los espermatozoides maduros de ratón y de humano. Además, la RA se inhibe en presencia de bloqueadores específicos de los Ca_v [24, 43-45]. Otros científicos proponen que esta entrada de Ca^{2+} ocurre mediante los canales CatSper (del inglés, "*Cation channel of Sperm*"), los cuales se han registrado en espermatozoides del epidídimo mediante la técnica de "Patch-Clamp" [46] y se ha mostrado que la activación de estos canales con 8-Br-cGMP (también puede ser activados por voltaje y aumento del pH intracelular

[47]) induce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ que inicia en la pieza media (lugar donde se localizan estos canales) y se propaga hasta la cabeza [47]. Además, se sabe que los espermatozoides de ratón que son nulos para CatSper son infértiles, aunque se asocia más a estos canales en el proceso de la capacitación [48] y la motilidad hiperactivada [49] que en la inducción de la RA.

Se ha postulado que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la segunda fase está mediado por canales con actividad tipo SOC [50, 51] (del inglés, “*Store-Operated Channels*”). Los canales SOC se localizan en la MP y permiten la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. La principal característica de estos canales es que se activan cuando se libera Ca^{2+} de las pozas internas de las células. Los canales TRPC (del inglés, “*Transient Receptor Potential canonical Channels*”) [52] y dos familias de proteínas, la STIM (Stim 1 y 2) y la Orai (Orai1,2 y 3), son componentes moleculares de canales SOC [53]. Se cree que STIM1 y Homer1 regulan la actividad de los canales tipo SOC [54-57], los cuales podrían estar conformados tanto por TRPC y/o por Orai [58]. Además, recientemente se postuló que un canal de Ca^{2+} activado por el ácido araquidónico podría ser otro miembro de la familia de los canales tipo SOC, ya que está compuesto por Orai1 y Orai3 y también requiere que STIM1 esté presente en la PM para poder conducir Ca^{2+} [59]. De tal forma que la identidad molecular de los canales SOC aún es controversial, pero es probable que involucre un macro-complejo asociando varias de las proteínas mencionadas [60].

F. Modelo propuesto de la vía de señalización que ocurre durante la RA

La ZP3 es considerada como el inductor natural de la RA [61], aunque ésta puede inducirse de manera alternativa con Pg o ionóforos de calcio [62]. A continuación presento un modelo de la vía de señalización de la RA inducida por ZP3 (Figura 5). La mayor parte de las evidencias que permiten plantear este modelo se han obtenido a partir de estudios realizados con espermatozoides de ratón. La unión de ZP3 a su receptor ocasionaría, de

alguna manera aún no determinada, la activación de los canales Ca_v , mediante los cuales ocurriría la primera entrada de Ca^{2+} [63]. El Ca^{2+} es capaz de activar una isoforma particular de la PLC (fosfolipasa-C) denominada PLC- δ , la cual produce DAG (diacilglicerol) e IP_3 (Inositol 1,4,5-trifosfato) a partir de PIP_2 (fosfatidil inositol 4,5-difosfato). Los receptores de IP_3 (IP_3R) se activarían y promoverían una salida de Ca^{2+} del acrosoma [64]. El DAG junto con la salida de Ca^{2+} de pozas internas, ocasionaría la activación de los canales SOC que se encuentran en la membrana plasmática, permitiendo la segunda entrada sostenida de Ca^{2+} [51]. Para que ocurra la culminación de la RA, que involucra la fusión de membranas, se propone que la segunda entrada de Ca^{2+} activa a sAC (la adenilato ciclasa soluble), enzima que produce cAMP a partir de ATP. El cAMP activaría a la PKA, la cual estaría involucrada en la activación de la maquinaria de fusión de las membranas plasmática y acrosomal. No obstante, la RA inducida por cAMP es independiente a la PKA ya que se ha reportado que se puede inducir la RA aun en presencia de inhibidores de esta proteína [65, 66]. En consecuencia, la culminación de la vía de señalización de la RA se ha propuesto que puede ser mediada por Epac (del inglés, "Exchange protein directly activated by cAMP"). El cAMP activaría a Epac, esta proteína estimularía de forma paralela dos vías de señalización que culminan en la fusión de las membranas. Por un lado Epac activaría a Rap1 [67], la cual estimularía a la PLC- ϵ , produciendo por segunda vez IP_3 y DAG a partir de PIP_2 . El IP_3 al unirse a su receptor, provocaría una segunda liberación de $[Ca^{2+}]_i$ del acrosoma. Por otro lado, Epac activaría indirectamente a Rab3A [68], que desensambla los complejos cis SNARES con la ayuda de α -SNAP/NSF (del inglés, " α -soluble NSF attachment protein" y "N-ethylmaleimide-sensitive factor") [69]. El Ca^{2+} ocasionaría la desfosforilación de synaptotagmina, perdiendo así su efecto inhibitorio, y posteriormente los SNAREs formarían un complejo trans y finalmente la liberación de Ca^{2+} a través de los receptores de IP_3 (mencionada anteriormente) induciría la fusión de las membranas [70]. La evidencia para proponer la participación de Epac en esta vía de señalización se ha obtenido en espermatozoides de humano en un modelo permeabilizado, por lo que es muy importante realizar experimentos con células intactas que validen o descarten esta hipótesis.

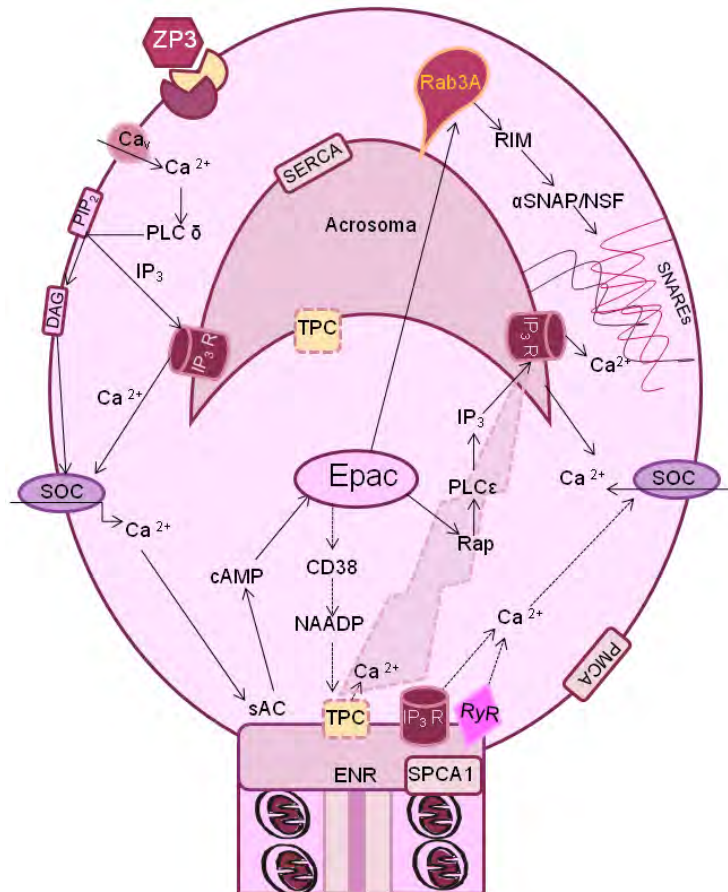


Figura 5. Modelo de la cascada de señalización celular durante la reacción acrosomal. La unión de ZP3 a sus receptores provocaría la activación de los Ca_v . Esto ocasionaría la primera entrada de Ca^{2+} , que estimularía a la PLC- δ , la cual produce IP_3 y DAG. El IP_3 provocaría una salida de Ca^{2+} del acrosoma a través de su receptor. La salida de Ca^{2+} del acrosoma y el DAG activarían a los canales SOC, los cuales permitirían la segunda entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. El Ca^{2+} activaría a la sAC y el cAMP producido por esta proteína activaría a Epac, que directamente activaría a Rap1. Esta última proteína estimularía a la PLC- ϵ , la cual volvería a producir IP_3 . El IP_3 se une a su receptor y promueve una segunda salida de $[Ca^{2+}]_i$ del acrosoma o podría ser que este aumento sea por la activación de los TPC. Por otro lado, Epac activaría indirectamente a Rab3A, que desensamblaría los complejos cis SNAREs con la ayuda de α -SNAP/NSF, posteriormente los SNAREs formarían un complejo trans. Finalmente la liberación de Ca^{2+} a través de los receptores de IP_3 induciría la fusión de las membranas [70].

Para poder discernir entre una vía de señalización mediada por Epac o por PKA se utiliza un análogo del cAMP denominado 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (OMecAMP), ya que este compuesto no es capaz de activar a la PKA. Por lo tanto, actúa como agonista específico de Epac (Figura 6) [65].

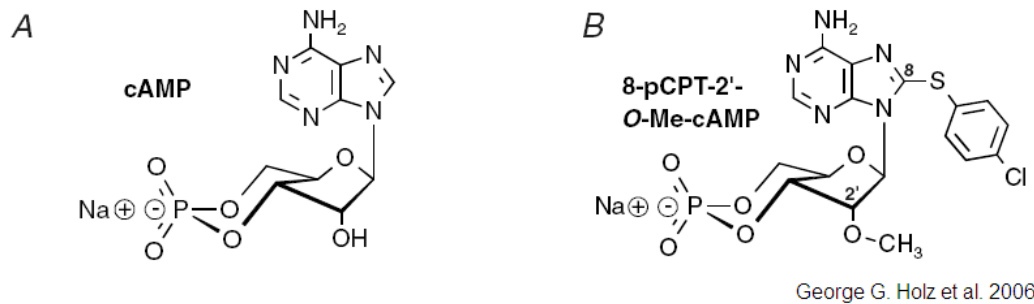


Figura 6. Estructura química del cAMP y del 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP. El alcohol que se encuentra ubicado en la posición 2 de la ribosa del cAMP es remplazado por un éter en molécula del 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP.

Epac y su relación con la RA.

Como se mencionó anteriormente, se propone que Epac activa dos vías de señalización paralelas que están involucradas en la culminación de la RA.

La proteína Epac ha sido implicada en diversos procesos celulares, como por ejemplo: contracción cardíaca, procesos de secreción, crecimiento celular, respuestas inflamatorias, supervivencia y diferenciación celular [71]. Epac se activa cuando se une a cAMP. Posiblemente la unión de cAMP induce cambios conformacionales en la estructura de Epac, lo que ocasiona el desensamble de sus proteínas inhibitoras, de esta forma Epac queda libre para interactuar con sus proteínas blanco [72, 73]. En diversos tipos celulares ocurren fluctuaciones micromolares de cAMP que son suficientes para activar a Epac [74]. Recientemente, se ha descrito que Epac puede influenciar la actividad de canales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- [75], la actividad de transportadores de Na^+ - K^+ , la exocitosis en varios tipos celulares (Epac aumenta la expresión de los canales $\text{Ca}_v3.1$ en las células, ocasionando una disminución en el potencial de reposo y de esta forma facilita la exocitosis) [44, 76, 77], la inhibición de los canales K_{ATP} [78] y aumenta la probabilidad de apertura de los canales ENAC expresados en epitelios pulmonares de rata [79, 80]. Epac también puede activar a dos proteínas G monoméricas denominadas Rap1 y Rap2. Estas proteínas son inactivas cuando tienen unido GDP y se activan cuando intercambian GDP por GTP. Estas proteínas poseen una actividad de GTPasa, por lo tanto la activación por Epac se termina cuando se

hidroliza el GTP. Esta hidrólisis es acelerada por una proteína llamada GAP (del inglés “GTPase Activating Proteins”) [81, 82].

La proteína Epac tiene hasta el momento dos isoformas descritas que son codificadas por distintos genes, a las cuales se les denomina Epac1 y Epac2. Las propiedades estructurales de las dos proteínas se describen en la Figura 7 [74].

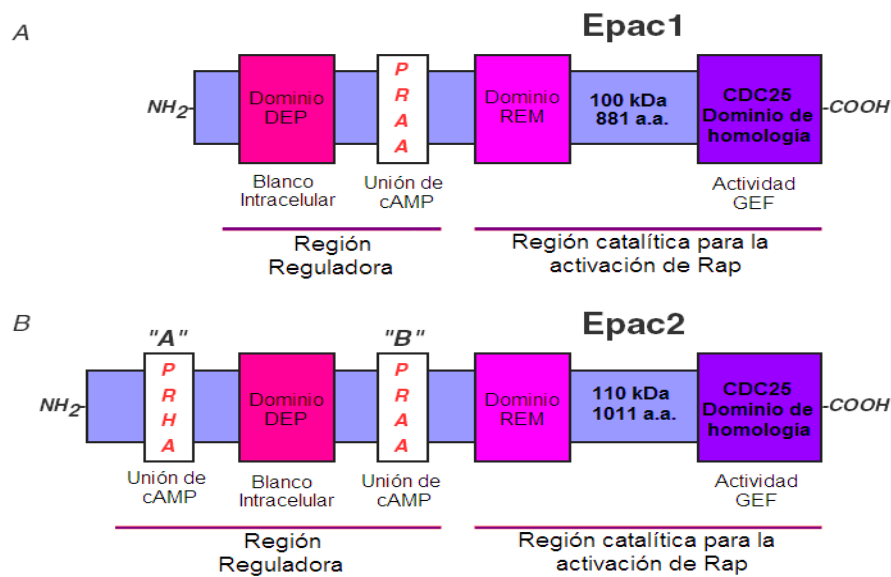


Figura 7. Propiedades estructurales de Epac1 y Epac2. Epac1 está constituido por 881 aminoácidos (masa molecular de 100kDa) y Epac2 por 1011 aminoácidos (masa molecular de 110kDa). Las proteínas Epac se dividen en dos regiones: la región reguladora y la región catalítica para la activación de Rap. La región reguladora de Epac1 tiene un solo dominio de unión a cAMP, en contraste con Epac2 que contiene dos dominios. El dominio DEP les permite a los dos isotipos asociarse a membranas intracelulares. La región catalítica para la activación de Rap tiene un Dominio REM que es responsable de estabilizar la estructura terciaria del dominio CDC25. El dominio CDC25 catalítico le confiere la actividad de intercambiador de nucleótido de guanina (GEF, del inglés guanine nucleotide Exchange factor) [74].

Movilización de Ca²⁺ en el citoplasma.

Para que el Ca²⁺ pueda funcionar como segundo mensajero en las células, se requiere que haya un gradiente entre el citoplasma y el medio externo. De hecho así ocurre, se ha reportado que la [Ca²⁺] en el citoplasma se mantiene alrededor de 100nM y que la concentración del medio externo fisiológico es 2mM. Para mantener un gradiente de concentración de Ca²⁺

entre el citoplasma y las pozas internas de Ca^{2+} en las células, se requiere la participación de proteínas que transporten Ca^{2+} activamente, a estas proteínas se les denominan bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP. Hasta la fecha se han identificado tres diferentes bombas de Ca^{2+} : la PMCA (del inglés, "Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase"), la SERCA (del inglés, "Sarcoplasmic-Endoplasmic Ca^{2+} ATPase") y la SPCA (del inglés, "the Secretory Pathway Ca^{2+} ATPase"). En espermatozoides, se cree que las bombas PMCA y SPCA son las que mantienen la homeostasis de Ca^{2+} en espermatozoides maduros, ya que ha sido claramente identificadas en la MP y en los reservorios de Ca^{2+} (acrosoma y ENR), respectivamente. En cambio, la SERCA parece tener un papel más importante durante la espermatogénesis [83]. La señalización por Ca^{2+} puede ser detectada por la célula cuando siente un aumento $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la concentración de este catión en el citoplasma, este Ca^{2+} puede provenir tanto del medio externo como de pozas internas de las células [66].

La liberación de Ca^{2+} a partir de pozas internas puede ser mediada por tres diferentes mensajeros: el IP_3 , la cADPR (del inglés, "Cyclic Adenosine Diphosphoribose") y NAADP (del inglés, "Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate") cuyos blancos son los IP_3R , los RYR (Receptores de Rianodina) y los TPCs, (del inglés, "Two-pore channels") respectivamente [84-86]. Los TPCs forman una familia de receptores de NAADP (del inglés, "cyclic ADP ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate") que se identificaron en las plantas y regulan la germinación y el movimiento de estomas [87]. Recientemente, se identificaron estos canales también en células animales, específicamente localizados en organelos que tienen un pH ácido [88]. En humanos el TPC1 se ha identificado en endosomas y el TPC2 en lisosomas. Se ha propuesto que el NAADP induce una pequeña salida de Ca^{2+} , que a su vez desencadena una salida de Ca^{2+} más robusta mediante los IP_3R y RyR [89, 90].

II. Antecedentes

Trabajos previos demostraron que el agonista específico (OMecAMP) de Epac es capaz de inducir la RA [66] y se propuso que este compuesto era capaz de movilizar Ca^{2+} en el espermatozoide. El grupo de la Dra. Claudia Tomes de la Universidad de Cuyo en Argentina observó, utilizando indicadores fluorescentes para Ca^{2+} en un espectrofluorómetro, que efectivamente la adición de OMecAMP movilizaba Ca^{2+} en el espermatozoide de humano [91]. El objetivo de este trabajo es identificar las proteínas involucradas en esta movilización de Ca^{2+} .

De acuerdo a las evidencias que se han obtenido en espermatozoides de humano [66, 70, 91], nosotros proponemos que la liberación de Ca^{2+} de pozas internas puede ocurrir mediante dos diferentes mecanismos: 1) Epac activa a Rap, y esta proteína activa a PLC- ϵ , que hidroliza PIP_2 y genera IP_3 , el cual activaría directamente a su receptor y finalmente se libera Ca^{2+} al citoplasma a través de este último receptor [70]. 2) Epac promueve directa o indirectamente la producción de NAADP (la enzima que produce esta molécula es la CD38, la cual se activa por Ca^{2+} [92]), que al unirse a los TPCs, catalizan una liberación de Ca^{2+} de pozas internas, señal que se amplifica a través de comunicación con los IP_3R y RyR, produciendo una salida de Ca^{2+} más robusta de la misma o de una poza de Ca^{2+} diferente. De hecho, se ha reportado que en el espermatozoide de erizo de mar se expresa la NAADP sintetasa [93] y el NAADP induce movilización de Ca^{2+} [94]. La primera vía de señalización se ha identificado en distintos tipos celulares, como por ejemplo en cardiocitos; donde se ha descrito que la liberación de Ca^{2+} a partir del retículo sarcoplásmico ocurre mediante este mecanismo [95]. En cambio en otros tipos celulares, como por ejemplo células pancreáticas humanas, se ha demostrado que en la liberación de Ca^{2+} de pozas internas (mediada por Epac) están implicados los TPCs y los RyR [85, 96]. También, se reportó que Rap1 interactúa directamente con SERCA. Una señal Epac/Rap1 puede influenciar el aumento de Ca^{2+} modulando el RyR, posiblemente mediante un contacto directo [97]. Esta vía de señalización también podría estar actuando en el espermatozoide de forma paralela o sinérgica con la vía mediada por el IP_3R .

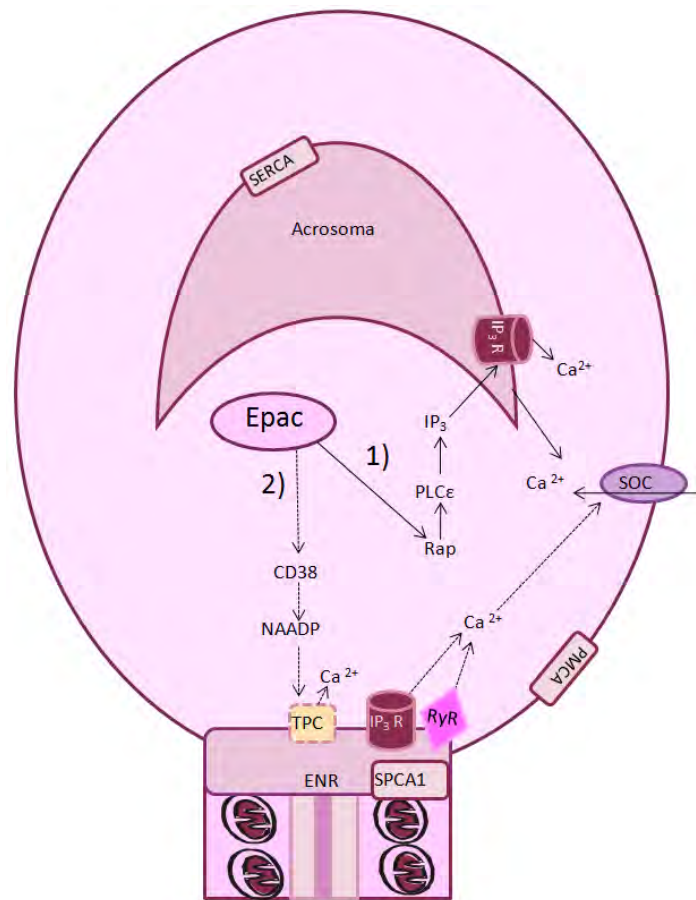


Figura 8. Epac podría inducir un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ mediante dos mecanismos distintos. 1) Epac induce un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ únicamente mediante los IP₃R. 2) Epac induce un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ activando a los TPC, los cuales podrían a su vez modular la actividad de los IP₃R y RyR.

Nosotros proponemos que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ provocado al adicionar OMecAMP proviene de pozas internas, por lo tanto, probaremos inhibidores específicos de los IP₃R, RyR y TPC para evaluar su participación. Sin embargo, se utilizarán inhibidores específicos para canales que se encuentran en la membrana plasmática (canales tipo SOC y canales Ca_v), para poder descartar o corroborar su participación en la respuesta inducida por OMecAMP.

III. Hipótesis

A través de una vía de señalización mediada por Epac, el OMecAMP moviliza Ca^{2+} de pozas internas e induce la RA en el espermatozoide de humano.

IV. Objetivos

Objetivo General- Caracterizar la vía de señalización por la cual el OMecAMP moviliza Ca^{2+} e induce la RA en el espermatozoide de humano maduro.

Objetivos Particulares- Evaluar la participación de los canales Ca_v , los receptores de IP_3 y los canales tipo SOC en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la inducción de la RA en respuesta a la adición de OMecAMP.

Descartar la participación de la PKA en la vía de señalización inducida por OMecAMP.

V. Metodología

A. Reactivos y soluciones.

Para las mediciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ utilizamos el colorante Fluo3-AM (Molecular Probes, Carlsbad). Este colorante es sensible a la luz, debe mantenerse a -20°C y se solubiliza en DMSO. El Fluo3-AM es un indicador de baja afinidad por Ca^{2+} que tiene una $K_d = \sim 390\text{nM}$, la cual es ideal para las mediciones de Ca^{2+} que realizamos en nuestros experimentos [98, 99].

Medio Capacitante- Para la capacitación de las células utilizamos medio Ham's F-10 (Sigma, St. Louis) suplementado con BSA (5mg/ml) y CaCl_2 (concentración final de 2mM).

