



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Depto. Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular

**Caracterización de la cinética del ingreso de Ca^{+2} mediado por GABA, Glicina y Acetilcolina
en espermatozoides de humano**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIOL. ESPERANZA MATA MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL: CLAUDIA L. TREVIÑO SANTA CRUZ (IBT-UNAM)

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Gustavo Pedraza Alva (IBT-UNAM)

Dra. Liliana Pardo López (IBT-UNAM)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis, la Dra. Claudia L. Treviño Santa Cruz, por aceptarme en su grupo de investigación, por su apoyo y confianza constante durante la realización de este proyecto, así como también por su asesoría y motivación para aprender nuevas técnicas.

Al Dr. Alberto Darszon Israel, por su apoyo durante la transición Licenciatura-Maestría, por las sugerencias siempre certeras brindadas durante la realización del proyecto, y por la oportunidad de formar parte de uno de los mejores laboratorios del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Al Dr. Takuya Nishigaki Shimizu, por todo el apoyo técnico proporcionado en lo referente a la instalación de equipos y sus complementos, así como también auxiliarme cada vez que alguno de los equipos utilizado fallaba, y además por todas las valiosas ideas, sugerencias y comentarios que aportó a este trabajo.

A los investigadores miembros del comité evaluador, por sus valiosos comentarios para mejorar la calidad de este trabajo: Dr. Leonor Pérez Martínez, Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay, Dr. Enrique Salas Vidal, Dra. Ma. Del Carmen Gutiérrez Villafuerte y Dr. Luis Cárdenas Torres.

A los investigadores miembros del comité tutorial, por sus valiosas aportaciones realizadas durante el desarrollo de este trabajo: Dra. Liliana Pardo López y Gustavo Pedraza Alva.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

A CONACyT-México (128566 para AD y CT y 99333 para C. T.) y DGAPA/UNAM (IN202212-3) por el financiamiento recibió para la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a aquellos que contribuyeron de manera directa en distintas etapas del desarrollo de este proyecto:

Dra. Claudia Sánchez Cárdenas, por su asesoría en la realización de los experimentos en célula única.

M. en C. Ana Alicia Sánchez Tusie, por enseñarme el manejo de equipos, por compartir siempre amablemente sus conocimientos y ayudarme a resolver los innumerables problemas que nos dio el set de imágenes.

M. en C. Yoloxochitl Sánchez Guevara, por realizar el swim up y esforzarse en procesar siempre a tiempo la materia prima para realizar los experimentos.

M. en C. Omar José, por enseñarme a realizar ensayos de reacción acrosomal y por su apoyo con el uso del Stopped Flow.

Lic. Paulina Torres Rodríguez, por su apoyo y asesoría en el uso del citómetro de flujo.

Al Biol. Luis Enrique Hernández Téllez, por proporcionarme el programa para analizar los datos de Citometría y enseñarme a utilizarlo, y especialmente por todo el apoyo moral y motivación constante.

A mi familia, particularmente a mi mamá por el apoyo y comprensión recibida en cada una de las decisiones tomadas durante todo este tiempo.

I ÍNDICE

I ÍNDICE	3
II ÍNDICE DE FIGURAS	5
III ABREVIATURAS	6
IV RESUMEN	7
V ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 La fecundación.....	9
1.2 Cambios indispensables en espermatozoides de mamíferos necesarios para la fecundación: hiperactivación, capacitación y reacción acrosomal.....	11
1.2.1 Hiperactivación.....	11
1.2.2 Capacitación.....	12
1.2.3 Reacción acrosomal.....	13
2. ANTECEDENTES	19
2.1 Inductores de la reacción acrosomal.....	19
2.1.1 Ácido γ -aminobutírico (GABA).....	19
2.1.2 Glicina.....	20
2.1.3 Acetilcolina (Ach).....	21
2.1.5 ATP.....	22
2.1.6 Esfingosina-1-fosfato.....	23
2.1.7 Progesterona.....	24
2.1.7 <i>Cumulus oophorus</i>	24
2.1.8 La zona pelúcida.....	26
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVO GENERAL	28
5. OBJETIVOS PARTICULARES	28
6. MATERIALES	29
6.1 Reactivos.....	29
6.2 Biológicos.....	29