Medio de Registro- Para hacer los registros de fluorescencia utilizamos como solución externa un medio a pH=7.4 que contiene los siguientes compuestos (en mM): 120 NaCl, 4 KCl, 15 NaHCO₃, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 5 D-Glucosa, 2.5 EGTA, 1 piruvato de sodio y 10 lactato de sodio. La concentración de CaCl₂ en el medio es la única que varió (desde 1.8mM hasta 4.3mM) dependiendo de la condición del experimento. La cantidad de CaCl₂ que se tuvo que agregar al medio se calculó utilizando un programa hecho por la Universidad de Stanford (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm>) [100].

Los inhibidores que se utilizaron en este trabajo son los siguientes: SK&F96365 (SKF, Biomol, Farmingdale, Estados Unidos), 2-Aminoetoxifenilborato (2-APB, Biomol, Farmingdale), Gadolinio (Gd³⁺, Sigma St. Louis), Mibefradil (obsequiado por JC Gomora. IFC, UNAM, México), Nifedipina (Alomone, Jerusalén), Verapamil (Sigma, St. Louis), Xestopongina C (XC, Biomol, Farmingdale), Dihydrochloride (H-89, MERCK, Whitehouse), Rp-3',5'-Adenosín monofosfato cíclico trietilamonio (RpcAMP, Sigma, St. Louis).

B. Obtención de espermatozoides

En todos los experimentos se utilizaron espermatozoides de humano, los cuales se obtienen de donadores sanos que tienen entre 18 y 40 años de edad, que tuvieron entre 48 hrs a 7 días de abstinencia sexual y que cumplen con los parámetros de la Organización Mundial de la Salud [101]. La muestra se colecta en un frasco de plástico estéril (generalmente se obtiene entre 2 y 5mL de muestra) y se incuba a 37°C durante 30 min para que la muestra se licue (cambie su estado viscoso a líquido fluido). Posteriormente se seleccionan a los espermatozoides con mayor motilidad, esto se hace mediante una técnica llamada nado hacia arriba ("Swim up"), la cual consiste en agregar 1mL de la muestra licuada y después agregar lentamente un 1mL de medio capacitante en un tubo de ensayo que esté inclinado a 45° (los tubos se inclinan para aumentar la superficie de contacto y recuperar un mayor número de células). Estos tubos se incuban a 37°C con 5% de CO₂ durante 1hr. A continuación, se

toman 750µl de la parte superior del tubo (donde se encuentran los espermatozoides con mayor motilidad).

Los espermatozoides móviles se capacitan *in vitro* (Figura 9); esto consiste en incubar a los espermatozoides a 37C° con 5% de CO₂ durante 5 horas en el medio capacitante, (la hora que dura el “Swim up” se considera dentro de las horas de la capacitación) [6].

C. Incorporación del indicador fluorescente

La medición del cambio de la [Ca²⁺]; se hace empleando un colorante fluorescente sensible a Ca²⁺ llamado Fluo3AM. Para poder introducir el colorante a las células se toma 1mL de espermatozoides, se agrega 2µl de ácido plurónico al 10% y 2µl del colorante Fluo 3AM (que esta a una concentración de 1 mM) y se les deja en la incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 30 min en ausencia de luz. Al terminar este periodo de incubación se lavan las células para quitar el exceso de colorante; esto se logra al centrifugar a las células durante 5 minutos a 3000 rpm y resuspendiéndolas en el medio de registro, de tal forma que queden a una densidad de 100 millones de espermatozoides por mililitro (Figura 9).

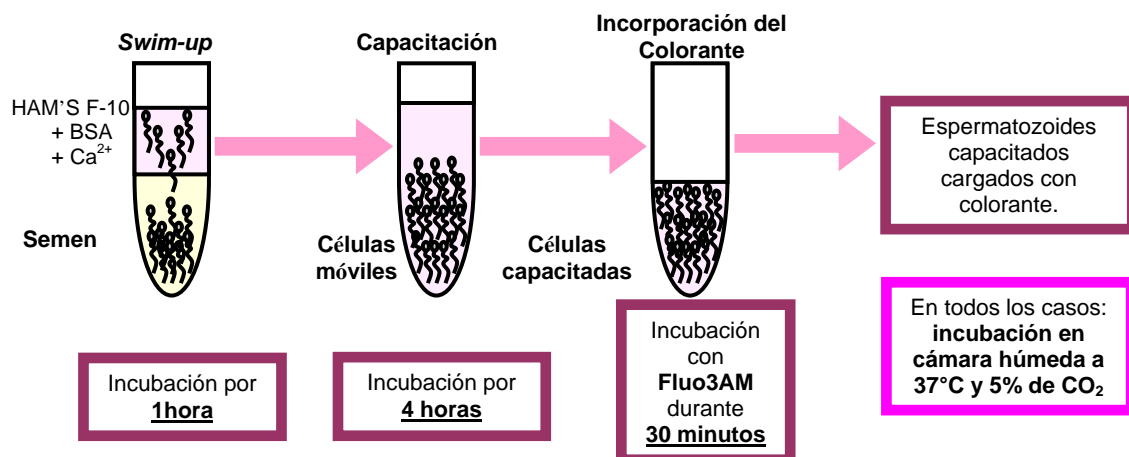


Figura 9. Metodología para la obtención de espermatozoides maduros cargados con el colorante Fluo3-AM [102].

D. Medición del cambio de la $[Ca^{2+}]_i$

Para cuantificar los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ en poblaciones de espermatozoides maduros de humano, se registró la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo en un espectrofluorómetro de la marca SLM-AMINCO operado con el software de adquisición "OLIS GlobalWorks" (Figura 10). En la cámara de muestra del espectrofluorómetro se coloca un tubo de ensayo con 3×10^3 espermatozoides de humano (previamente se cargados con Fluo3-AM) suspendidos en 600 μ l de MRH. Estos espermatozoides se mantienen a 37°C y en agitación continua. Para excitar al fluoróforo Fluo3-AM se utiliza una longitud de excitación de 505nm y la longitud de emisión es de 525nm. Se adquieren los datos con una frecuencia de 0.5Hz durante 4 minutos.

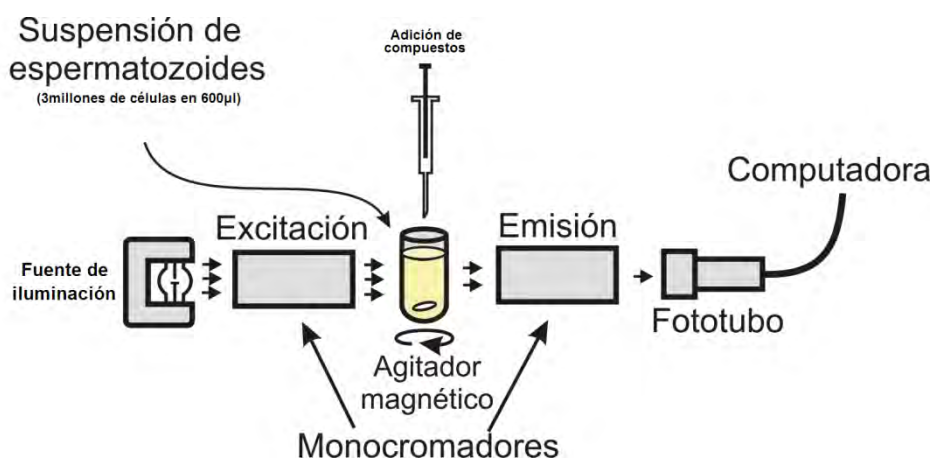


Figura 10. Esquema del Espectrofluorómetro. Aparato que se utiliza para hacer las mediciones de Ca^{2+} intracelular.

El protocolo para evaluar la respuesta inducida por OMecAMP se muestra en la Figura 11. En el panel A de esta figura se representa al Control, a partir del cual se obtiene la respuesta máxima inducida por OMecAMP, posteriormente se adiciona Pg como control positivo (ya que en estudios previos se ha demostrado que la Pg induce la RA y un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$) y finalmente se adiciona TritónX-100 (Tx-100, para obtener el máximo de fluorescencia) . En la Figura 11B se muestra el protocolo que se utiliza para probar el efecto de los diferentes inhibidores en la respuesta inducidas por OMecAMP.

Protocolo para evaluar la inhibición de la respuesta inducida por OMecAMP y Pg.

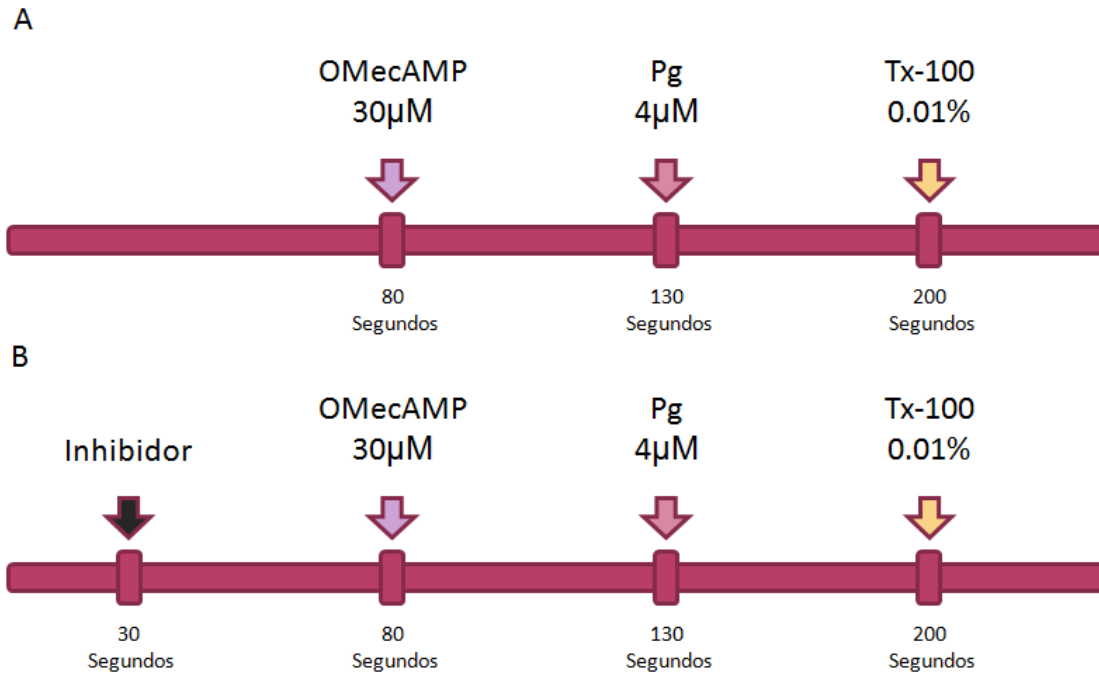


Figura 11. Protocolo para evaluar la inhibición de la respuesta inducida por OMecAMP y Pg. Se muestra con una flecha en la escala de tiempo las adiciones realizadas en cada protocolo. A) Control= adición de OMecAMP, Pg y Tx-100 y . B) Efecto del inhibidor en la respuesta inducida por OMecAMP y Pg.

E. Inducción y medición de la reacción acrosomal

En estos experimentos se utilizaron cinco diferentes controles: el Control-RA-1 (mide el porcentaje de espermatozoides que desarrollan la RA de forma espontánea) contiene medio capacitante y 0.1% de DMSO (máximo porcentaje de DMSO empleado para disolver a los diferentes inhibidores). El Control-RA-2 (mide el porcentaje máximo de espermatozoides que desarrollan la RA) contiene medio capacitante y 10µM de A23 (ionóforo de Ca^{2+}). El Control-RA-3 (mide el porcentaje de espermatozoides que desarrollan la RA en presencia de Pg) contiene medio capacitante y 10µM Pg. El Control-RA-4 (mide el porcentaje de espermatozoides que desarrollan la RA en presencia de OMecAMP) contiene medio capacitante y 30µM de OMecAMP. El Control-RA-5

(evalúa si el inhibidor induce la RA) contiene medio capacitante y el inhibidor a probar. En el resto de las condiciones se evalúa la inducción de la RA por OMecAMP en presencia de los diferentes inhibidores.

Inducción de la RA

En tubos de fondo cónico de 500 µl se adiciona el inhibidor que se desea probar a diferentes concentraciones (con excepción de los controles Control-RA-1, 2 y 3), se agrega medio capacitante y se resuspende. A continuación, se adicionan los espermatozoides, obtenidos a partir de la técnica de “SwimUp”, y se incuban durante 15min a 37°C. A continuación, se adiciona el inductor de la RA (con excepción de Control-RA-1 y 2), se resuspende y se incuban nuevamente las células durante 15min a 37°C. Al Control-RA-3 se le adiciona un ionóforo de Ca²⁺, se resuspende y se incuban también durante 15min a 37°C

Medición de la RA

Para medir el porcentaje de espermatozoides que desarrollan la RA se tiñe a la muestra con FITC-PSA (una lectina de *Pisum sativum* asociada a isotiocianato de fluoresceína). Esta molécula fluorescente se une a residuos de manosa y glucosa, componentes que se encuentran en el acrosoma. Por lo tanto, los espermatozoides que se tiñan con FITC-PSA son los que no han desarrollado la RA. A continuación se describe el protocolo de tinción:

Se agregan 100 µl de PBS a cada uno de los tubos y se centrifugan a 3,000rpm durante 5 min. El sobrenadante se descarta y se adiciona 40µl de metanol absoluto frío (-20°C) a cada tubo, se agitan en un Vórtex y se colocan en hielo (en este paso se permeabiliza la membrana plasmática y acrosomal externa de los espermatozoides). Posteriormente, se traslada el contenido de cada tubo a su respectivo pozo de un portaobjetos con cubierta de teflón. Los portaobjetos se colocan sobre una plancha a 37°C y se deja secar durante 1 hora. A continuación, se agrega 7µl de FITC-PSA (25 µg/ml en PBS) a cada pozo y se deja secar dentro de una cámara oscura y húmeda durante 30

minutos. Los portaobjetos se lavan al sumergirlos en un frasco protegido de la luz, que contenga agua MiliQ a 4°C durante 15 minutos en agitación, después se descarta el excedente de agua del portaobjetos y se vuelven a lavar los portaobjetos dos veces más. Finalmente, se dejan secar los portaobjetos sobre una plancha a 37°C en ausencia de luz.

Una vez teñidos los espermatozoides, se observan utilizando un microscopio de fluorescencia y un objetivo de inmersión en aceite 100X. Tomando en cuenta la presencia o ausencia de la tinción en los espermatozoides, se evalúa el número de células que hayan llevado a cabo la RA de al menos 200 células elegidas al azar.

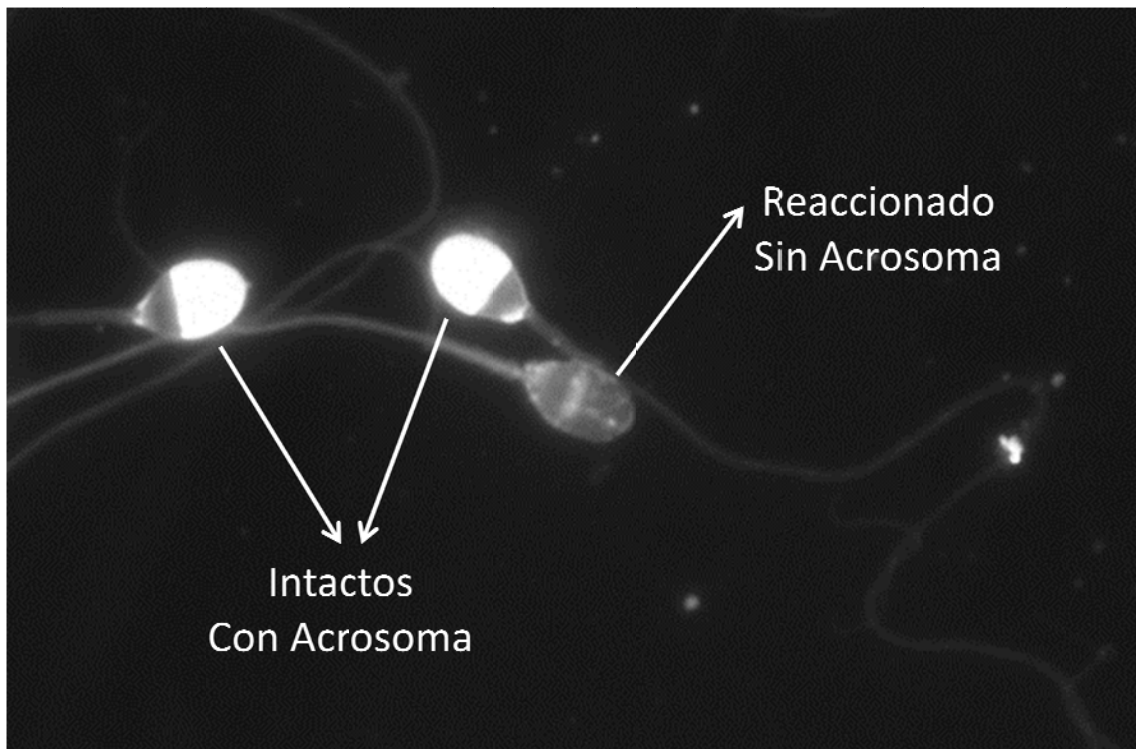


Figura 12. Tinción de espermatozoides con FITC-PSA. Los espermatozoides que fluorescen son los que aun tienen el acrosoma (espermatozoides intactos). En cambio, los espermatozoides reaccionados no fluorescen.

F. Condiciones experimentales.

En este trabajo se utilizan diferentes inhibidores (Tabla1) de algunas proteínas, para evaluar su participación en el efecto inducido por OMecAMP en la movilización de Ca^{2+} y en la inducción de la RA.

Inhibidor	Blanco	IC ₅₀	Referencia
SKF96365	SOC	10-20 μ M	[103, 104]
2APB	SOC	50 μ M	[104-107]
Gd ³⁺	SOC	1 μ M	[104, 108]
Gd ³⁺	TRPCs	100 μ M	[104, 108]
XC	IP3R	0.3 μ M	[109, 110]
2APB	IP3R	100 μ M	[105-107]
Dantroleno	RyR	0.3-2 μ M	[111, 112]
Ned19	TPC	ND	[113]
Mibefradil	Cav3 (T)	5 μ M	[42] [50]
Nifedipina	Cav3.2 (T)	0.4 μ M	[114]
H-89	PKA	3 μ M	[115]
RpcAMP	PKA	3 μ M	[116]

Tabla1. Inhibidores empleados en este trabajo. ND= No determinada.

G. Interpretación de datos

Medición del cambio de la $[Ca^{2+}]_i$

La computadora registra la intensidad de fluorescencia captada por el espectrofluorómetro a lo largo del tiempo mediante un programa llamado "OLIS GlobalWorks". Posteriormente se importan los datos de este programa a otro llamado "Microsoft Office Excel". En este último programa se hacen los análisis de los datos obtenidos.

Las gráficas de fluorescencia contra tiempo se hacen en "Microsoft Office Excel". En el eje Y se grafica $(F/F_0)-1$, donde F es la fluorescencia registrada a lo largo de todo el tiempo y F_0 es el promedio de la intensidad de fluorescencia que se registra en los primeros 30 segundos del trazo, a este cociente se le resta la unidad para que todos los trazos inicien en el valor cero. A partir de estas gráficas se obtienen las deltas parciales de fluorescencia (ΔPF), las cuales representan la diferencia de la intensidad máxima de fluorescencia obtenida después de la adición de OMecAMP y la intensidad de la fluorescencia pocos segundos antes de la adición del mismo (Figura 13). En cada trazo se adiciona Tritón-X100 al 10% para obtener el máximo de fluorescencia.

En algunos experimentos se registró un aumento gradual de la $[Ca^{2+}]_i$ basal. Seguramente este efecto fue causado por la liberación del colorante al medio extracelular por espermatozoides que murieron durante las manipulaciones. En estos casos, se calculó la pendiente del cambio y fue restada en cada uno de los puntos.

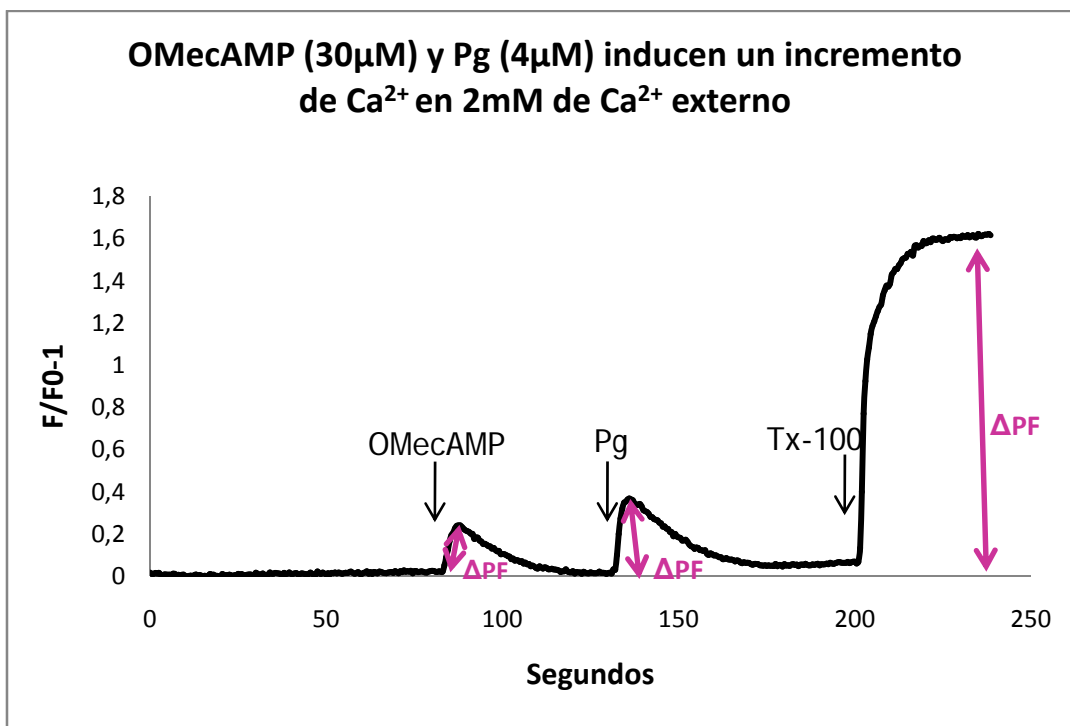


Figura 13. Definición de las deltas parciales de fluorescencia. Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos.

Los promedios de los deltas se muestran como gráficas de barras realizadas en "Microsoft Office Excel". En estas gráficas se toma en cuenta los deltas parciales. Además, los datos graficados están normalizados a la respuesta control (0 μ M de cualquier inhibidor), esto quiere decir que el control representa el 100% de la respuesta del OMecAMP. En las gráficas se indican los errores estándar (ES).

Para evaluar si la inhibición que se observa en los experimentos es significativa, se realiza la comparación de Student en un experimento no pareado: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

Para calcular la EC_{50} del OMecAMP se estimularon a los espermatozoides con diferentes concentraciones de este agonista. Los valores del ΔPF se normalizaron con respecto al valor máximo de ΔPF obtenido y se graficaron en función de la concentración de OMecAMP utilizada. Posteriormente se utilizó el programa "Sigma Plot 10.0" para hacer un ajuste de los datos experimentales obtenidos con la función de Hill de cuatro parámetros.

Para calcular las IC_{50} (concentración del inhibidor que se requiere para obtener el 50% de la inhibición máxima), de los inhibidores se utilizó el programa "Sigma Plot 10.0". El programa permite hacer un ajuste de los datos experimentales obtenidos con la función de Hill, nosotros elegimos la de cuatro parámetros para determinar la IC_{50} , ya que esta ecuación es la mejor se ajusta a los datos experimentales que fueron obtenidos (se obtuvo en todos los casos una $r \geq 0.95$).

Medición de la RA

Los promedios de RA se muestran como gráficas de barras y se hacen en "Microsoft Office Excel". Las gráficas de barras muestran el índice del %RA, este valor se determina de la siguiente manera: se sustrae el porcentaje de RA espontánea (Control-RA-1) y de normaliza al porcentaje máximo de inducción de la RA obtenido con A23 (Control-RA-2).

Para evaluar si la inhibición que se observa en los experimentos es significativa, también se realiza la comparación de Student en un experimento no pareado: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

VI. Resultados

Es importante resaltar que en los resultados obtenidos en este trabajo detectamos mucha variabilidad. Es decir, las respuestas obtenidas a partir de los espermatozoides provenientes de las distintas muestras presentaban ciertas diferencias, como por ejemplo; algunas poblaciones de espermatozoides eran más susceptibles a los agonistas (OMecAMP y Pg), a ciertos inhibidores o a la $[Ca^{2+}]$ utilizada en el medio extracelular. Estas diferencias seguramente son reflejo de la heterogeneidad genética de las poblaciones de espermatozoides, ya que en los experimentos se utilizaron espermatozoides de al menos 20 diferentes donadores. Además, los donadores estuvieron sujetos a diferentes variables, como por ejemplo: cambios climáticos, cambios en la dieta, cambios en los niveles de estrés, etc.

A. El OMecAMP induce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides de humano maduros.

Como se puede observar en la Figura 14, la adición de OMecAMP en el medio en donde se encuentran suspendidos los espermatozoides, ocasiona un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Después de ~100 segundos, la $[Ca^{2+}]_i$ vuelve a su estado inicial.

Para caracterizar el efecto de OMecAMP, decidimos registrar la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo en poblaciones de espermatozoides (previamente cargados con Fluo3-AM) utilizando un espectrofluorómetro.

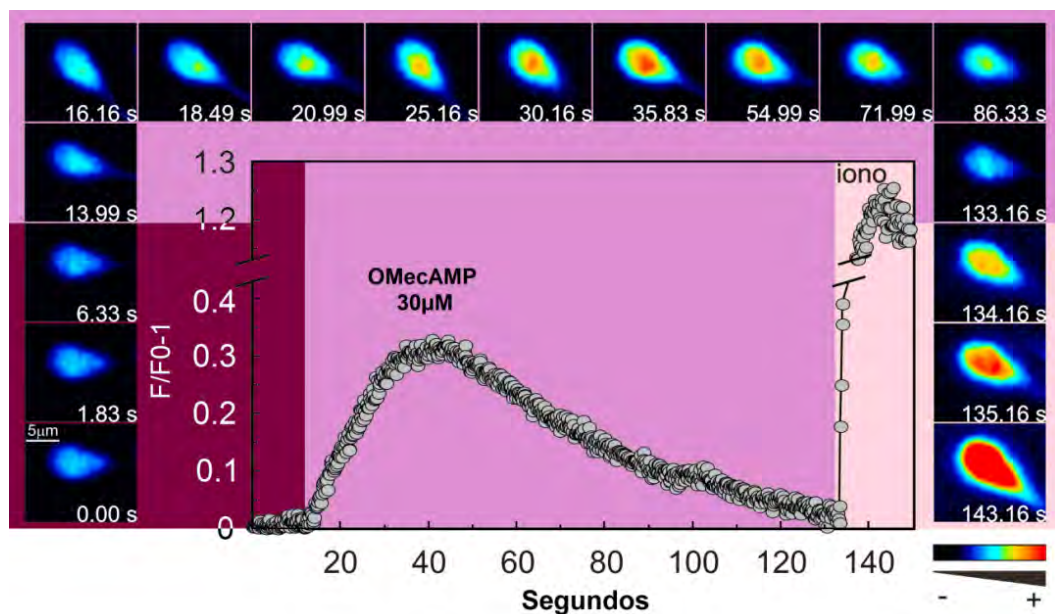


Figura 14. Dinámica espacio-temporal del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ después de la adición de $30\mu M$ de OMecAMP. Imágenes fluorescentes adquiridas antes y después de la adición de $30\mu M$ de OMecAMP en un espermatozoide previamente cargado con un colorante fluorescente sensible a Ca^{2+} (Fluo3-AM). Posteriormente se adicionó ionomicina (iono) para obtener el máximo de fluorescencia. En el centro de la imagen se muestra un trazo representativo de una célula (la fluorescencia se expresa como $(F/F_0)-1$). Las imágenes fueron adquiridas cada 150ms. Código de Color: negro (-) a rojo (+) indica baja a alta $[Ca^{2+}]_i$. Figura realizada por Gerardo de Blas.

B. Determinación de la EC_{50} del OMecAMP en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ e inducción de la RA en los espermatozoides de humano maduros.

Como ya se había mencionado anteriormente, está reportado que la adición de $50\mu M$ de OMecAMP induce la reacción acrosomal en espermatozoides de humano [66]. Sin embargo, la EC_{50} de este compuesto no se ha reportado en este tipo celular. En este trabajo, nosotros determinamos que la concentración de OMecAMP que se requiere para inducir la mitad del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ total es de $\sim 2\mu M$ (ver Figura 15) y $\sim 15\mu M$ para inducir la mitad de la RA total (ver Figura 16). De acuerdo con estos valores, nosotros decidimos utilizar una concentración de $30\mu M$ de OMecAMP para el resto de los experimentos, ya que utilizando esta concentración nos aseguramos de obtener la respuesta máxima.

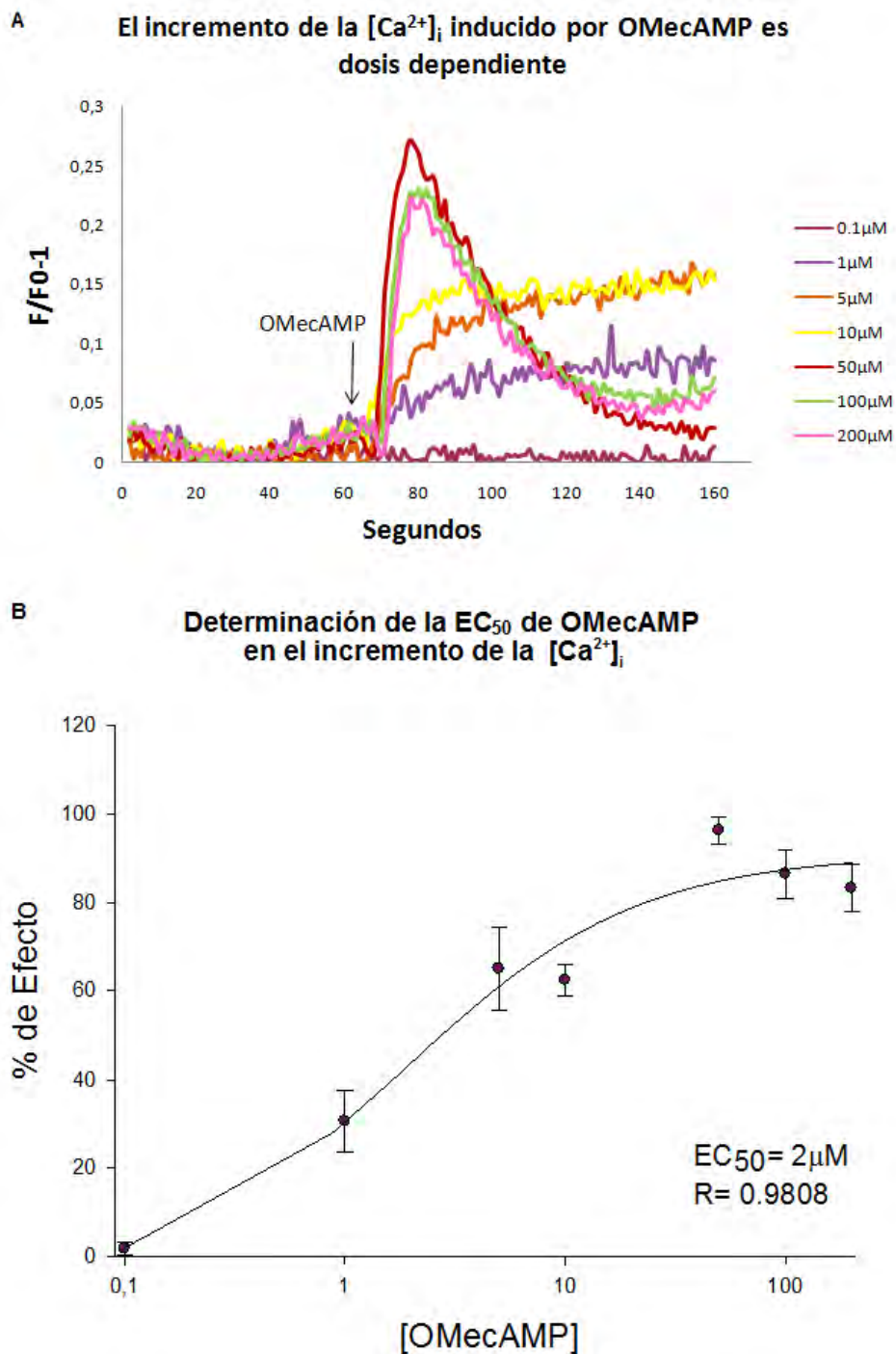


Figura 15. La EC_{50} de OMecAMP en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en 2mM de Ca^{2+} externo es $\sim 2\mu M$. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. Los trazos representados en diferentes colores muestran el efecto de la adición de diferentes concentraciones de OMecAMP. La flecha indica el tiempo en el cual se adicionó el OMecAMP. B) Curva de concentración y efecto del OMecAMP. La EC_{50} obtenida, a partir de un ajuste de los datos experimentales ($n \geq 4$) con la función de cuatro parámetros de Hill, fue $\sim 2\mu M$.

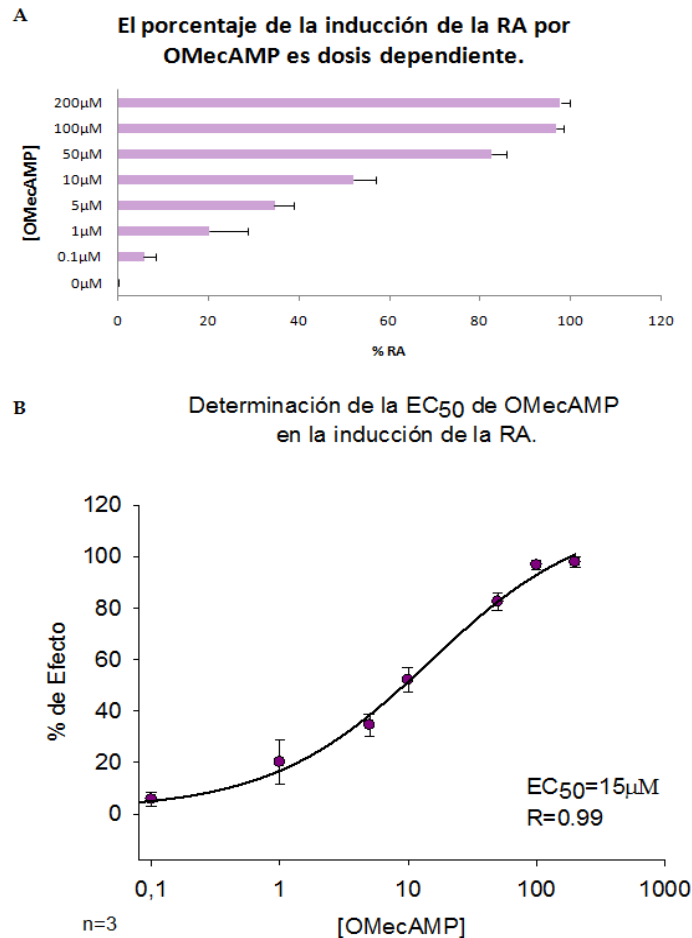


Figura 16. La EC₅₀ de OMecAMP en la inducción de la RA en 2mM de Ca²⁺ externo es ~15µM. A) Porcentaje de inducción de la RA en respuesta a la adición de diferentes concentraciones de OMecAMP. B) Curva de concentración y efecto del OMecAMP. La EC₅₀ obtenida, a partir de un ajuste de los datos experimentales (n≥3) con la función de cuatro parámetros de Hill, fue ~15µM.

C. La respuesta inducida por OMecAMP es independiente del proceso de capacitación.

Dado que durante la capacitación los espermatozoides desarrollan una serie de cambios bioquímicos, moleculares y fisiológicos, decidimos determinar si hay una diferencia entre la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en espermatozoides capacitados y no capacitados. En primera instancia, se observó lo que parece ser una diferencia de cargado del colorante entre los espermatozoides capacitados y no capacitados. Puesto que al adicionar 0.1% de TX-100 (control interno de cada trazo para obtener la fluorescencia máxima) al final del trazo, se obtuvo una ΔPF sustancialmente mayor en los

espermatozoides capacitados a comparación de los espermatozoides no capacitados (no mostrado), esto sugiere que los espermatozoides capacitados incorporan una mayor cantidad de colorante y/o contienen una mayor cantidad de Ca^{2+} en el citoplasma y reservorios de calcio. Para poder comparar la respuesta en espermatozoides capacitados y no capacitados se graficó $F/F_0 - 1_{Tx-100}$ normalizado a Tx-100 a lo largo del tiempo (ver Figura 17A). Las gráficas de barras de las Figura 17B y C muestran el ΔPF inducido por OMecAMP y Pg normalizado a Tx-100, respectivamente. Como se puede observar en estas figuras, la magnitud de la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en espermatozoides capacitados y no capacitados es similar.

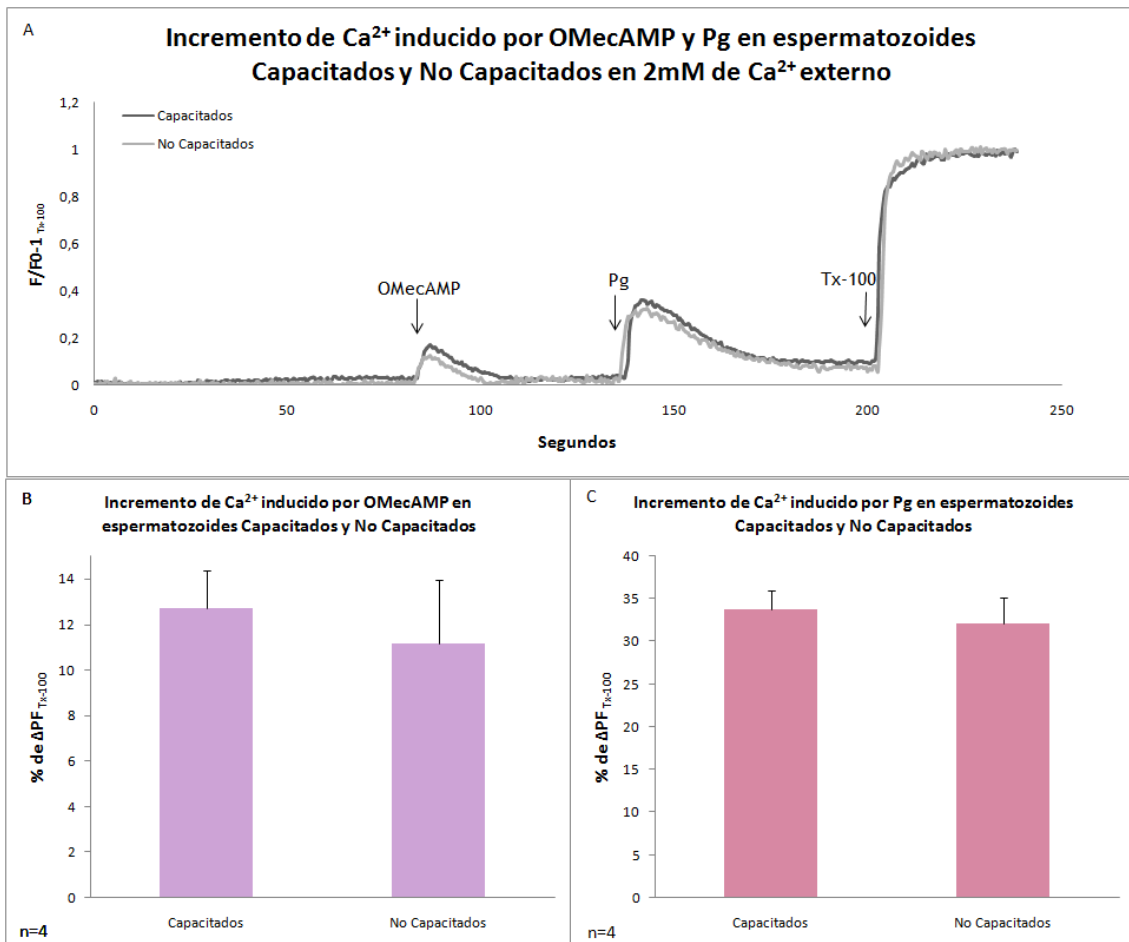


Figura 17. La respuesta inducida por OMecAMP es independiente del proceso de capacitación. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo normalizada a la fluorescencia máxima registrada que se obtiene al adicionar Tx-100. El trazo color negro representa a los espermatozoides capacitados y el gris a los no capacitados. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Las gráficas de barras muestran el ΔPF inducido por OMecAMP y Pg normalizado con el ΔPF del Tx-100, respectivamente. n= número de experimentos realizados.

D. La magnitud de la respuesta inducida por OMecAMP depende de la $[Ca^{2+}]$ extracelular.

En estudios previos se propuso que la respuesta inducida por OMecAMP no depende de Ca^{2+} extracelular y que este compuesto sólo moviliza Ca^{2+} de pozas internas [66, 91]. Estos experimentos fueron hechos en un modelo de espermatozoides permeabilizados y a una sola concentración de calcio. Por lo que consideramos importante evaluar si el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP depende de la $[Ca^{2+}]$ extracelular.

Determinamos que la fluorescencia basal era sustancialmente mayor en los espermatozoides que se encontraban en altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular a comparación de los espermatozoides que se encontraban en bajas concentraciones de Ca^{2+} extracelular. Además, al adicionar TX-100 se obtuvo una ΔPF mayor en los espermatozoides que se encontraban en altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular a comparación de los espermatozoides que se encontraban en bajas concentraciones de Ca^{2+} extracelular. Esto sugiere que cuando los espermatozoides se encuentran en bajas concentraciones de este ión, tanto la $[Ca^{2+}]$ del citoplasma como la de los reservorios disminuye. Dado que la cantidad de $[Ca^{2+}]_i$ es distinta en los espermatozoides dependiendo de la condición de Ca^{2+} extracelular en la que se encuentran, se graficó F/F_0-1 normalizado a Tx-100 a lo largo del tiempo. En la Figura 18 se puede observar que la magnitud de la respuesta inducida por OMecAMP y Pg aumenta conforme incrementa la $[Ca^{2+}]$ extracelular.

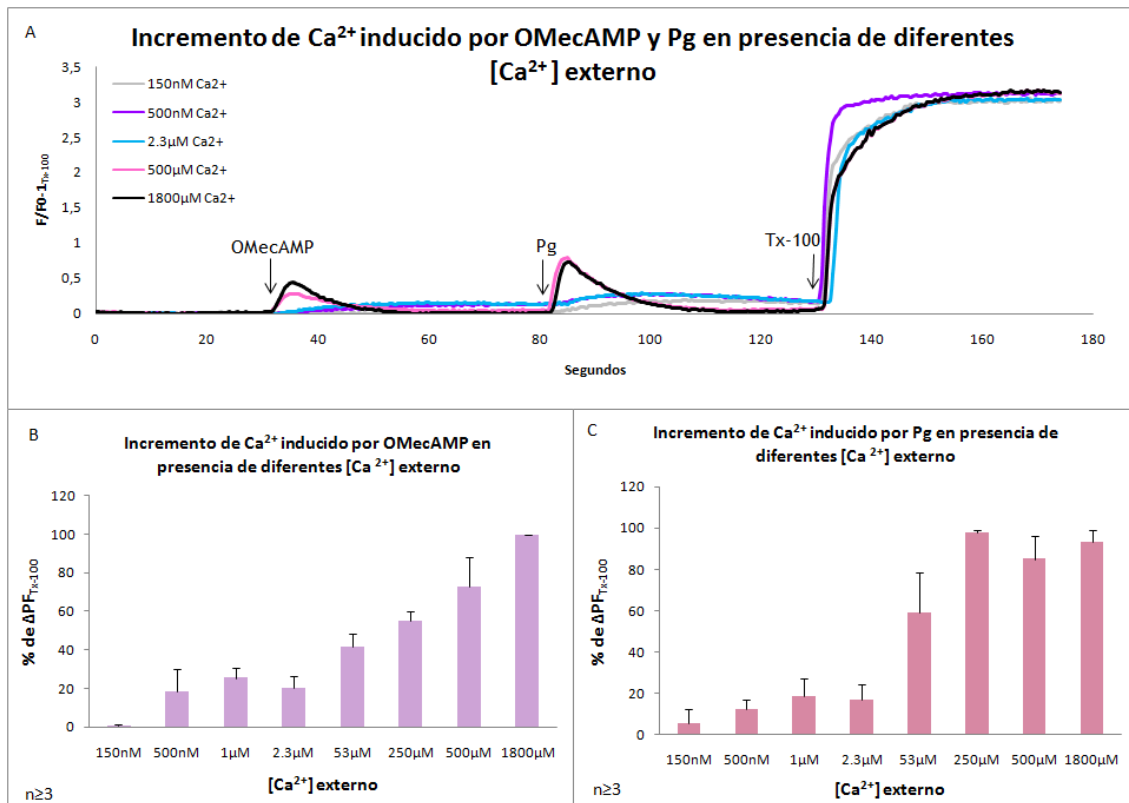


Figura 18. La magnitud del incremento de Ca^{2+} inducido por OMecAMP y Pg depende de la $[\text{Ca}^{2+}]$ externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo normalizada a la fluorescencia máxima registrada que se obtiene al adicionar Tx-100. Los trazos representados en diferentes colores muestran el efecto de la adición OMecAMP y Pg en diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Las gráficas de barras muestran el ΔPF inducido por OMecAMP y Pg normalizado con el ΔPF del Tx-100, respectivamente a diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular. $n =$ número de experimentos realizados.