7. MÉTODOS	30
7.1 Nado hacia arriba y capacitación	30
7.2 Ensayos de reacción acrosomal	30
7.3 Ensayos de reacción acrosomal: citómetro de flujo.....	31
7.4 Cargado de la sonda fluorescente sensible a Ca^{2+}	32
7.5 Medidas de $[Ca^{2+}]$ en población con flourometría convencional	32
7.6 Medidas de Ca^{2+} en población con alta resolución temporal.....	33
7.7 Medidas de $[Ca^{2+}]$ en célula única.....	34
7.8 Análisis estadístico.....	34
8. RESULTADOS	35
8.1 Reacción acrosomal.....	35
8.1.1 Curva dosis respuesta de GABA, Glicina y Acetilcolina	35
8.1.2 Reacción acrosomal: citómetro de flujo.....	37
8.2 Registros de Ca^{2+} en población.....	44
8.3 Registros de $[Ca^{2+}]$ en célula única	47
8.4 Espectrofluorómetro de mezclado rápido.....	64
8.4.1 Viabilidad.....	64
8.4.2 Medidas de Ca^{2+} en población con alta resolución temporal.....	66
9. DISCUSIÓN	71
10. CONCLUSIONES	77
11. PERSPECTIVAS	77
12. REFERENCIAS	78

II ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del espermatozoide de humano.	9
Figura 2. La fusión de membranas durante la RA depende de Ca^{2+}	13
Figura 3. Modelo de la movilización de Ca^{2+} provocada por la unión de la ZP3 al (los) receptor(es) del espermatozoide durante la reacción acrosomal de mamíferos.	15
Figura 4. Curva dosis-respuesta de la RA inducida por GABA, Glicina y Acetilcolina.	36
Figura 5. RA inducida por GABA, Glicina y Acetilcolina cuantificada en citómetro de flujo.	39
Figura 6. RA inducida por GABA, Glicina y Acetilcolina cuantificada en citómetro de flujo.	42
Figura 7. GABA, Glicina y Acetilcolina estimularon un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides.	44
Figura 8. GABA, Glicina y Acetilcolina inducen aumentos en el $[Ca^{2+}]_i$	46
Figura 9. GABA, Glicina y Acetilcolina estimulan un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ en experimentos de célula única.	52
Figura 10. GABA Glicina y Acetilcolina no estimulan un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ en experimentos de célula única en medio libre de Ca^{2+}	57
Figura 11. Bicuculina inhibe el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por GABA.	60
Figura 12. Mibefradil y NNC 55-0396 inhiben el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por GABA.	63
Figura 13. El uso de distintas velocidades de disparo no afecta la viabilidad de las células.	65
Figura 14. Ionomicina, Progesterona GABA, Glicina y Acetilcolina estimularon un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides.	67
Figura 15. GABA, Glicina y Acetilcolina estimularon un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ bifásico.	68
Figura 16. La cinética del ingreso de Ca^{+2} mediado por GABA, Glicina y Acetilcolina es diferente.	70

III ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina

nAChR: Receptor de acetilcolina nicotínico

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

ATP: Trifosfato de adenosina

BSA: Albúmina sérica bovina

Ca²⁺: Ión calcio

[Ca²⁺]: Concentración del ión calcio

Cl: Ión cloro

EPAC: Proteína intercambiadora activada directamente por AMPc

FITC-PSA: Lectina de *Pisum sativum* acoplada a isotiocianato de fluoresceína

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GBRC: Receptor de GABA

HCO₃⁻: Bicarbonato

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato

MR: Medio de registro

pH_i: pH intracelular

PI: Ioduro de propidio

PLC: Fosfolipasa C

PTX: Toxina pertusis

RA: Reacción acrosomal

sAC: Adenilil ciclasa soluble

TRP: Receptor de potencial transitorio

ZP: Zona pelúcida

ZP3hr: ZP3 de humano recombinante.