E. Adiciones Sucesivas de OMecAMP y Pg en 2mM de Ca^{2+} externo.

Para tratar de entender si la vía de señalización activada por OMecAMP y la vía de señalización activada por Pg inducen un vaciamiento de los mismos reservorios de Ca^{2+} , decidimos hacer experimentos de adiciones sucesivas con el siguiente razonamiento: si hacemos adiciones sucesivas de OMecAMP en el MHR, vaciaremos el reservorio de Ca^{2+} de los espermatozoides activados por este compuesto. Si la Pg induce el vaciamiento del mismo reservorio que el OMecAMP, al adicionar Pg no debería de haber un aumento de Ca^{2+} . En cambio, si se adiciona Pg y se observa un aumento de

Ca^{2+} sugeriría que la vía de señalización inducida por la Pg involucra la participación de un reservorio de Ca^{2+} distinto al del OMecAMP.

La Figura 19 muestra que los espermatozoides no responden a un segundo estímulo de OMecAMP o de Pg (Figura 19A y 19B), aun dejando un lapso de 100 segundos entre la primera y segunda adición de OMecAMP o Pg (ver Figura 19C y 19D). Estos resultados no nos permiten discernir si las respuestas provienen de la misma o de diferente poza de calcio. A continuación se describe un protocolo que nos permitiría resolver este problema: Podríamos estimular a los espermatozoides con OMecAMP, posteriormente adicionar un segundo análogo al cAMP más potente (dibutiril-cAMP) para activar de nuevo a Epac (se esperaría registrar un segundo aumento de Ca^{2+}) y finalmente adicionar Pg para evaluar si este tercer estímulo induce un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Si la Pg no induce un aumento de Ca^{2+} , podríamos suponer que las vías de señalización activadas por OMecAMP y Pg comparten el reservorio de Ca^{2+} . Sin embargo, si se observa un aumento de Ca^{2+} , no podríamos saber si los dos agonistas activan el vaciamiento de la misma o diferente poza.

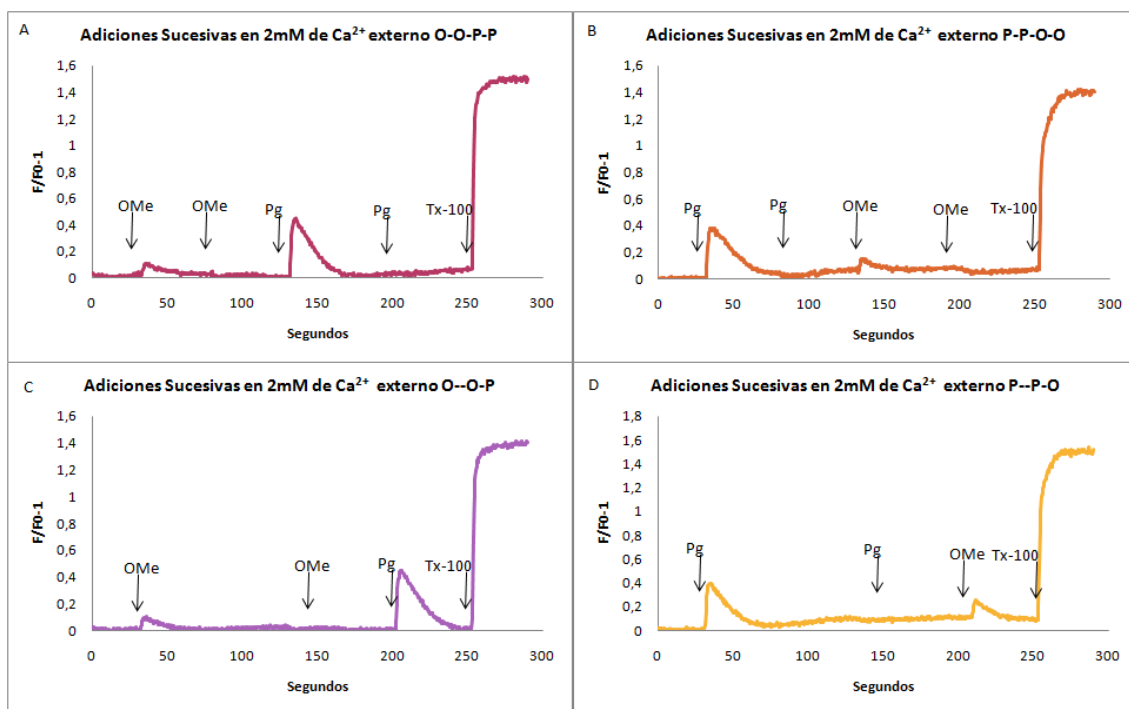


Figura 19. Adiciones Sucesivas de OMecAMP y Pg en 2mM de Ca^{2+} externo. A), B), C) y D) Se registró de la fluorescencia a lo largo del tiempo y se hicieron las adiciones indicadas por las flechas ($n \geq 4$).

F. La PKA no participa en la vía de señalización inducida por OMecAMP.

El OMecAMP se usa como un análogo del cAMP específico para Epac. Sin embargo, cabía la posibilidad de que en nuestro sistema el OMecAMP activara la vía de señalización inducida por otro blanco del cAMP, como por ejemplo la PKA. Por lo tanto, para descartar la participación de la PKA en el aumento de Ca^{2+} inducido por OMecAMP utilizamos dos inhibidores específicos para PKA (H-89 y RpcAMP). Las Figuras 20 y 21 muestran que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP y Pg no se inhibe en presencia de H-89 o RpcAMP en un MRH con 2mM de Ca^{2+} .

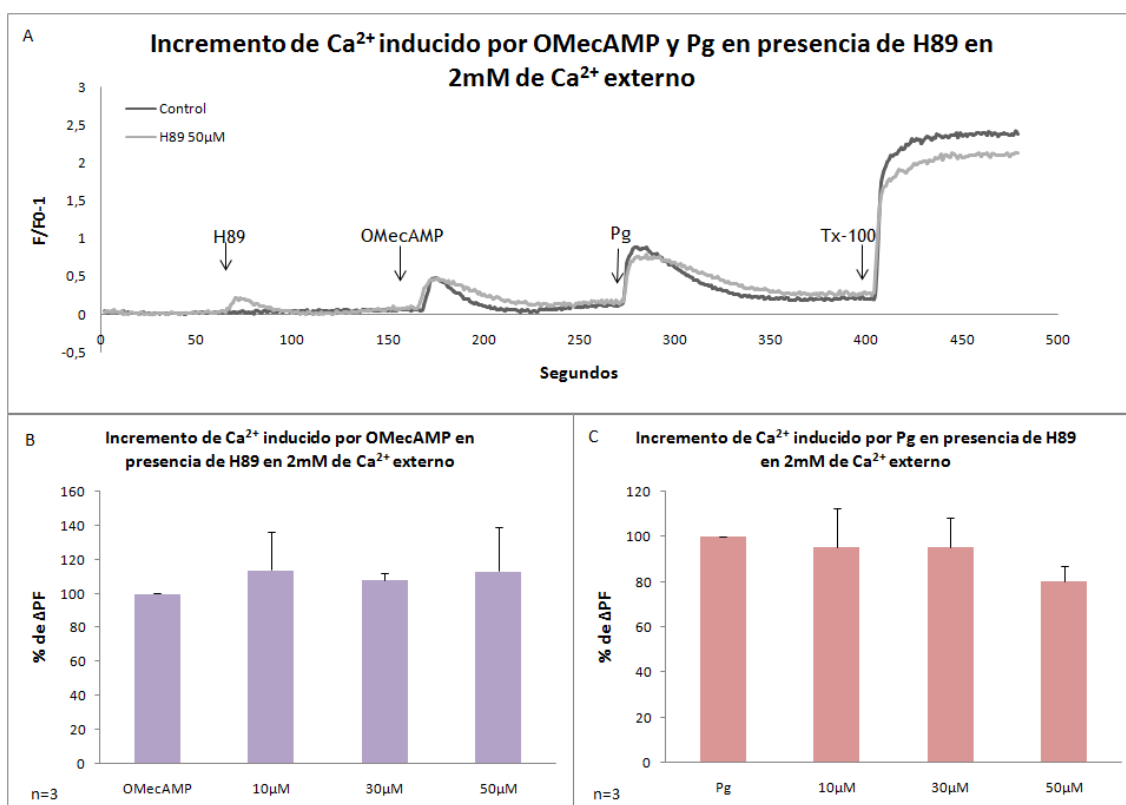


Figura 20. El H-89 no inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 50 μ M de H-89. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Gráfica de barras que muestran el % Δ PF (Δ PF normalizado con el control) inducido por OMecAMP y Pg, respectivamente, en presencia de 10, 30 y 50 μ M de H-89. n= número de experimentos realizados.

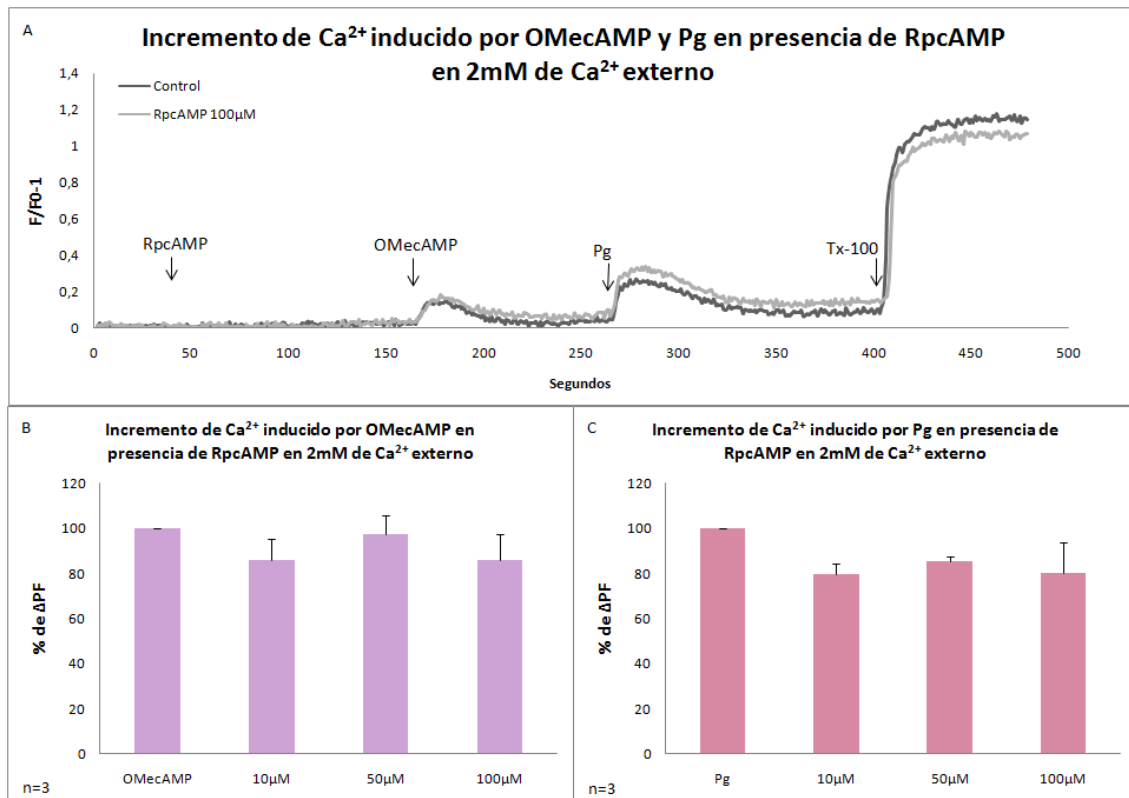


Figura 21. El RpcAMP no inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 50μM de RpcAMP. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Gráfica de barras que muestran el %ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMecAMP y Pg, respectivamente, en presencia de 10, 50 y 100μM de RpcAMP. n= número de experimentos realizados.

Estudios previos muestran la participación de PKA en el incremento de Ca^{2+} inducido por Pg en espermatozoides de humano [66]. Sin embargo, nuestras mediciones mostraron que la respuesta a Pg es insensible a H-89 y RpcAMP. Al comparar nuestras condiciones experimentales con las del grupo que reporta sensibilidad a H-89, detectamos una diferencia importante en la concentración de Ca^{2+} extracelular. Nosotros utilizamos 2mM mientras que en el otro trabajo se utilizó 0.5mM. Para evaluar si las discrepancias observadas eran consecuencia de la diferencia de concentración de Ca^{2+} utilizado en el medio, decidimos repetir nuestro experimento usando 0.5mM de Ca^{2+} . La Figura 22 y 23 muestran que en estas condiciones, el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP no se inhibe en presencia de los inhibidores de PKA. Sin embargo, el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por Pg si se inhibe en presencia de H-89 y RpcAMP.

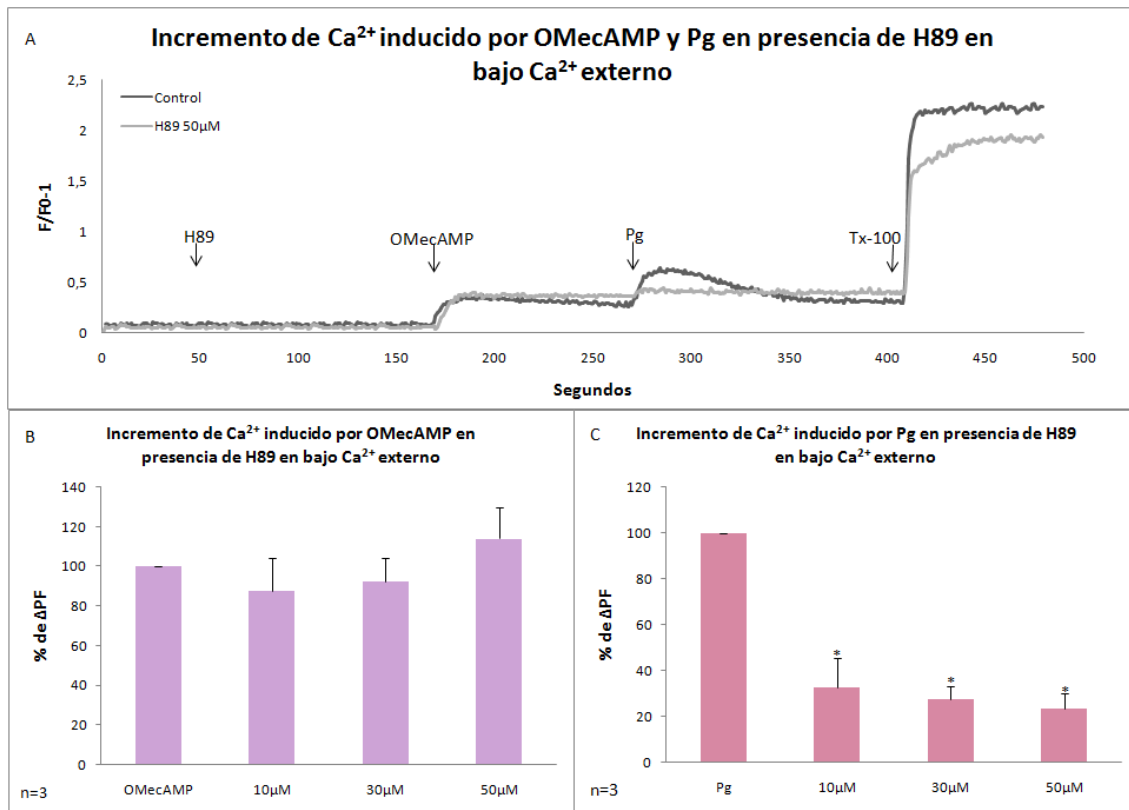


Figura 22. El H-89 no inhibe la respuesta inducida por OMeCAM pero si inhibe la respuesta inducida por Pg en bajo Ca²⁺ externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 50μM de H-89. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Gráfica de barras que muestran el %ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMeCAM y Pg, respectivamente, en presencia de 10, 30 y 50μM de H-89. *P<=0.05. n= número de experimentos realizados.

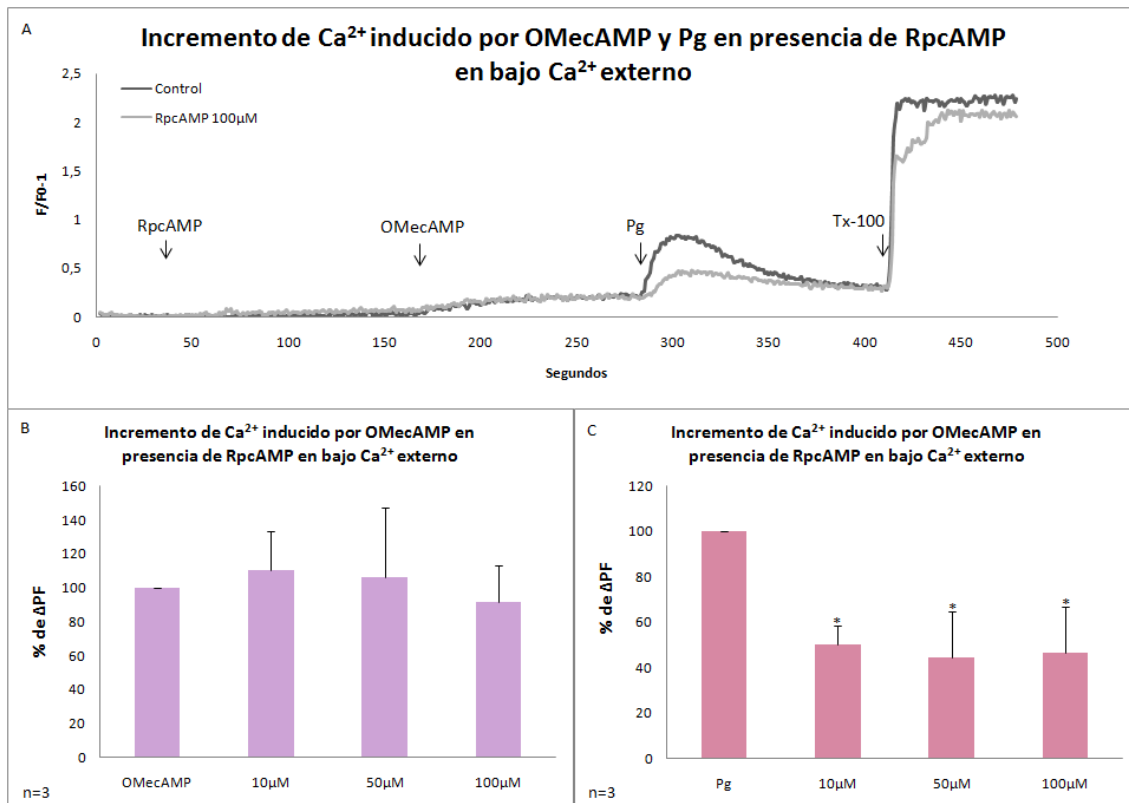


Figura 23. El RpcAMP no inhibe la respuesta inducida por OMeCAMPA pero si inhibe la respuesta inducida por Pg en bajo Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 50µM de RpcAMP. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Gráfica de barras que muestran el %ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMeCAMPA y Pg, respectivamente, en presencia de 10, 50 y 100µM de RpcAMP. * $P \leq 0.05$. n= número de experimentos realizados.

Para explorar la participación de entidades moleculares que podrían estar involucradas en la vía de señalización de OMeCAMPA y Pg (control interno), se midió el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en presencia de antagonistas para cada blanco a estudiar. En este trabajo se probó la participación de canales SOCs, IP_3R , los RyR, TPC y Ca_v .

G. Los canales tipo SOC participan en la vía de señalización inducida por OMeCAMPA y Pg.

De acuerdo con el modelo de la vía de señalización que nosotros proponemos, los canales tipo SOC están participando río arriba y río abajo de la señalización inducida por Epac, ya que el vaciamiento de pozas internas

generalmente precede la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. Para poder confirmar su participación en la vía de señalización activada por Epac, utilizamos antagonistas de los canales tipo SOC (SKF, Gd^{3+} y 2APB) en dos condiciones distintas de Ca^{2+} externo (2mM y bajo Ca^{2+}).

El SKF es un antagonista de los canales tipo SOC que se ha empleado en diferentes tipos celulares [103]. Los datos obtenidos con este compuesto sugieren que los canales tipo SOC no participan en la vía de señalización activada por OMecAMP ni por Pg, ya que, como se muestra en la Figura 24, el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP y por Pg no se bloquea en presencia de SKF en el medio con 2mM de Ca^{2+} .

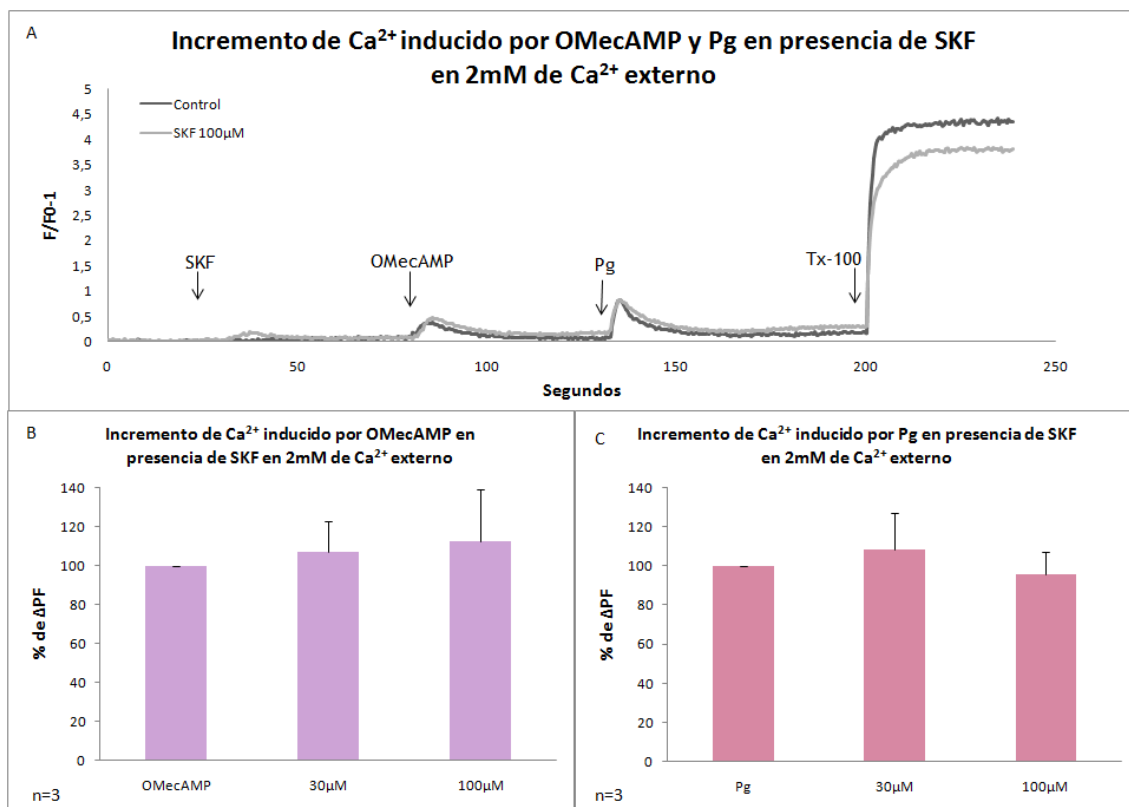


Figura 24. El SKF no inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 100 μM de SKF. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Gráfica de barras que muestran el % ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido OMecAMP y Pg, respectivamente, en presencia de 30 y 100 μM de SKF. n= número de experimentos realizados.