IV RESUMEN

La fecundación es un evento esencial para la generación de un nuevo individuo, el cual es resultado de la fusión de un ovulo y un espermatozoide. Se ha demostrado que el calcio (Ca^{2+}) es esencial en la regulación de los procesos que ocurren en el espermatozoide después de la eyaculación (hiperactivación, capacitación y reacción acrosomal), diferentes clases de canales y bombas permeables a Ca^{2+} permiten el movimiento de este catión a través de la membrana plasmática o las membranas de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} en el espermatozoide.

La reacción acrosomal (RA) consiste en la exocitosis del granulo acrosomal que se caracteriza por la formación de múltiples puntos de fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, en la región anterior de la cabeza del espermatozoide. Este proceso es necesario para que el espermatozoide atraviese la envoltura del óvulo y presente una nueva membrana que le permita fusionarse con él.

Aunque una de las glicoproteínas de la matriz externa del ovulo (ZP3) se ha considerado como el inductor natural de la RA, otros estudios han demostrado que diversos compuestos son capaces de inducir esta reacción con la consecuente movilización de Ca^{2+} en el espermatozoide. Muchos de dichos compuestos se encuentran en el tracto genital femenino por lo que sería importante investigar su relevancia fisiológica. Esta idea se ha fortalecido con resultados recientes que muestran, que al menos en ratón, los espermatozoides que logran fecundar al óvulo son aquellos que desarrollaron la RA antes de entrar en contacto con la matriz externa del ovulo.

En este trabajo demostramos que, en espermatozoides de humano capacitados, GABA, Glicina y Acetilcolina son capaces de inducir RA y además, tanto en experimentos en población como en célula única es posible registrar un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que depende de Ca^{2+} extracelular. Por otra parte, Mibefradil y NNC55-0396, inhibidores de CatSper, inhiben la movilización de Ca^{2+} mediada por GABA.

V ABSTRACT

Fertilization is an essential event for organisms that depend on sexual reproduction, to give rise to a new individual. This process is highly synchronized and involves a complex series of interactions between sperm and egg, culminating in the fusion of these gametes. It has been shown that calcium (Ca^{2+}) is essential in regulating the processes that occur in the sperm after ejaculation (hyperactivation, capacitation and acrosome reaction), different kinds of channels and pumps permeable to Ca^{2+} permit movement of this cation through the plasma membrane or the membranes of intracellular stores of Ca^{2+} in sperm.

Acrosome reaction (AR), which consists on the acrosomal granule exocytosis, characterized by the formation of multiple fusion points on the plasma membrane and the outer acrosomal membrane in the anterior region of the sperm head. This process is necessary for sperm to traverse the egg envelope and to expose a fusogenic membrane that allows egg-sperm fusion.

Although one of the glycoproteins from the external egg matrix (ZP3) has been regarded as the natural inducer of the AR, other studies have shown that several compounds are able to induce this reaction with the consequent Ca^{2+} mobilization in the sperm.

The physiological relevance of these inducers has been strengthened by recent results showing that at least in mouse, sperm that manage to fertilize an egg are those who suffered the AR before reaching the egg. Therefore, it is important to determine whether compounds encounter by sperm during transit through the female reproductive tract are able to induce AR.

In this study we demonstrate that in population and in single cell experiments with capacitated human sperm, GABA, glycine and acetylcholine are able to induce the AR and stimulate an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ that depends on extracellular Ca^{2+} . Moreover, mibefradil and NNC55-0396, CatSper inhibitors hold back Ca^{2+} mobilization mediated by GABA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La fecundación

La fecundación es un evento esencial para los organismos que dependen de la reproducción sexual, que da origen a un nuevo individuo con un genoma recombinante de ambos padres. Este proceso está altamente sincronizado e involucra una serie compleja de interacciones entre el espermatozoide y el óvulo, culminando con la fusión de estos gametos. El espermatozoide de humano es una célula con una longitud de ~55 μm y está conformado por dos regiones principales: la cabeza y el flagelo (**Figura 1**). La cabeza contiene el acrosoma y el núcleo. El acrosoma es un organelo derivado del Golgi localizado en la porción anterior de la cabeza del espermatozoide, está delimitado por las membranas acrosomal interna y externa, además contiene enzimas proteolíticas que le permiten degradar parte de la matriz extracelular del óvulo y con esto, facilitar el encuentro con la membrana del óvulo para que finalmente ocurra la fusión y transferencia del genoma. Por otro lado, a lo largo del flagelo se encuentra el axonema que provee de movimiento al espermatozoide gracias a la hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP) (Darszon *et al.*, 2008).

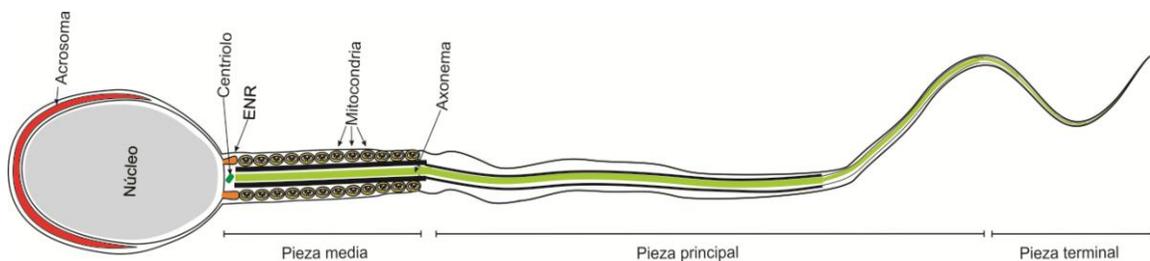


Figura 1. Esquema de la estructura del espermatozoide de humano. La cabeza y el flagelo del espermatozoide están integrados por varios componentes. La cabeza está constituida por Acrosoma, Núcleo, Envoltura Nuclear Redundante (ENR), y el Centríolo. Por otro lado, en el flagelo se distinguen tres piezas: media, principal y terminal. En la pieza media se encuentran las mitocondrias y a lo largo de todo flagelo se extiende el axonema. Modificado de Darszon *et al.* 2011.

En los organismos de fecundación interna, como los mamíferos, los espermatozoides se eyaculan en el tracto genital femenino. Es a partir de aquí que los espermatozoides experimentan cambios morfológicos y fisiológicos que les confieren la capacidad de llegar hasta el óvulo y fecundarlo. Existen tres eventos fundamentales que deben llevarse a cabo: la hiperactivación de la movilidad, que implica modificaciones de la simetría y fuerza del batido flagelar; la capacitación, que involucra un conjunto de cambios que vuelven competente al espermatozoide para fecundar al óvulo, y por último, la reacción acrosomal, un proceso exocitótico donde se liberan las enzimas proteolíticas del acrosoma y se expone una nueva membrana con propiedades fusogénicas que le permiten fusionarse con el óvulo (Darszon *et al.*, 2006).

Los espermatozoides son transcripcionalmente inactivos. Aunque se han encontrado ciertos ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) en el espermatozoide de humano, se propone que estos mensajeros son de vida larga y son proporcionados al óvulo para una expresión tardía (Kuligowski *et al.*, 1991 y Feugang *et al.*, 2010). Otros reportes sugieren que algunos ARNm del espermatozoide pueden traducirse a proteína vía la maquinaria de la mitocondria (Gur *et al.*, 2006 y Gur *et al.*, 2008), sin embargo, no hay certeza de que esto ocurra.

Por lo tanto, se infiere que la fisiología del espermatozoide depende de la actividad de las proteínas que generó durante el proceso de diferenciación y que la regulación de dichas proteínas frecuentemente se establece mediante cascadas de señalización que involucran segundos mensajeros.

El calcio (Ca^{2+}), un catión divalente, resulta ser un segundo mensajero de gran relevancia en todos los tipos celulares. Es decir que su aumento o disminución en respuesta a diversos estímulos resulta de gran importancia para determinar la respuesta. Este catión es esencial en la regulación de los procesos que ocurren en el espermatozoide después de la eyaculación (hiperactivación, capacitación y reacción acrosomal), y se ha demostrado que, diferentes clases de canales y bombas permiten el movimiento de este catión a través de la membrana plasmática o las membranas de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} en el espermatozoide (Jiménez-González *et al.*, 2006).