Cabe la posibilidad de que el OMecAMP y la Pg activen una vía de señalización que involucre a su vez diferentes canales de Ca^{2+} que actúen de forma cooperativa. De tal manera, que al inhibir a los canales tipo SOC no se ve altera el efecto de estos dos agonistas, ya que otros canales de Ca^{2+} podrían suplir la actividad de estos canales. Dependiendo de las condiciones en las cuales se encuentre el espermatozoide, su respuesta a ciertos estímulos podría ser diferente (ya que la conductancia y la selectividad de los canales pueden cambiar). Por lo que es importante manipular las concentraciones del medio para poder diferenciar la(s) fuente(s) de calcio involucradas en un estímulo. Así que decidimos probar este mismo inhibidor en un MRH con bajo Ca^{2+} .

La Figura 25 muestra claramente que en estas condiciones el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP y por Pg se bloquea en presencia de SKF. A partir de los datos se determinó una $\text{IC}_{50}=20\mu\text{M}$ para la respuesta inducida por OMecAMP y una $\text{IC}_{50}=8\mu\text{M}$ para la respuesta inducida por Pg. Estas IC_{50} obtenidas están en el rango de las IC_{50} reportadas para estos canales (ver Tabla1).

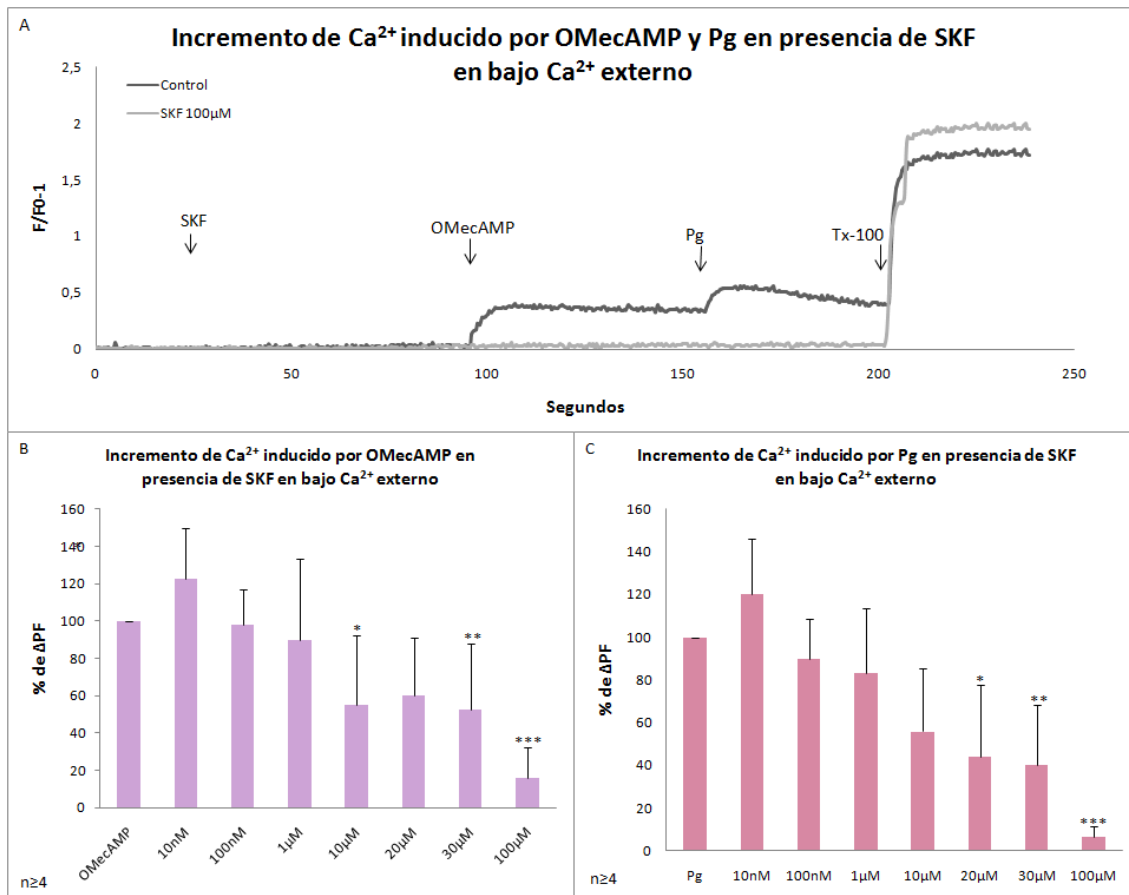


Figura 25. El SKF inhibe la respuesta inducida por OMEcAMP y Pg en bajo Ca²⁺ externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 100μM de SKF. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Gráfica de barras que muestran el %ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMEcAMP y Pg, respectivamente, en presencia desde 10nM hasta 100μM de SKF. *P<=0.05, **P<=0.01 y ***P<=0.001. n= número de experimentos realizados.

A pesar de que el SKF es un compuesto que se emplea como bloqueador de canales tipo SOC en muchos tipos celulares, se han reportado otros posibles blancos [103], por lo que decidimos utilizar otro bloqueador de los canales tipo SOC (2APB) para cerciorarnos de su participación en la vía de señalización inducida por el OMEcAMP y Pg.

En la Figura 26 se observa que la respuesta inducida por OMEcAMP y Pg se bloquea en presencia de 2APB en un MRH con 2mM de Ca²⁺. Se calculó una IC₅₀=8μM de para la respuesta inducida por OMEcAMP. El valor de la IC₅₀ calculada se asemeja a la IC₅₀ reportada para los canales Orai (ver Tabla 1).

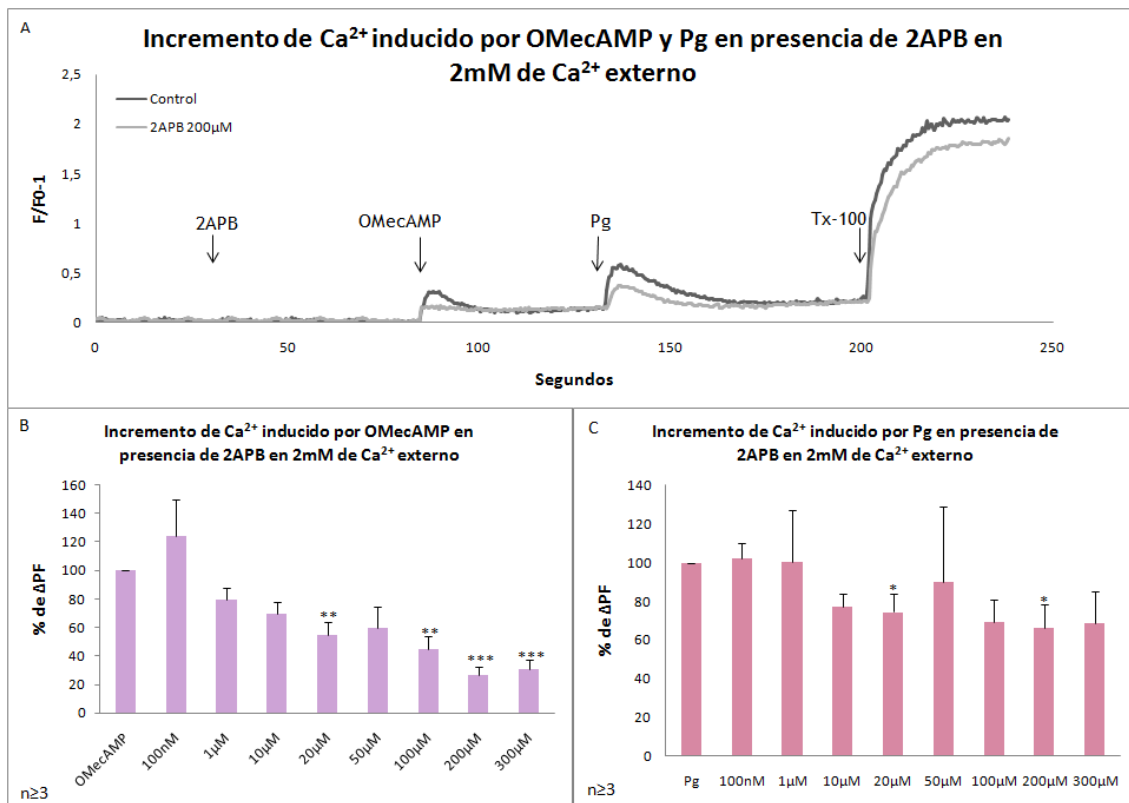


Figura 26. El 2APB inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca²⁺ externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 200μM de 2APB. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Gráfica de barras que muestran el %ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMecAMP y Pg, respectivamente, en presencia desde 100nM hasta 300μM de 2APB. *P<=0.05, **P<=0.01 y ***P<=0.001. n= número de experimentos realizados.

Dados los resultados obtenidos con SKF, decidimos evaluar también el 2APB en un medio externo con baja concentración de Ca²⁺. En la Figura 27 se puede ver claramente que el incremento de la [Ca²⁺]_i inducido tanto por OMecAMP como Pg se bloquea en presencia de 2APB. Los datos experimentales nos permitieron determinar una IC₅₀=105μM para la respuesta inducida por OMecAMP y una IC₅₀=56μM para la respuesta inducida por Pg.

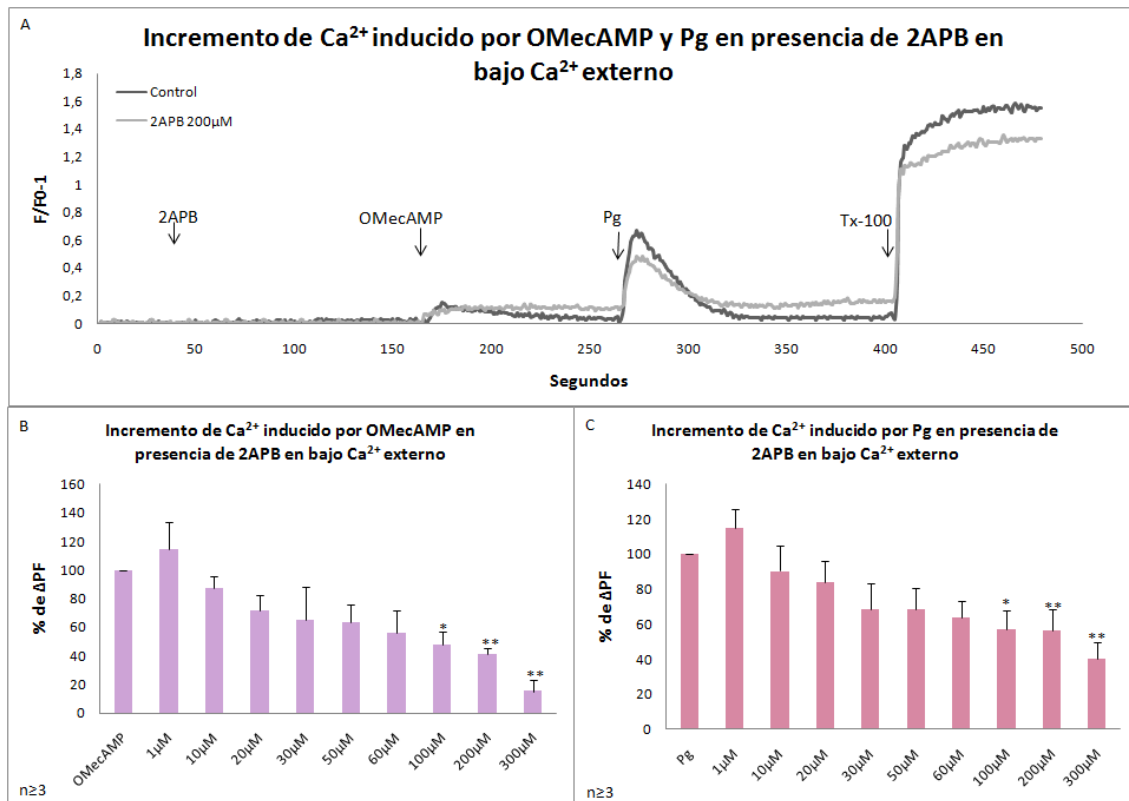


Figura 27. El 2APB inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en bajo Ca²⁺ externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 200μM de 2APB. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Gráfica de barras que muestran el %ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMecAMP y Pg, respectivamente, en presencia desde 1 hasta 300μM de 2APB. *P<=0.05 y **P<=0.01. n= número de experimentos realizados.

Como se puede observar en las Figuras 25 y 27, los antagonistas de los canales tipo SOC (SKF y 2APB) inhibieron la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en los espermatozoides que se encontraban en un MRH con bajo Ca²⁺. Sin embargo, los resultados no fueron consistentes cuando los espermatozoides se trataron en un MRH que tenía 2mM de Ca²⁺, ya que el SKF no inhibió significativamente la respuesta inducida por OMecAMP o Pg (ver Figura 24), en cambio, el 2APB si inhibió significativamente la respuesta inducida por estos agonistas (ver Figura 26) en esta condición. Como estos últimos resultados eran contradictorios decidimos utilizar un tercer inhibidor de los canales tipo SOC (Gd³⁺).

Las Figura 28 muestra que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP se bloquea en presencia de $200\mu M$ de Gd^{3+} en el medio. En cambio, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Pg no se bloquea en presencia de ninguna de las concentraciones de Gd^{3+} probadas.

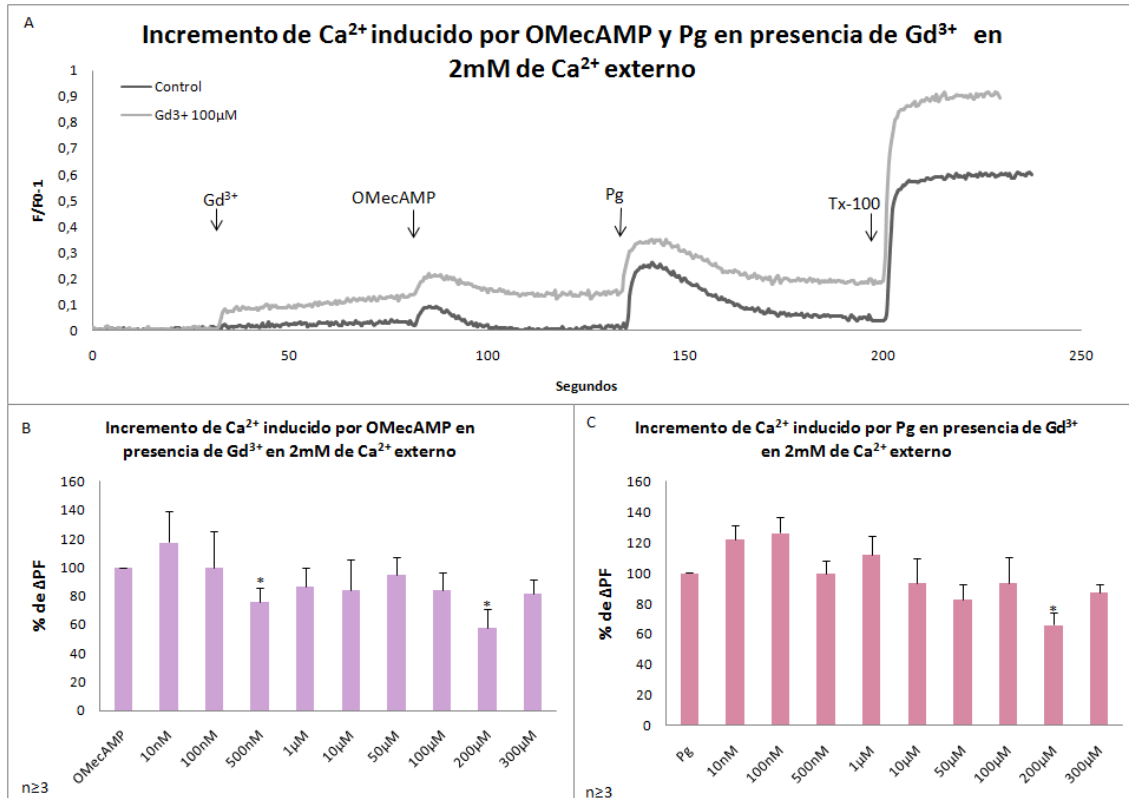


Figura 28. El Gd^{3+} inhibe la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en $2mM$ de Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó $100\mu M$ de Gd^{3+} . Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Gráfica de barras que muestran el % ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMecAMP y Pg, respectivamente, en presencia desde $10nM$ hasta $300\mu M$ de Gd^{3+} . * $P \leq 0.05$. n= número de experimentos realizados.

Cuando los espermatozoides se encontraban suspendidos en un MRH con bajo Ca^{2+} , la presencia de Gd^{3+} claramente inhibió el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido tanto por OMecAMP como Pg (ver Figura 29). Con los datos experimentales obtenidos se calculó una $IC_{50} = 56\mu M$ de Gd^{3+} para la respuesta inducida por OMecAMP (se asemeja a la IC_{50} reportada para los canales TRPC) y una $IC_{50} = 5\mu M$ de Gd^{3+} para la respuesta inducida por Pg (se asemeja a la IC_{50} reportada para los canales Orai).

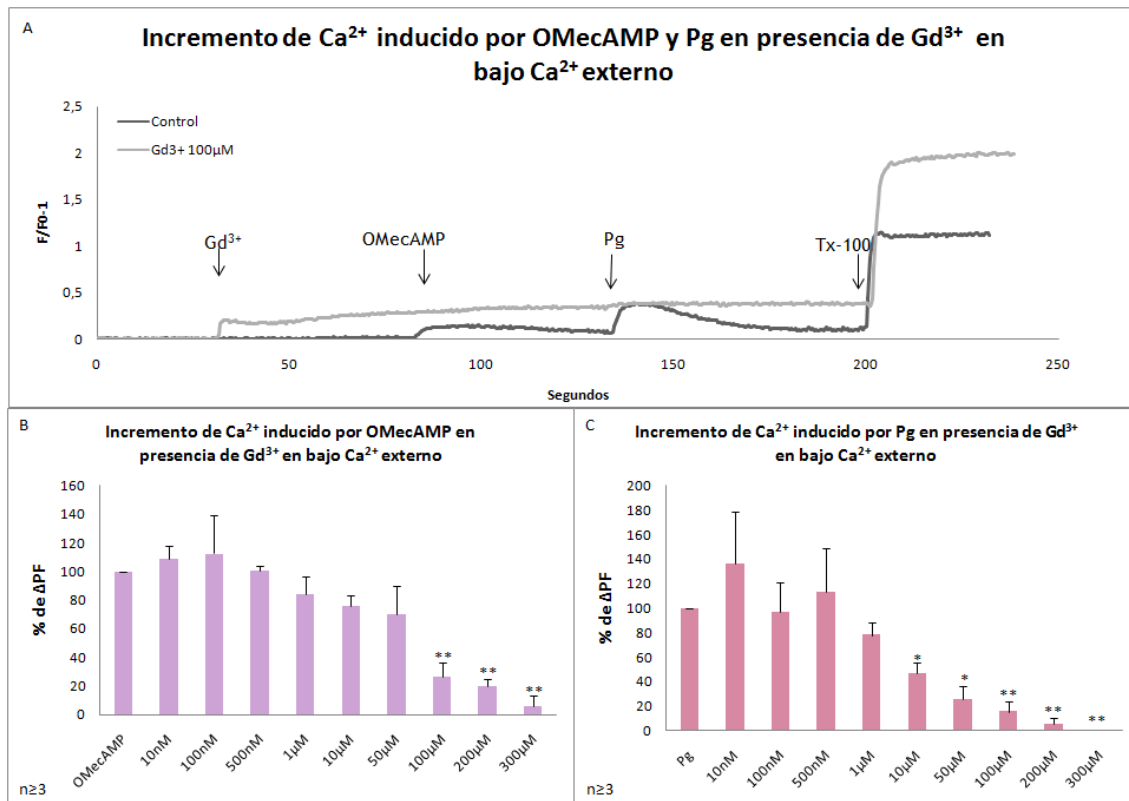


Figura 29. El Gd³⁺ inhibe la respuesta inducida por OMEcAMP y Pg en bajo Ca²⁺ externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 100µM de Gd³⁺. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Gráfica de barras que muestran el %ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMEcAMP y Pg, respectivamente, en presencia desde 10nM hasta 300µM de Gd³⁺. *P<=0.05 y **P<=0.01. n= número de experimentos realizados.

H. Los IP₃R participan en la vía de señalización inducida por OMEcAMP y Pg.

En nuestro modelo de la vía de señalización de la RA consideramos el vaciamiento de Ca²⁺ de las pozas internas. Con el propósito de encontrar las entidades moleculares que participan en este vaciamiento utilizamos XC (Xestospongina-C, un antagonista de los IP₃R), Dtl (Dantroleno, un antagonista de los RyR) y Ned19 (un antagonista de los TPC).

Los IP₃R permiten la liberación de Ca²⁺ de reservorios de este mismo catión en diferentes tipos celulares y están implicados en diferentes vías de señalización. Así que decidimos evaluar su participación en la vía de

señalización inducida por OMecAMP y Pg. Como se puede observar en la Figura 30, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP y Pg se inhibe en presencia de XC en el MRH con 2mM de Ca^{2+} . Estos resultados apoyan nuestro modelo, ya que sugieren que los IP_3R están involucrados en la vía de señalización inducida por OMecAMP.