Particularmente, los canales iónicos han demostrado ser fundamentales para desencadenar en milisegundos cambios importantes en los niveles intracelulares de calcio, esto ocasiona cambios eléctricos y de concentración de iones en prácticamente todos los tipos celulares, y su actividad se puede regular por factores como ligandos, nucleótidos cíclicos, presión, cambios en el voltaje o disminución del Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Costello *et al.*, 2009).

1.2 Cambios indispensables en espermatozoides de mamíferos necesarios para la fecundación: hiperactivación, capacitación y reacción acrosomal

1.2.1 Hiperactivación

La movilidad es un requisito indispensable para que los espermatozoides se desplacen a través del tracto genital femenino hasta encontrar al óvulo y fecundarlo. Al ser depositados en la vagina, los espermatozoides desarrollan inicialmente una movilidad activada que está caracterizada por un batido flagelar simétrico y de corta amplitud que conduce a un nado progresivo y con una dirección casi recta. Por otra parte, se ha demostrado que los espermatozoides recuperados del oviducto, una región superior del tracto reproductor femenino, presentan una movilidad hiperactivada. Este tipo de movilidad se caracteriza por un batido flagelar vigoroso, asimétrico, con una amplitud y curvatura mayor. Se piensa que la adquisición de este tipo de nado le permite a los espermatozoides, entre otras cosas, continuar de manera progresiva su trayecto a través del moco cervical y atravesar con mayor facilidad la matriz extracelular del óvulo (Suarez *et al.*, 2008). El Ca^{2+} es un regulador fundamental de este proceso, tanto para el inicio, como también para el mantenimiento de la movilidad hiperactivada ya que influencia de manera directa algunos componentes de la maquinaria molecular del axonema. Sin embargo, el mecanismo exacto que desencadena el cambio en los patrones de movilidad en condiciones fisiológicas no se ha descrito a detalle. (Darszon *et al.*, 2011).

Los óvulos de los mamíferos, incluyendo los de humano, se encuentran rodeados por una densa capa de células llamada *cumulus oophorus*, que entre otras sustancias, secretan progesterona. Se ha demostrado que gracias a la viscosidad de las células del *cumulus*, esta hormona esteroidea forma y mantiene un gradiente que se distribuye desde el centro de esta estructura celular, hacia la periferia (Teves *et al.*, 2006.). El gradiente de progesterona, en concentraciones de 10-100 pM, es capaz de atraer *in vitro*, mediante quimiotaxis a los espermatozoides capacitados de humano, sugiriendo que este proceso podría contribuir a dirigir a los espermatozoides en el último tramo de su trayecto hacia el óvulo.

Por otra parte, se ha visto que la progesterona también es importante en la modulación de la movilidad. Esto es debido a que las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular producidas por progesterona (10-100 nM) están acompañadas de incrementos en la amplitud del batido flagelar, una de las características importantes de la hiperactivación (Harper *et al.*, 2004 y Darszon *et al.*, 2011).

1.2.2 Capacitación

Los espermatozoides de mamíferos, después de ser eyaculados en el tracto reproductor femenino, deben experimentar un periodo de preparación fisiológica a fin de adquirir la habilidad de fecundar al óvulo. Los cambios que le confieren dicha habilidad se conocen como capacitación (Austin, 1952 y Chang, 1951). La capacitación comprende una serie de cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos que se llevan a cabo en el espermatozoide durante su estancia dentro del tracto. Los últimos reportes indican que los cambios involucrados en la capacitación resultan de una combinación de procesos secuenciales y en algunos casos paralelos (Gadella *et al.*, 2008 y Arcelay *et al.*, 2008). Dentro de los cambios que suceden durante la capacitación, se encuentran la remoción de colesterol de la membrana plasmática, incrementos del pH intracelular (pH_i) y la concentración intracelular de iones como Ca^{2+} , bicarbonato (HCO_3^-) y cloro (Cl^-) (Zeng *et al.* 2005 y Darszon *et al.*, 2005), además de una hiperpolarización del potencial de membrana que se ha observado en espermatozoides bovinos y murinos (en esta última especie de mamífero se han hecho los estudios clásicos sobre la fisiología del espermatozoide). Este proceso también comprende la activación de una vía de señalización que involucra segundos mensajeros como el monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), el cual a su vez se asocia con la fosforilación de diversas proteínas por la acción de la proteína cinasa A (Darszon *et al.*, 2005).