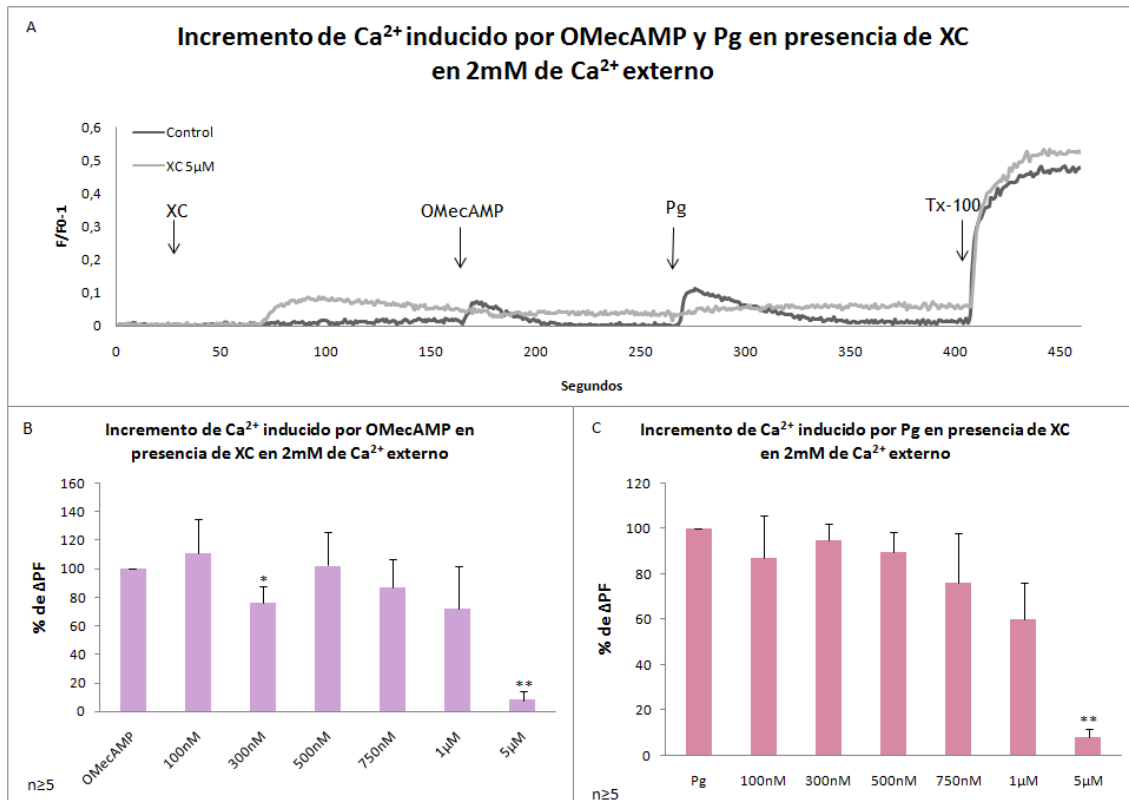


Figura 30. Los IP_3R participan en la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo rosa se le adicionó 0.5 μ M de XC. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Las gráficas de barras muestran el % Δ PF (Δ PF normalizado con el control) inducido por OMecAMP y Pg, respectivamente, el cual no es afectado en presencia de XC. * $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.01$. n = número de experimentos realizados.

De forma análoga a los experimentos anteriores, probamos el efecto de XC en un MRH que con bajo $[Ca^{2+}]_i$. En la Figura 31 se puede observar que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP y Pg también se inhibe en presencia de XC cuando los espermatozoides se encuentran suspendidos en un medio con bajo Ca^{2+} .

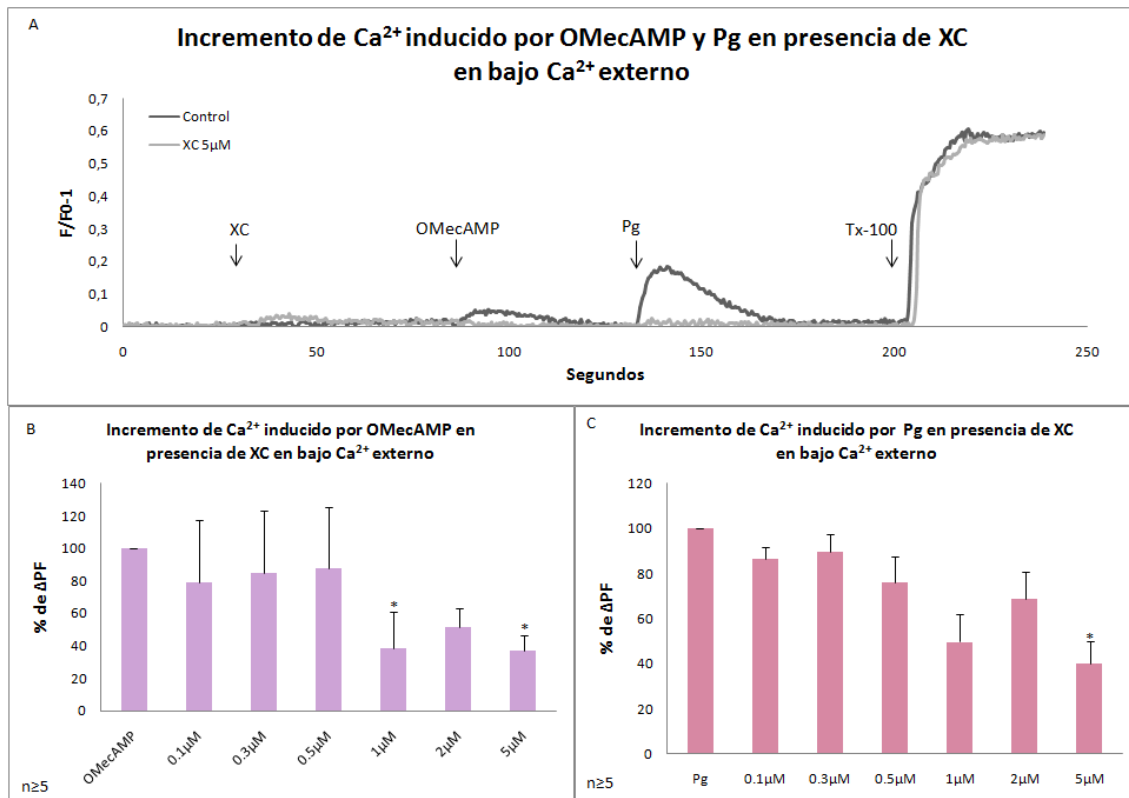


Figura 31. Los IP_3R participan en la respuesta inducida por OMeCAMPA y Pg en bajo Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo rosa se le adicionó $5\mu\text{M}$ de XC. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Las gráficas de barras muestran la dosis respuesta de XC sobre el % ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMeCAMPA y Pg, respectivamente. * $P \leq 0.05$. n= número de experimentos realizados.

I. Los RyR no participan en la vía de señalización inducida por OMeCAMPA ni Pg.

Al igual que los IP_3R , se ha reportado que los RyR permiten la liberación de Ca^{2+} de pozas internas. En algunos tipos celulares se requiere la participación de ambos canales en las diferentes vías de señalización, que involucran liberación de Ca^{2+} de reservorios internos, y en otros tipos celulares sólo se requiere la participación de uno de ellos. Nosotros decidimos evaluar la participación de los RyR en la respuesta inducida por OMeCAMPA y Pg.

Los resultados que se pueden observar en las Figuras 32 y 33 sugieren que los RyR no participan en la vía de señalización de la RA inducida por OMecAMP ni Pg, ya que en ninguna de las condiciones de Ca^{2+} en el MRH probadas (2mM y bajo Ca^{2+}) se observó una disminución del aumento de inducido por ninguno de los agonistas en presencia de antagonistas para estos canales. A pesar de que se obtuvo una inhibición significativa en el aumento de Ca^{2+} inducido por Pg en un MRH de bajo Ca^{2+} en presencia de 30 μM de Dtl. Nosotros pensamos que este efecto es inespecífico, ya que la IC_{50} debe estar entre 0.3-2 μM .

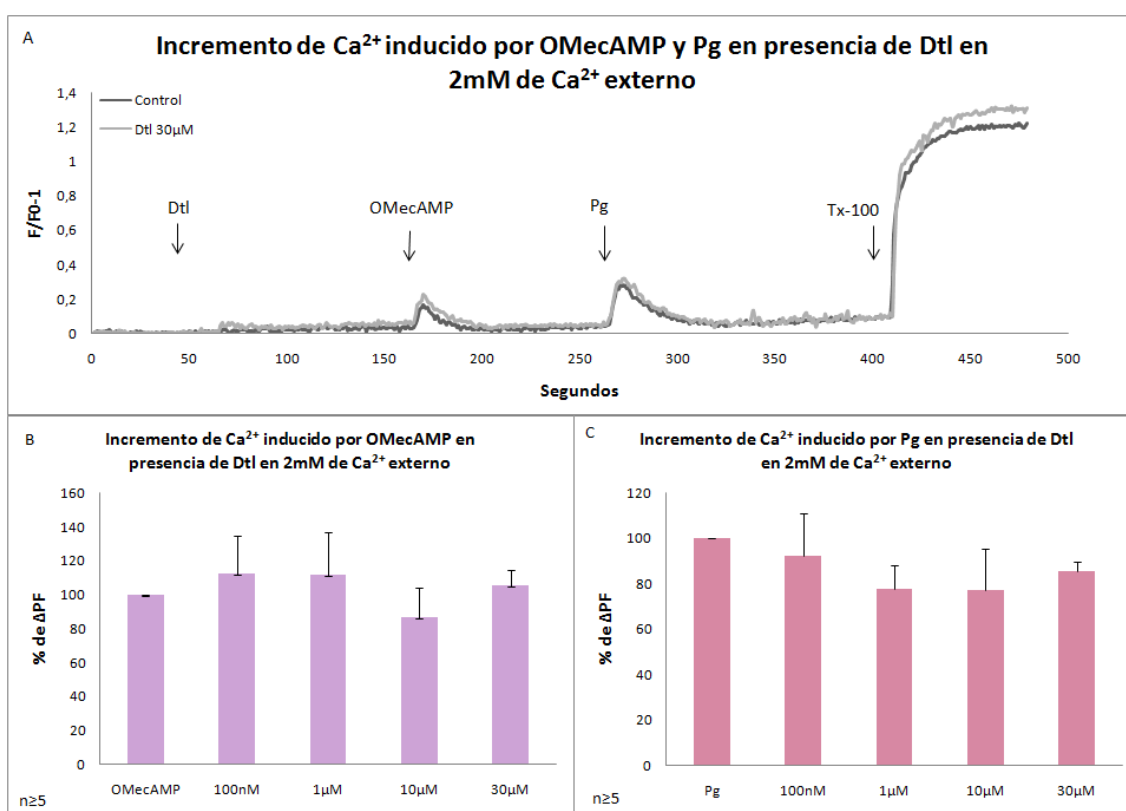


Figura 32. Los RyR no participan en la respuesta inducida por OMecAMP ni Pg en 2mM de Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 30 μM de Dtl. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Las gráficas de barras muestran la dosis respuesta de Dtl sobre el % ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMecAMP y Pg, respectivamente. n= número de experimentos realizados.

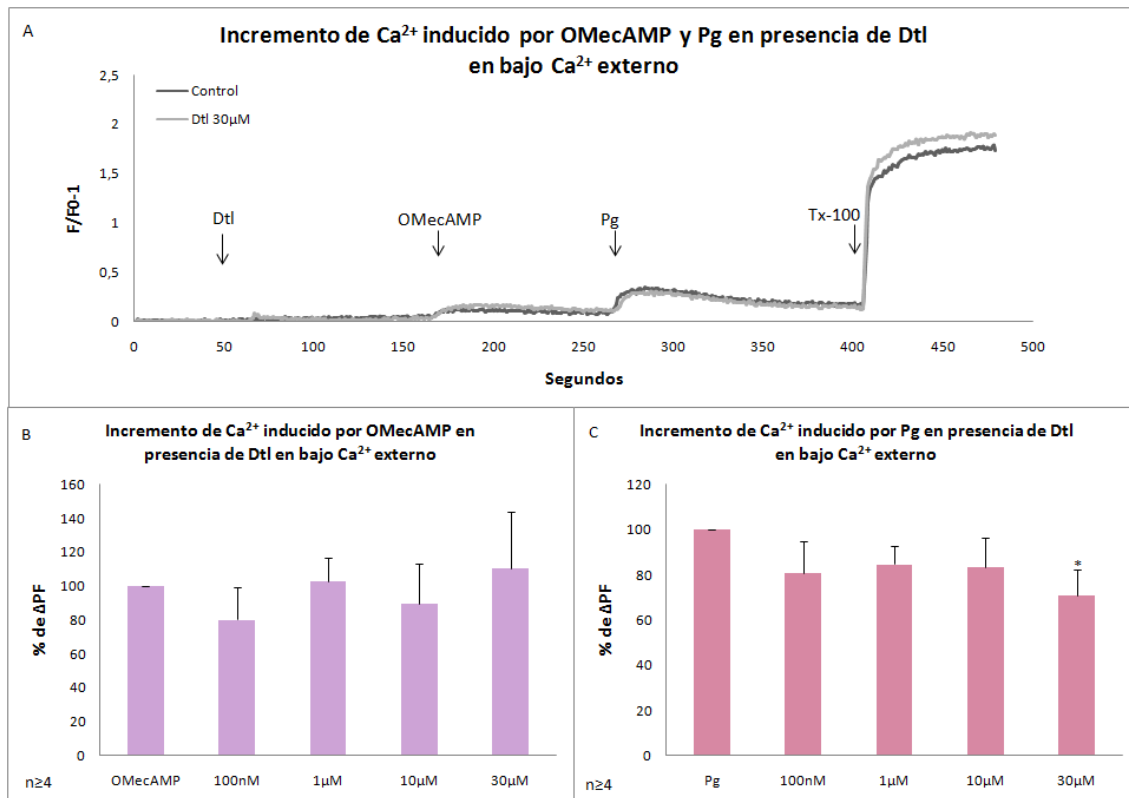


Figura 33. Los RyR no participan en la respuesta inducida por OMeAMP ni Pg en bajo Ca²⁺ externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 30μM de Dtl. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Las gráficas de barras muestran la dosis respuesta de Dtl sobre el %ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMeAMP y Pg, respectivamente. n= número de experimentos realizados.

J. Los TPC participan en la vía de señalización inducida por OMeAMP y Pg.

En distintos tipos celulares se ha descrito que los TPC permiten la salida de Ca²⁺ de pozas internas ácidas. Esta salida inicial promueve una salida Ca²⁺ de pozas internas con mayor amplitud mediada por los IP₃R o RyR. Aún no se ha reportado la presencia y/o participación de estos canales en los espermatozoides. Sin embargo, experimentos preliminares permiten suponer la presencia de estos canales en espermatozoides de humano (comunicación personal, A.Sánchez) por lo que decidimos evaluar su papel en la respuesta inducida por OMeAMP y Pg, utilizando un inhibidor específico para estos canales (Ned19) [113].

En la Figura 34 se puede observar que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido tanto por OMecAMP como Pg es bloqueado en presencia de Ned19 en un medio que contenía 2mM Ca^{2+} . Con los datos experimentales se determinó una $IC_{50}=53\pm 8\mu M$ para la respuesta inducida por OMecAMP y una $IC_{50}=38\pm 5\mu M$ para la respuesta inducida por Pg en un medio que contenía 2mM Ca^{2+} .

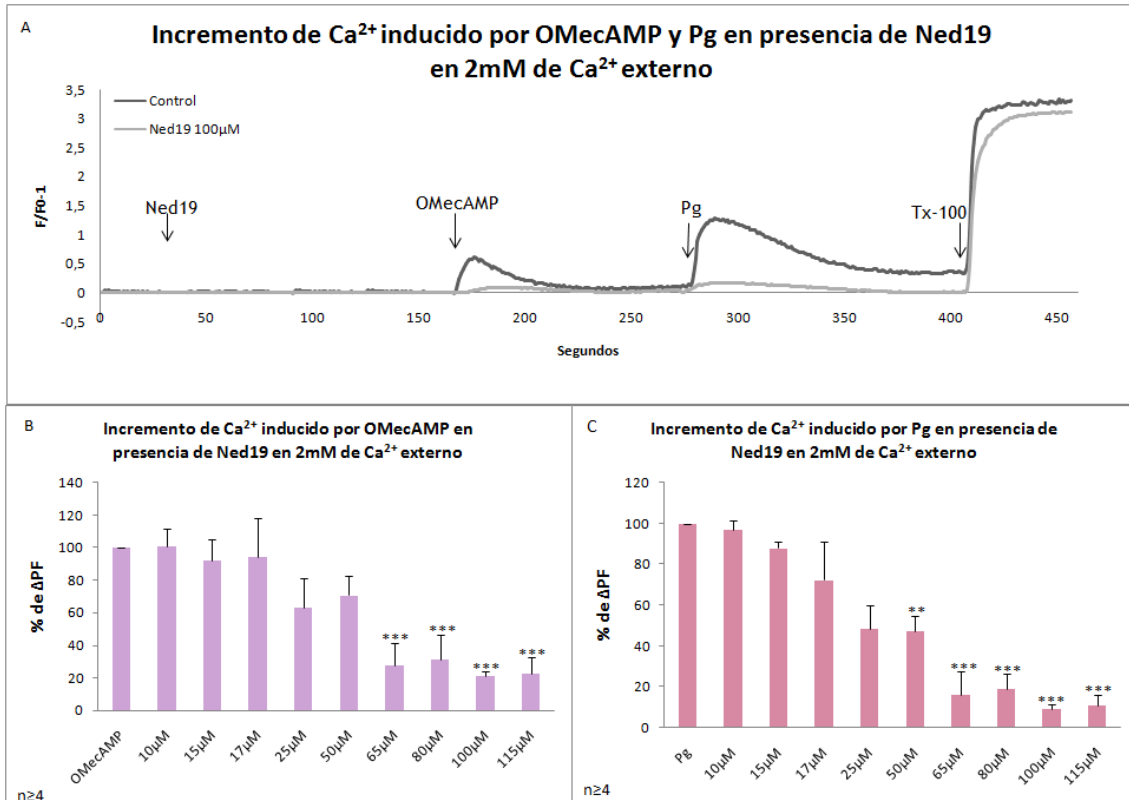


Figura 34. Los TPCs participan en la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 100 μM de Ned19. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Las gráficas de barras muestran la dosis respuesta de Ned19 sobre el % ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMecAMP y Pg, respectivamente, en presencia desde 10 hasta 115 μM de Ned19. ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. n= número de experimentos realizados.

Como los TPC movilizan Ca^{2+} de reservorios de Ca^{2+} , estos canales deberían de participar aún si se remueve el Ca^{2+} del medio externo, así que decidimos probar su participación en esta condición. Como se puede observar en la Figura 35, el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido tanto por OMecAMP como Pg se bloquea en presencia de Ned19 en un medio que contenía bajo Ca^{2+} . Las IC_{50} determinadas fueron: $12\mu\text{M}$ para la respuesta inducida por OMecAMP y $13\mu\text{M}$ para la respuesta inducida por Pg.

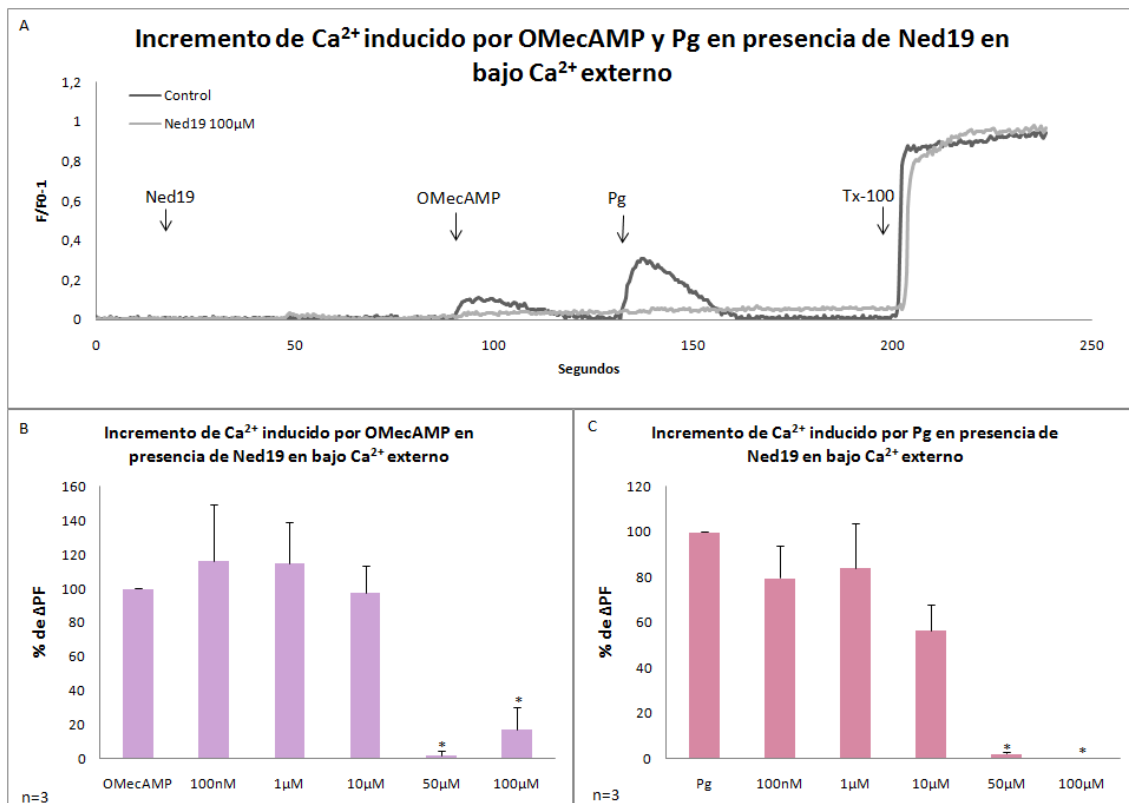


Figura 35. Los TPCs participan en la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en bajo Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó $100\mu\text{M}$ de Ned19. Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Las gráficas de barras muestran la dosis respuesta de Ned19 sobre el % ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMecAMP y Pg, respectivamente, en presencia desde 100nM hasta $100\mu\text{M}$ de Ned19. * $P < 0.05$. n= número de experimentos realizados.

K. Los canales Ca_v no participan en la vía de señalización inducida por OMecAMP y Pg.

De acuerdo con el modelo de la vía de señalización que nosotros proponemos, los canales Ca_v no deberían participar en la respuesta inducida por OMecAMP, ya que nosotros estamos estimulando la vía en una etapa posterior a la participación de estos canales. Para corroborar la secuencia de eventos propuestos utilizamos dos antagonistas de los canales Ca_v (Nifedipina y Mibefradil), en un medio que contenía 2mM de Ca^{2+} externo. La Figura 36 y 37 muestran que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP y por Pg no se bloquea en presencia de Nifedipina (Nf) ni Mibefradil (Mb).

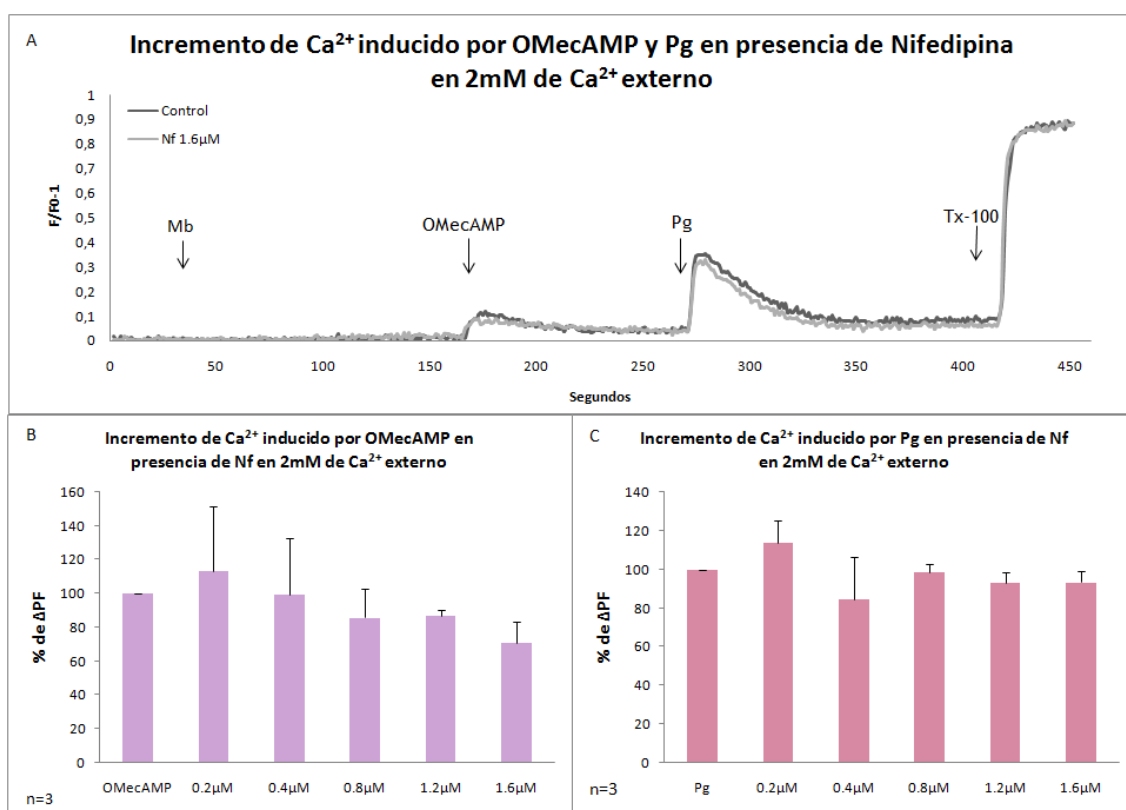


Figura 36. La Nifedipina no inhibe la respuesta inducida por OMecAMP ni Pg en 2mM de Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 1.6 μ M de Nf (antagonista de los canales Ca_v). Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Las gráficas de barras muestran el % Δ PF (Δ PF normalizado con el control) inducido por OMecAMP y Pg, respectivamente, no es inhibido en presencia de Nf. n= número de experimentos realizados.

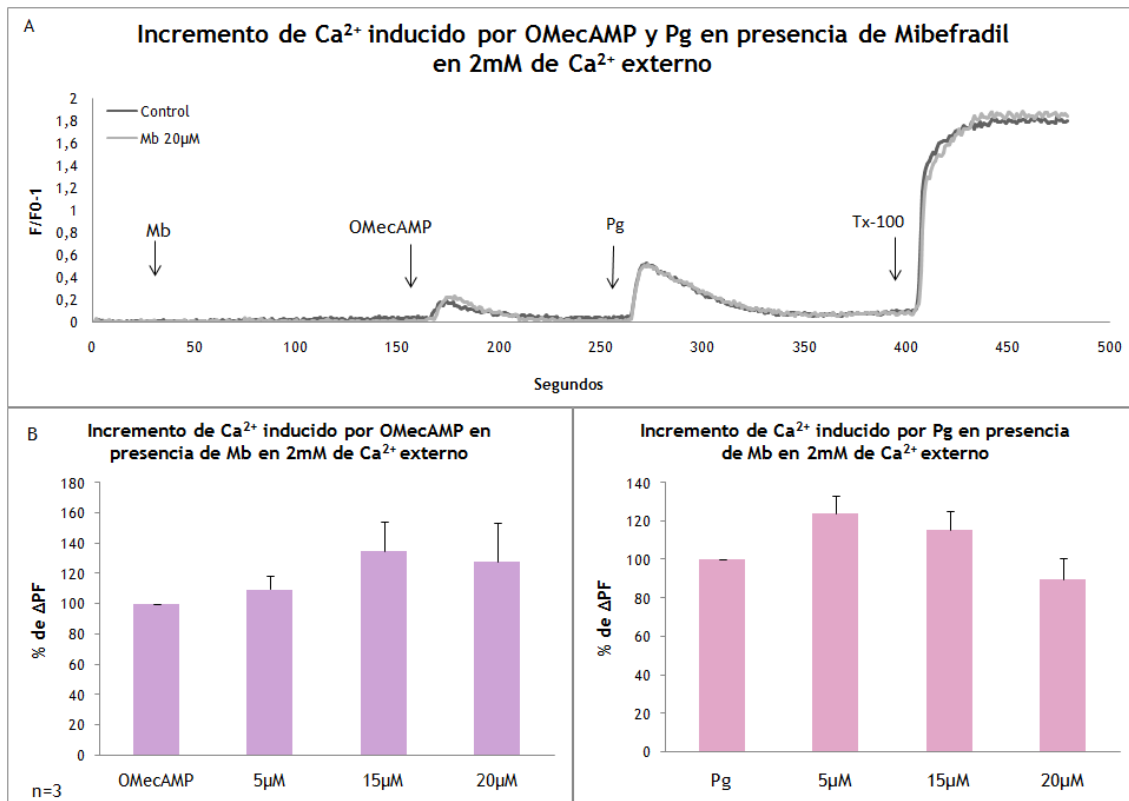


Figura 37. El Mibefradil no inhibe la respuesta inducida por OMeCAMPA ni Pg en 2mM de Ca^{2+} externo. A) Registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El trazo color negro es el control y al trazo gris se le adicionó 20 μM de Mb (antagonista de los canales Ca_v). Las flechas indican el tiempo en el cual se adicionaron los compuestos. B) y C) Las gráficas de barras muestran el % ΔPF (ΔPF normalizado con el control) inducido por OMeCAMPA y Pg, respectivamente, no es inhibido en presencia de Mb. n= número de experimentos realizados.

L. Canales implicados en la RA inducida por OMeCAMPA.

El hecho de que los inhibidores disminuyan el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por OMeCAMPA no implica necesariamente que inhiban todo el proceso de la RA inducido por este mismo compuesto. Así que, finalmente, medimos la RA en presencia de los inhibidores exitosos para poder correlacionar el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con la inducción de la RA.

En la Figura 38 se muestra que el SKF no inhibe de forma significativa la inducción de la RA por OMecAMP. Por otro lado, la presencia del inhibidor 2APB incrementa el índice del %RA, por lo que no podemos interpretar los resultados obtenidos. En presencia del otro inhibidor de los canales SOC, el Gd^{3+} , se inhibe de forma significativa la RA inducida por OMecAMP.

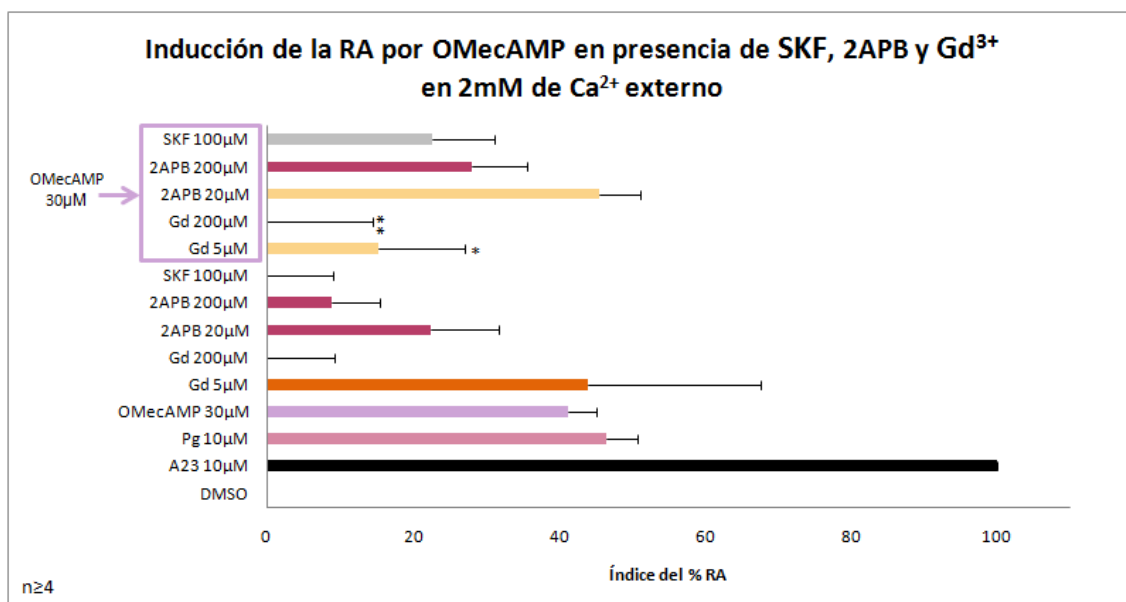


Figura 38. Inducción de la RA por OMecAMP en presencia de SKF, 2APB y Gd^{3+} en 2mM de Ca^{2+} externo. La gráfica de barras muestra los índices del %RA (ver métodos) obtenidos a partir de las diferentes condiciones probadas. La barra negra (espermatozoides tratados con A23) representa la máxima inducción de la RA obtenida, la barra rosa representa el promedio de los índices del %RA obtenido con Pg y la barra lila representa el promedio de los índices del %RA obtenido con OMecAMP. Las barras en las que se adicionaron sólo los inhibidores muestran que el Gd^{3+} y el 2APB inducen la RA. Las barras en las que se adicionaron los inhibidores junto con OMecAMP muestran que la inducción de la RA por este compuesto es fuertemente inhibida sólo en presencia de Gd^{3+} . * $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.01$. n= número de experimentos realizados.

Los resultados que se observan en la Figura 39 sugieren que los IP_3R y los TPC son esenciales para que la inducción de la RA por OMecAMP pueda ocurrir, ya que en presencia de los antagonistas de estas entidades moleculares, se inhibe la RA inducida por OMecAMP.

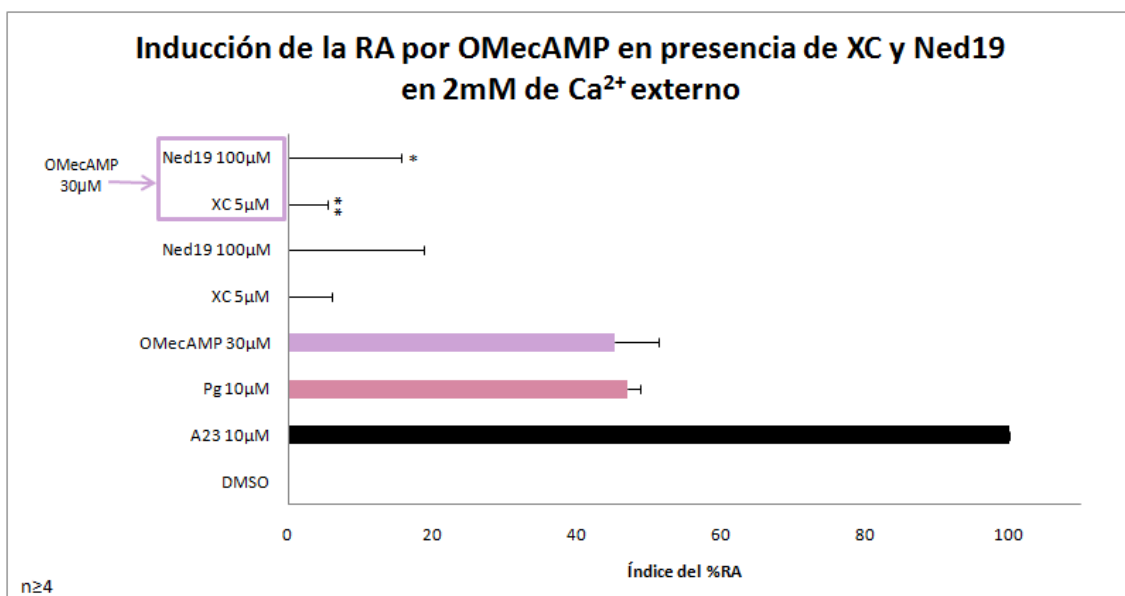


Figura 39. Inducción de la RA por OMecAMP en presencia de XC y Ned19 en 2mM de Ca²⁺ externo. La gráfica de barras muestra los índices del %RA (ver métodos) obtenidos a partir de las diferentes condiciones probadas. La barra negra (espermatozoides tratados con A23) representa la máxima inducción de la RA obtenida, la barra rosa representa el promedio de los índices del %RA obtenido con Pg y la barra lila representa el promedio de los índices del %RA obtenido con OMecAMP. Las barras en las que se adicionaron sólo los inhibidores muestran, que éstos compuestos no inducen la RA de forma significativa. Las barras en las que se adicionaron los inhibidores junto con OMecAMP muestran que la inducción de la RA por este compuesto es fuertemente inhibida. *P<=0.05 y **P<=0.01. n= número de experimentos realizados.

VII. Discusión

La respuesta inducida por OMecAMP y Pg es de la misma magnitud en los espermatozoides capacitados y no capacitados. Esto sugiere que todos los cambios bioquímicos, moleculares y fisiológicos que los espermatozoides llevan a cabo durante la capacitación no son necesarios para desencadenar la vía de señalización inducida por el OMecAMP y Pg. Sin embargo, sí se observaron algunas diferencias entre los espermatozoides capacitados y no capacitados. Por ejemplo, se observó que la fluorescencia basal (datos no mostrados) de los espermatozoides capacitados era significativamente mayor que la de los espermatozoides que no fueron capacitados, estos resultados no fueron sorprendentes, ya que se sabe que durante la capacitación la [Ca²⁺]_i

aumenta (de ~100nM a ~200nM [1]). No obstante, la respuesta máxima de fluorescencia obtenida con Tx-100 fue mayor en los espermatozoides no capacitados que en los capacitados. Esto sugiere que existe también una diferencia en el cargado del colorante, lo que podría reflejar una composición diferente de la membrana plasmática, ya que muchos de los cambios durante la capacitación involucran rearrreglos de la MP, por lo cual es factible que cambie sus propiedades de permeabilidad, además la actividad de esterasas puede ser diferente en los espermatozoides capacitados y no capacitados.

Nuestros resultados sugieren que los espermatozoides capacitados y no capacitados tienen una respuesta de la misma magnitud al ser estimulados con Pg. Estos resultados son contradictorios con un reporte previo que muestra que la Pg produce una respuesta diferencial en los espermatozoides antes y después de la capacitación [117]. Sin embargo, en ese trabajo sólo comparan el aumento en la intensidad de fluorescencia de las dos poblaciones de espermatozoides sin tomar en cuenta las diferencias de cargado del colorante (Fluo3-AM) que presentan las células. Para resolver esta controversia, podríamos repetir los experimentos utilizando un colorante fluorescente de razón sensible a Ca^{2+} (Fura2) que nos permita cuantificar el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por los dos agonistas en espermatozoides capacitados y no capacitados.

Como se puede observar en la Figura17, la respuesta inducida por OMecAMP y Pg depende de la concentración de Ca^{2+} extracelular (la respuesta a Pg se utilizó como control positivo, ya se reportó que su respuesta involucra tanto la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular como la salida de Ca^{2+} de los reservorios de Ca^{2+} [118].) En los experimentos realizados en este trabajo se trataron a los espermatozoides en MRH que contenían diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$ (desde 150nM hasta 1.8 μM), se observó que la amplitud de la respuesta inducida por estos dos agonistas aumentaba conforme incrementaba la $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular. Como se detectó una respuesta al adicionar los agonistas cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ era aproximadamente igual a la del citoplasma (150nM) podemos concluir que la vía de señalización inducida por estos dos agonistas involucra tanto la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular como la salida de Ca^{2+} de los reservorios de

Ca^{2+} . Por otro lado, se obtuvo la respuesta máxima inducida por Pg en un MRH que tuviera a partir de $250\mu\text{M}$ de Ca^{2+} , en cambio la respuesta máxima de OMecAMP se obtuvo hasta que la $[\text{Ca}^{2+}]$ del medio extracelular era 1.8mM . Estos resultados muestran que la respuesta inducida por Pg es menos dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular que la respuesta inducida por OMecAMP, podría ser que la Pg active canales de Ca^{2+} de la MP diferentes a los que activa el OMecAMP, y que los canales activados por Pg son más selectivos a Ca^{2+} en bajas $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular, que los que son activados por OMecAMP.

Nuestros resultados muestran que la cinética del aumento de Ca^{2+} inducido por OMecAMP varía en función de la $[\text{Ca}^{2+}]$ del medio extracelular en el cual se encuentren suspendidos los espermatozoides. Cuando los espermatozoides se encuentran en un medio con alta $[\text{Ca}^{2+}]$ ($\sim 2\text{mM}$) el aumento de Ca^{2+} inducido por OMecAMP es rápido y regresa al estado basal. En cambio, cuando los espermatozoides se encuentran en un medio con bajo $[\text{Ca}^{2+}]$ ($\sim 500\text{nM}$) el aumento de Ca^{2+} es más lento y la mayoría de las veces no regresa al estado basal. El hecho de que el aumento de Ca^{2+} sea más rápido cuando los espermatozoides se encuentran en un medio con alta $[\text{Ca}^{2+}]$ a comparación de bajo, se debe al hecho de que el influjo de Ca es menor. Por otro lado, el hecho de que ese debe explica Después de la adición de En los resultados obtenidos se observó que al La amplitud de la respuesta inducida por OMecAMP es mayor cuando el Ca^{2+} es 2mM en el medio externo, en esta condición se activan los mecanismos que llevan a la célula a la homeostasis, por lo tanto el Ca^{2+} vuelve al estado basal. En cambio, cuando se tratan a los espermatozoides con bajo Ca^{2+} en el medio externo, la respuesta inducida por OMecAMP es menor y no se activan todos los mecanismos de homeostasis, por lo que se observa una disminución de Ca^{2+} , pero no vuelve al estado basal.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de adiciones sucesivas (ver Figura 18) sugieren que la vía de señalización activada por OMecAMP y Pg se desensibiliza, es decir, una vez que los espermatozoides responden a estos compuestos las vías de señalización quedan de alguna manera inactivas. Por otro lado, los experimentos realizados no nos permitieron elucidar si los dos agonistas inducen el vaciamiento de los mismos o diferentes reservorios de Ca^{2+} .

Los resultados obtenidos en las Figuras 19 y 20 mostraron que la PKA no está involucrada en la vía de señalización inducida por OMecAMP ni Pg cuando los espermatozoides se encuentran en un medio con 2mM de Ca^{2+} . Puesto que la presencia de inhibidores específicos de la PKA (H-89 y RpcAMP) no disminuyen el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por la adición de OMecAMP ni Pg en los espermatozoides. Nosotros esperábamos que no se inhibiera la respuesta inducida por OMecAMP, sin embargo, con respecto a la Pg, este resultado era contradictorio con lo que se ha reportado previamente [66, 119], por lo que decidimos evaluar estos mismos inhibidores en las mismas condiciones experimentales que fueron utilizadas en los reportes previos, esto es, utilizando un MRH con bajo Ca^{2+} . En esta condición, los inhibidores de la PKA no afectaron la respuesta inducida por OMecAMP, pero sí inhibieron significativamente la respuesta inducida por Pg (ver Figura 21 y 22). Los resultados obtenidos prueban que en la respuesta inducida por OMecAMP la PKA no está involucrada en ninguna de las condiciones probadas. No obstante, la PKA juega un papel importante en la respuesta inducida por Pg sólo cuando el medio extracelular tiene bajo Ca^{2+} . Nosotros proponemos que esto se debe al hecho de que la Pg induce la activación de dos vías paralelas que son complementarias. Una de ellas depende de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular y la otra del vaciamiento de Ca^{2+} de los reservorios de Ca^{2+} . De tal forma que cuando se remueve el Ca^{2+} del medio extracelular, sólo puede actuar la segunda vía de señalización, la cual es dependiente de PKA.

Todos los inhibidores de los canales tipo SOC utilizados en este trabajo inhibieron el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP y Pg cuando los espermatozoides se encontraban en un MRH con bajo Ca^{2+} . Esto prueba la

participación de estos canales en la vía de señalización inducida por estos dos agonistas en esta condición. Sin embargo, no todos los inhibidores de los canales tipo SOC utilizados inhibieron significativamente la respuesta inducida por OMecAMP y Pg cuando los espermatozoides se encontraban en un MRH con 2mM de Ca^{2+} . Esto sugiere que en la vía de señalización inducida por OMecAMP y Pg se activan múltiples canales tipo SOC con propiedades diferentes y dependencia a Ca^{2+} externo diferente.

Tenemos que tomar en cuenta que para inhibir la respuesta inducida por OMecAMP con Gd^{3+} se necesita utilizar 100 μM . Al adicionar ésta cantidad de Gd^{3+} , claramente se observa un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, esto probablemente se deba a la activación directa de canales de Ca^{2+} (100 μM de Gd^{3+} activa TRPC 4 y 5 [58]). Por lo tanto, puede ser que esta inhibición observada se deba al aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se produce al adicionar Gd^{3+} y no por la inhibición de canales que están involucrados en la vía de señalización inducida por OMecAMP.

Los resultados de la Figura 37 muestran que el SKF no inhibe de forma significativa la inducción de la RA por OMecAMP. Esto concuerda con los resultados obtenidos en las mediciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ya que se observó que en presencia de este antagonista no se inhibe el incremento de Ca^{2+} inducido por OMecAMP, cuando los espermatozoides se encuentran en 2mM de Ca^{2+} externo. Por otro lado, la presencia del inhibidor 2APB incrementa el índice del porcentaje de RA, por lo que no podemos interpretar los resultados obtenidos en nuestros experimentos.

En presencia del otro inhibidor de los canales SOC, el Gd^{3+} , se inhibe de forma significativa la RA inducida por OMecAMP. Nosotros esperábamos este resultado, ya que se había observado que en presencia del Gd^{3+} el incremento $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP se inhibe. Por otro lado, se puede observar que el Gd^{3+} induce un aumento en el porcentaje de RA espontánea, esto seguramente se debe al hecho de que éste ion aumenta el nivel basal de Ca^{2+} en el citoplasma de los espermatozoides (ver Figura 28 y 29).

A pesar de que los tres inhibidores de los canales tipo SOC que utilizamos en este trabajo son los más empleados para caracterizar a este tipo de canales, su selectividad no es tan buena, es decir, no podemos saber con certeza cuál es la entidad molecular involucrada (Orai o TRPC). Para poder caracterizar con exactitud las proteínas que participa en la vía de señalización inducida por OMecAMP y por Pg podríamos emplear inhibidores más específicos que han sido recientemente sintetizados [120].

Nuestros resultados sugieren que la participación de los IP₃R es esencial para la vía de señalización inducida por OMecAMP, ya que en la presencia del inhibidor de estos canales (XC), no solo se inhibió el aumento de la [Ca²⁺]_i inducido por OMecAMP, sino que también la RA. Por otro lado, se observó que hay un incremento de [Ca²⁺]_i al adicionar 5μM de XC en los espermatozoides que se encuentran suspendidos en un medio con 2mM Ca²⁺. En cambio, este efecto no se observa cuando los espermatozoides se encuentran en un medio con bajo Ca²⁺. Probablemente la XC activa de forma directa o indirecta un canal de Ca²⁺ de la MP, este canal seguramente requiere una alta [Ca²⁺] en el medio externo, lo que explicaría la ausencia de este fenómeno en los espermatozoides que se encuentran en un medio con bajo Ca²⁺.