Se ha postulado que la capacitación incluye eventos rápidos (en segundos) y lentos (en minutos) provocando cambios definidos tanto en la cabeza como en el flagelo. Los eventos rápidos incluyen la iniciación de la movilidad y la reorganización de la arquitectura lipídica de la membrana plasmática, que inicia cuando los espermatozoides se liberan del epidídimo y se exponen a un incremento en la concentración de HCO_3^- . Mientras que los lentos incluyen la fosforilación de proteínas en tirosinas, adquisición de la movilidad hiperactivada y la capacidad de desarrollar la reacción acrosomal. Dichos eventos en conjunto le proporcionan al espermatozoide la habilidad de fecundar al óvulo (Visconti, 2009).

La capacitación de los espermatozoides de humano se puede llevar a cabo *in vitro* al incubarlos en un medio definido que contenga las concentraciones apropiadas de tres elementos principales: Ca^{2+} , HCO_3^- y albúmina sérica bovina (BSA), y dentro en una cámara húmeda a 37° C y 5 % de CO_2 durante al menos 5 horas (Yanagimachi, 1994).

1.2.3 Reacción acrosomal

Consiste en la exocitosis del gránulo acrosomal que se caracteriza por la formación de múltiples puntos de fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, en la región anterior de la cabeza del espermatozoide (**Figura 2**) (Yanagimachi, 1994). Este evento se desencadena de manera natural por inductores fisiológicos provenientes del gameto femenino o experimentalmente por estímulos farmacológicos, es irreversible y esta finamente regulado, ya que de él depende que el espermatozoide atraviese la envoltura del óvulo y presente una nueva membrana que le permita fusionarse con él. La zona pelúcida (ZP) es una matriz glicoproteica que recubre al óvulo, la cual está compuesta, en el caso de humano de 4 diferentes glicoproteínas: (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4), Se ha postulado que únicamente el espermatozoide que se ha unido a la zona pelúcida (ZP) y ha llevado a cabo la RA, puede penetrar la ZP y fusionarse con la membrana externa del óvulo. La vía de señalización intracelular que culmina en la RA aun no se comprende por completo, sin embargo, los resultados de varias investigaciones indican que la participación del Ca^{2+} es fundamental en este proceso. Se ha postulado que dicho evento involucra la participación de canales iónicos permeables a este catión, ya que la RA se inhibe al utilizar sus antagonistas de estos canales de Ca^{2+} (Darszon *et al.*, 2006).