Los RyR no parecen participar en la vía de señalización inducida por OMecAMP ni Pg, ya que el incremento de la [Ca²⁺]_i inducido por estos dos agonistas no es afectada.

La participación de los TPCs parece ser indispensable en la vía de señalización inducida por OMecAMP y Pg, ya que en presencia de un inhibidor específico para estos canales (Ned19) la respuesta de ambos compuestos se inhibe en 2mM y bajo Ca²⁺ externo. A pesar de que se obtiene casi una inhibición completa de la respuesta inducida por OMecAMP y Pg en presencia de Ned19, esto no significa que el vaciamiento de Ca²⁺ de las pozas es catalizado exclusivamente mediante estos canales, ya que se ha propuesto que los TPCs promueven el vaciamiento de otras pozas de Ca²⁺ mediada por otras entidades moleculares dentro de la misma célula. Es decir, al inhibir estos

canales, no sólo se evita la salida de Ca^{2+} mediada por TPC, sino que también la amplificación del incremento de Ca^{2+} a través de los IP_3R y RyR y por lo tanto la activación de canales tipo SOC. Por otro lado, las IC_{50} calculadas de Ned19 para las respuestas inducidas por OMecAMP y Pg en 2mM de Ca^{2+} son tres veces mayores que las IC_{50} que se calcularon a partir de los datos obtenidos de espermatozoides que se encontraban en un MRH con bajo Ca^{2+} . Esto podría explicarse de la siguiente manera: cuando el MRH tiene bajo Ca^{2+} la cantidad de NAADP que se produce en la célula es menor a la que se produce cuando el MRH tiene 2mM de Ca^{2+} , ya que la activación de la enzima depende de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El Ned19 es un inhibidor competitivo, por lo que inhibe con mayor eficacia en una condición en la cual la producción de NAADP sea disminuida. Los resultados mostrados en la Figura 38 prueban que el Ned19 también inhibe la inducción de la RA por OMecAMP. Estos resultados apoyan nuestro modelo de la vía de señalización inducida por este compuesto.

Este último resultado es novedoso e importante, ya que sugiere que existe comunicación entre las pozas de Ca^{2+} de los espermatozoides. En experimentos en donde se registran los cambios en la intensidad de la fluorescencia en células individuales, se puede obtener la dinámica espacio-temporal del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por OMecAMP. Si existe la comunicación entre las pozas de Ca^{2+} que nosotros proponemos, deberíamos ser capaces de identificarlo con esta metodología. De hecho, resultados preliminares sugieren que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inicia en una zona en donde se conecta la pieza media y la cabeza del espermatozoide (donde se encuentra la ENR) y se propaga hacia la cabeza, donde se encuentra el acrosoma (comunicación personal, Gerardo de Blas).

VIII. Conclusiones

Trabajos previos proponen que en el espermatozoide, el OMecaAMP sólo moviliza Ca^{2+} de las pozas internas [66, 91]. Sin embargo, nuestros resultados muestran claramente que además de la movilización de Ca^{2+} de las pozas, el OMecaAMP también induce un influjo de Ca^{2+} .

La magnitud de la respuesta inducida por OMecaAMP y Pg en espermatozoides capacitados y no capacitados es la misma. Esto sugiere que las entidades moleculares que participan en la vía de señalización inducida por OMecaAMP y Pg están presentes y listas para responder a los estímulos. Por otro lado, se observó que los espermatozoides capacitados incorporan de forma más eficiente el colorante (Fluo3-AM) que los espermatozoides no capacitados, seguramente esto se debe al hecho de que durante la capacitación hay una reorganización de la MP (como por ejemplo, remoción del colesterol) que la hace más competente a la incorporación del colorante.

De acuerdo con los resultados obtenidos, descartamos la participación de la PKA en la vía de señalización inducida por OMecaAMP, puesto que en presencia de dos inhibidores específicos de esta cinasa (H-89 y RpcAMP) la respuesta inducida por OMecaAMP no se afecta. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que la PKA participa en la vía de señalización inducida por Pg en condiciones de bajo Ca^{2+} en el medio extracelular.

La participación de los canales Ca_v en la respuesta inducida por OMecaAMP y Pg está descartada, ya que en presencia de Nifedipina y Mibefradil, la respuesta inducida por estos dos compuestos es inalterada.

Nuestros resultados sugieren la participación de los canales tipo SOC en la vía de señalización inducida por OMecaAMP y Pg, ya que la presencia de estos inhibidores (en condiciones de bajo Ca^{2+} extracelular) reduce significativamente la respuesta inducida por estos dos agonistas y también se observa una inhibición de la RA en presencia de Gd^{3+} , antagonista de estos canales.

Los resultados obtenidos en este trabajo son de suma relevancia, ya que nos permiten sugerir por primera vez, que existe comunicación entre las diferentes pozas de Ca^{2+} en los espermatozoides de humano. Además, que en esta comunicación de Ca^{2+} están involucrados los canales TPC y los IP_3R .

IX. Perspectivas

En el modelo de la vía de señalización de la RA que nosotros planteamos, el OMecAMP induce un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que involucra movilización de Ca^{2+} de las pozas internas, por lo que sería interesante probar fármacos que vacían los reservorios de Ca^{2+} de las células (Bisfenol, Tapsigargina y Bafilomicina) y evaluar si esto tiene un efecto en la señalización inducida por OMecAMP.

Como se puede observar en la Figura 30, la adición de XC $5\mu\text{M}$ claramente aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los espermatozoides, sería interesante caracterizar el canal que es activado por este compuesto. Con este fin, se podrían emplear una batería de inhibidores de diferentes tipos de canales de calcio y evaluar cuál de ellos bloquea el aumento de Ca^{2+} inducido por XC.

Recientemente se planteó una metodología que permite visualizar la reacción acrosomal en espermatozoides en tiempo real. Esto se hace utilizando un fluoróforo en el medio que ingresa al acrosoma cuando inicia la RA y otro fluoróforo que está asociado a un anticuerpo que reconoce una proteína que está específicamente localizada en la membrana interna del acrosoma [121], de tal manera que los cambios de fluorescencia indican las diferentes etapas de la RA. Sería interesante poder correlacionar las fluctuaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante las diferentes etapas de la RA inducida tanto por ZP3, Pg y OMecAMP.

X. Bibliografía

1. Darszon, A., et al., *Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology*. Int Rev Cytol, 2005. **243**: p. 79-172.
2. Wassarman, P.M., et al., *Recent aspects of mammalian fertilization research*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **234**(1-2): p. 95-103.
3. Vicdan, A., et al., *Genetic aspects of human male infertility: the frequency of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in severe male factor infertility*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004. **117**(1): p. 49-54.
4. Alberts, J., Lewis, Raff, Roberts, and Walter *Molecular Biology of the cell*. 4th ed, ed. G. Science. 2002, New York.
5. Ernst Knobil, J.D.N., Gilbert S. Greenwald, Clement L. Market and Donald W. Pfaff, *The physiology of reproduction*. 2th ed, ed. R. Press. Vol. Volume 2. 1994.
6. Hardy, D.M., *Fertilization*. 2002, San Diego: Academic Press.
7. Suarez, H.-C.H.a.S.S., *Characterization of the Intracellular Calcium Store at the Base of the Sperm Flagellum That Regulates Hyperactivated Motility*. BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2003. **68**: p. 1590–1596.
8. Haraguchi, C.M., et al., *Possible function of caudal nuclear pocket: degradation of nucleoproteins by ubiquitin-proteasome system in rat spermatids and human sperm*. J Histochem Cytochem, 2007. **55**(6): p. 585-95.
9. Darszon, A., Liévano, A., *Ion Channels in Sperm*. 3th ed. Cell Physiology Sourcebook, ed. A.M. Approach. 2001.
10. Ernst Knobil, J.D.N., Gilbert S. Greenwald, Clement L. Market and Donald W. Pfaff, *The physiology of reproduction*. 2th Edition ed, ed. R. Press. Vol. Volume1. 1994.
11. Gilbert, S.F., *Developmental Biology*. 8th edition ed, ed. S. Associates. 2006, Massachusetts.
12. Greve, J.M. and P.M. Wassarman, *Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat*. J Mol Biol, 1985. **181**(2): p. 253-64.
13. Barros, C., J.A. Crosby, and R.D. Moreno, *Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization*. Cell Biol Int, 1996. **20**(1): p. 33-9.
14. Litscher, E.S., Z. Williams, and P.M. Wassarman, *Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals*. Mol Reprod Dev, 2009. **76**(10): p. 933-41.
15. Tsubamoto, H., et al., *Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa*. Biol Reprod, 1999. **61**(6): p. 1649-54.
16. Chiu, P.C., et al., *Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa*. Biol Reprod, 2008. **79**(5): p. 869-77.
17. Wassarman, P.M., *Zona pellucida glycoproteins*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 24285-9.

18. Ciencias, C.d.T.d.I.r.a.d., *Diccionario Esencial de las Ciencias*, ed. ESPASA. 2001, Madrid.
19. Teves, M.E., et al., *Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8211.
20. Inoue, N., et al., *The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs*. Nature, 2005. **434**(7030): p. 234-8.
21. Fujihara, Y., et al., *Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse*. J Cell Sci. **123**(Pt 9): p. 1531-6.
22. Eisenbach, M. and L.C. Giojalas, *Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(4): p. 276-85.
23. Ho, K., C.A. Wolff, and S.S. Suarez, *CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir*. Reprod Fertil Dev, 2009. **21**(2): p. 345-50.
24. Darszon, A., et al., *T-type Ca²⁺ channels in sperm function*. Cell Calcium, 2006. **40**(2): p. 241-52.
25. Sperelakis, N., *Cell Physiology Source Book: A Molecular Approach* Third edition ed. 2001.
26. Linares-Hernandez, L., et al., *Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1372**(1): p. 1-12.
27. Hernandez-Gonzalez, E.O., et al., *Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24397-406.
28. Chen, W.Y., et al., *Cl⁻ is required for HCO₃⁻ entry necessary for sperm capacitation in guinea pig: involvement of a Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger (SLC26A3) and CFTR*. Biol Reprod, 2009. **80**(1): p. 115-23.
29. Li, C.Y., et al., *CFTR is essential for sperm fertilizing capacity and is correlated with sperm quality in humans*. Hum Reprod. **25**(2): p. 317-27.
30. Hernandez-Gonzalez, E.O., et al., *Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5623-33.
31. Berdiev, B.K., et al., *Molecular proximity of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel assessed by fluorescence resonance energy transfer*. J Biol Chem, 2007. **282**(50): p. 36481-8.
32. Huang, P., et al., *Local regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator and epithelial sodium channel in airway epithelium*. Proc Am Thorac Soc, 2004. **1**(1): p. 33-7.
33. Harvey Lodish, A.B., S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell, *Molecular Cell Biology*. 5e ed. 2004: W.H. Freeman.
34. Jaiswal, B.S. and M. Conti, *Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10676-81.
35. Demarco, I.A., et al., *Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7001-9.
36. Machado-Oliveira, G., et al., *Mobilisation of Ca²⁺ stores and flagellar regulation in human sperm by S-nitrosylation: a role for NO synthesised*

- in the female reproductive tract*. Development, 2008. **135**(22): p. 3677-86.
37. Dong, K.W., et al., *Characterization of the biologic activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 expressed in human ovarian teratocarcinoma (PA-1) cells*. Am J Obstet Gynecol, 2001. **184**(5): p. 835-43; discussion 843-4.
 38. Rankin, T.L., et al., *Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs*. Dev Cell, 2003. **5**(1): p. 33-43.
 39. Miller, D.J., X. Gong, and B.D. Shur, *Sperm require beta-N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida*. Development, 1993. **118**(4): p. 1279-89.
 40. Naz, R.K. and L. Dhandapani, *Identification of human sperm proteins that interact with human zona pellucida3 (ZP3) using yeast two-hybrid system*. J Reprod Immunol. **84**(1): p. 24-31.
 41. Stamboulian, S., et al., *Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3.1 (alpha1G) calcium channel: CaV3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells*. J Cell Physiol, 2004. **200**(1): p. 116-24.
 42. Arnoult, C., M. Villaz, and H.M. Florman, *Pharmacological properties of the T-type Ca²⁺ current of mouse spermatogenic cells*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(6): p. 1104-11.
 43. Heady, T.N., et al., *Molecular pharmacology of T-type Ca²⁺ channels*. Jpn J Pharmacol, 2001. **85**(4): p. 339-50.
 44. Escoffier, J., et al., *Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 channels in sperm cells: an evaluation from Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 deficient mice*. J Cell Physiol, 2007. **212**(3): p. 753-63.
 45. Tao, J., et al., *Tyrosine kinase-independent inhibition by genistein on spermatogenic T-type calcium channels attenuates mouse sperm motility and acrosome reaction*. Cell Calcium, 2009. **45**(2): p. 133-43.
 46. Xia, J. and D. Ren, *Egg Coat Proteins Activate Calcium Entry into Mouse Sperm via CATSPER Channels*. Biol Reprod, 2009. **80**(6): p. 1092-8.
 47. Xia, J., et al., *CATSPER channel-mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation*. Biol Reprod, 2007. **77**(3): p. 551-9.
 48. Xia, J. and D. Ren, *The BSA-induced Ca²⁺ influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent*. Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 119.
 49. Qi, H., et al., *All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1219-23.
 50. O'Toole, C.M., et al., *Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(5): p. 1571-84.
 51. Darszon, A., et al., *Sperm channel diversity and functional multiplicity*. Reproduction, 2006. **131**(6): p. 977-88.
 52. Stotz, S.C., et al., *Citral sensing by Transient [corrected] receptor potential channels in dorsal root ganglion neurons*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2082.

53. Liao, Y., et al., *Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 2895-900.
54. Alicia, S., et al., *STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts*. Cell Calcium, 2008. **44**(5): p. 479-91.
55. Stiber, J., et al., *STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(6): p. 688-97.
56. Lefkimmiatis, K., et al., *Store-operated cyclic AMP signalling mediated by STIM1*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(4): p. 433-42.
57. Kim, J.Y., et al., *Homer 1 mediates store- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent translocation and retrieval of TRPC3 to the plasma membrane*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32540-9.
58. Birnbaumer, L., *The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2009. **49**: p. 395-426.
59. Shuttleworth, T.J., *Arachidonic acid, ARC channels, and Orai proteins*. Cell Calcium, 2009. **45**(6): p. 602-10.
60. Vaca, L., *SOCIC: the store-operated calcium influx complex*. Cell Calcium. **47**(3): p. 199-209.
61. Bielfeld, P., et al., *The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa is mediated by protein kinases*. Fertil Steril, 1994. **61**(3): p. 536-41.
62. Harrison, D.A., D.W. Carr, and S. Meizel, *Involvement of protein kinase A and A kinase anchoring protein in the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction*. Biol Reprod, 2000. **62**(3): p. 811-20.
63. Jimenez-Gonzalez, C., et al., *Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(3): p. 253-67.
64. De Blas, G., et al., *The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49326-31.
65. Seino, S. and T. Shibasaki, *PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis*. Physiol Rev, 2005. **85**(4): p. 1303-42.
66. Branham, M.T., L.S. Mayorga, and C.N. Tomes, *Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8656-66.
67. Branham, M.T., De Blas GA, Rehmann H, Zarelli VEP, Treviño CL, Darszon A, Mayorga LS, Tomes CN, *EPAC Activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis*. Datos no publicados. Comunicación personal., 2008.
68. Zanetti, N. and L.S. Mayorga, *Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction*. Biol Reprod, 2009. **81**(2): p. 396-405.
69. Batiz, L.F., et al., *Sperm from hyh mice carrying a point mutation in alphaSNAP have a defect in acrosome reaction*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4963.

70. Tomes, C.N., *Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis*. Soc Reprod Fertil Suppl, 2007. **65**: p. 275-91.
71. Borland, G., B.O. Smith, and S.J. Yarwood, *EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(1): p. 70-86.
72. Roscioni, S.S., C.R. Elzinga, and M. Schmidt, *Epac: effectors and biological functions*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **377**(4-6): p. 345-57.
73. Gloerich, M. and J.L. Bos, *Epac: defining a new mechanism for cAMP action*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. **50**: p. 355-75.
74. Holz, G.G., et al., *Cell physiology of cAMP sensor Epac*. J Physiol, 2006. **577**(Pt 1): p. 5-15.
75. Hoque, K.M., et al., *Epac1 mediates protein kinase A-independent mechanism of forskolin-activated intestinal chloride secretion*. J Gen Physiol. **135**(1): p. 43-58.
76. Giancippoli, A., et al., *Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells*. Biophys J, 2006. **90**(5): p. 1830-41.
77. Sedej, S., T. Rose, and M. Rupnik, *cAMP increases Ca²⁺-dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices*. J Physiol, 2005. **567**(Pt 3): p. 799-813.
78. Kang, G., et al., *cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells*. J Physiol, 2006. **573**(Pt 3): p. 595-609.
79. Helms, M.N., et al., *Dopamine regulation of amiloride-sensitive sodium channels in lung cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(4): p. L710-L722.
80. Holz, G.G., *Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell*. Diabetes, 2004. **53**(1): p. 5-13.
81. Holz, G.G., *New insights concerning the glucose-dependent insulin secretagogue action of glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells*. Horm Metab Res, 2004. **36**(11-12): p. 787-94.
82. de Rooij, J., et al., *Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP*. Nature, 1998. **396**(6710): p. 474-7.
83. Harper, C., et al., *Secretory pathway Ca(2+)-ATPase (SPCA1) Ca(2+) pumps, not SERCAs, regulate complex [Ca(2+)](i) signals in human spermatozoa*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 8): p. 1673-85.
84. Guse, A.H. and H.C. Lee, *NAADP: a universal Ca²⁺ trigger*. Sci Signal, 2008. **1**(44): p. re10.
85. Galione, A., et al., *The acid test: the discovery of two-pore channels (TPCs) as NAADP-gated endolysosomal Ca(2+) release channels*. Pflugers Arch, 2009. **458**(5): p. 869-76.
86. Lee, H.C., *Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-mediated calcium signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 33693-6.
87. Peiter, E., et al., *The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement*. Nature, 2005. **434**(7031): p. 404-8.
88. Zong, X., et al., *The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca(2+)-release from lysosomal stores*. Pflugers Arch, 2009. **458**(5): p. 891-9.

89. Zhu, M.X., et al., *Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question*. *Am J Physiol Cell Physiol*. **298**(3): p. C430-41.
90. Calcraft, P.J., et al., *NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels*. *Nature*, 2009. **459**(7246): p. 596-600.
91. Branham, M.T., et al., *Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(37): p. 24825-39.
92. Lee, H.C., *Structure and enzymatic functions of human CD38*. *Mol Med*, 2006. **12**(11-12): p. 317-23.
93. Vasudevan, S.R., A. Galione, and G.C. Churchill, *Sperm express a Ca²⁺-regulated NAADP synthase*. *Biochem J*, 2008. **411**(1): p. 63-70.
94. Vasudevan, S.R., et al., *The calcium-mobilizing messenger nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate participates in sperm activation by mediating the acrosome reaction*. *J Biol Chem*. **285**(24): p. 18262-9.
95. Oestreich, E.A., et al., *EPAC and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin-kinase II*. *J Biol Chem*, 2008.
96. Yip, K.P., *Epac-mediated Ca²⁺ mobilization and exocytosis in inner medullary collecting duct*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **291**(4): p. F882-90.
97. Kang, G., et al., *Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(10): p. 8279-85.
98. Paredes, R.M., et al., *Chemical calcium indicators*. *Methods*, 2008. **46**(3): p. 143-51.
99. Hollingworth, S., K.R. Gee, and S.M. Baylor, *Low-affinity Ca²⁺ indicators compared in measurements of skeletal muscle Ca²⁺ transients*. *Biophys J*, 2009. **97**(7): p. 1864-72.
100. Stanford, U. *WEBMAXC STANDARD*. 2009 [cited; Available from: <http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm>].
101. Organization, W.H., *Who laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. 1990, Cambridge.
102. Ramírez, O.J., *Caracterización farmacológica de los canales de calcio involucrados en la reacción acrosomal inducida por ZP3 recombinante, en espermatozoides humanos.*, in *departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM*. 2008, UNAM: Cuernavaca. p. 72.
103. Merritt, J.E., et al., *SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry*. *Biochem J*, 1990. **271**(2): p. 515-22.
104. Bird, G.S., et al., *Methods for studying store-operated calcium entry*. *Methods*, 2008. **46**(3): p. 204-12.
105. DeHaven, W.I., et al., *Complex actions of 2-aminoethyldiphenyl borate on store-operated calcium entry*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(28): p. 19265-73.
106. Bootman, M.D., et al., *2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release*. *Faseb J*, 2002. **16**(10): p. 1145-50.
107. Prakriya, M. and R.S. Lewis, *Potentiation and inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-*

- APB*) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol*, 2001. **536**(Pt 1): p. 3-19.
108. Ardon, F., et al., *Mitochondrial inhibitors activate influx of external Ca(2+) in sea urchin sperm*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1787**(1): p. 15-24.
 109. Gafni, J., et al., *Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*. *Neuron*, 1997. **19**(3): p. 723-33.
 110. Ozaki, H., et al., *Inhibitory mechanism of xestospongine-C on contraction and ion channels in the intestinal smooth muscle*. *Br J Pharmacol*, 2002. **137**(8): p. 1207-12.
 111. Kobayashi, S., et al., *Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **53**(21): p. 1993-2005.
 112. Sudo, R.T., et al., *Effects of azumolene on normal and malignant hyperthermia-susceptible skeletal muscle*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008. **102**(3): p. 308-16.
 113. Naylor, E., et al., *Identification of a chemical probe for NAADP by virtual screening*. *Nat Chem Biol*, 2009. **5**(4): p. 220-6.
 114. 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*, 2004. **563**(1-3): p. 87-92.
 115. Chijiwa, T., et al., *Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(9): p. 5267-72.
 116. Park, Y.G., et al., *cAMP-PKA signaling pathway regulates bone resorption mediated by processing of cathepsin K in cultured mouse osteoclasts*. *Int Immunopharmacol*, 2006. **6**(6): p. 947-56.
 117. Gonzalez-Martinez, M.T., M.A. Bonilla-Hernandez, and A.M. Guzman-Grenfell, *Stimulation of voltage-dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **408**(2): p. 205-10.
 118. Bedu-Addo, K., et al., *Patterns of [Ca2+](i) mobilization and cell response in human spermatozoa exposed to progesterone*. *Dev Biol*, 2007. **302**(1): p. 324-32.
 119. Visconti, P.E., et al., *Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway*. *Development*, 1995. **121**(4): p. 1139-50.
 120. Goto, J., et al., *Two novel 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) analogues differentially activate and inhibit store-operated Ca(2+) entry via STIM proteins*. *Cell Calcium*. **47**(1): p. 1-10.
 121. Harper, C.V., et al., *Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 13): p. 2130-5.