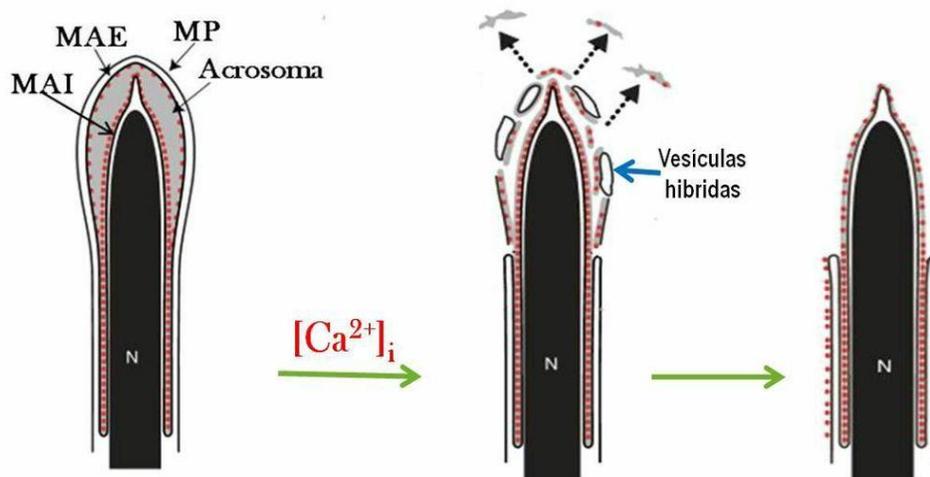


Figura 2. Representación esquemática de la fusión de membranas durante la RA. Se ilustran los diferentes componentes membranales que se fusionan durante la RA, MAI: membrana acrosomal interna; MAE: membrana acrosomal externa; MP: membrana plasmática; Una vez que aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular, la MAE se fusiona con la MP en múltiples sitios creando vesículas híbridas (estructuras negras) y liberándose el contenido acrosomal (en gris), los puntos rojos ilustran a la proteína acuaporina, un componente de la membrana acrosomal. N: núcleo. Modificada de Yoshida *et al.*, 2010.

El modelo clásico de la RA (**Figura 3**), el cual se ha construido integrando evidencias obtenidas en diversas especies, propone que el agonista fisiológico de la RA es la glicoproteína ZP3 y que la unión de éste a su(s) receptor(es) en los espermatozoides de ratón ocasiona la activación de las proteínas heterotriméricas G_{i1} y G_{i2} . Esta activación y la alcalinización que comúnmente ocurre durante la RA se suprime al utilizar la toxina pertusis (PTX), un antagonista específico de las proteínas G heterotriméricas de la clase G_i que además inhibe por completo la RA inducida por ZP3 (Florman *et al.*, 1989). Al tratar a los espermatozoides con una base débil permeable, la alcalinización transitoria y el ingreso de Ca^{2+} durante la RA inducida por ZP3 ocurren de manera normal en presencia de PTX, lo que sugiere que el incremento del pH, mediado por el intercambiador (Na^+ / H^+) es la etapa que se bloquea durante la RA por la inhibición de las proteínas G (Arnoult *et al.*, 1996).

Durante la RA, la unión de la glicoproteína ZP3 a su(s) receptor(es) también provoca una respuesta bifásica de ingreso de Ca^{2+} que involucra al menos tres tipos de canales permeables a este catión. La unión del espermatozoide con la ZP3 provoca un primer incremento de Ca^{2+} que es rápido y transitorio que alcanza su cúspide a los 50 ms, después del cual vuelve a su estado basal en 200 ms (Arnoult *et al.*, 1999). La farmacología y cinética del primer ingreso son consistentes con la apertura de canales de Ca^{2+} activados por voltaje de la subfamilia 3 (Ca_v3), sin embargo hay evidencias que cuestionan la participación de estos canales durante la RA, ya que los ratones nulos para dichos canales son fértiles (Escoffier *et al.*, 2007). El modelo postula que el Ca^{2+} que ingresa durante esta apertura activa a una fosfolipasa $\delta 4$ (PLC $\delta 4$) (Fukami *et al.*, 2003) que a su vez provoca un incremento de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) en el citoplasma. Posteriormente el IP_3 se une a sus receptores ubicados en la membrana acrosomal externa y libera el Ca^{2+} que contiene este reservorio (Walensky *et al.*, 1995). Esta liberación del Ca^{2+} acrosomal ocasiona un segundo aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la apertura en la membrana plasmática de canales operados por el vaciamiento de pozas de Ca^{2+} (SOC's) (O'Toole *et al.*, 2000). Este segundo incremento de Ca^{2+} durante la RA se caracteriza por ser lento y sostenido, su duración puede ser de varios segundos e incluso minutos y los canales involucrados podrían pertenecer a la familia de canales de Ca^{2+} conocidos como receptores de potencial transitorio (TRP's). Sin embargo aun no se puede descartar la participación de alguna(s) de las proteínas Orai1-3, ya que también funcionan como SOC's por sí mismas o en presencia de STIM (molécula 1 de interacción estromal) y TRP's (Ong *et al.*, 2011), las cuales se expresan en los espermatozoides de ratón y de humano (Darszon *et al.*, 2012).

El uso de un modelo experimental de espermatozoides permeabilizados de humano ha permitido diseccionar componentes río abajo de la apertura de canales SOC. Se ha propuesto que el incremento de Ca^{2+} por la entrada tipo SOC activa a una adenilil ciclasa soluble (sAC) que promueve la producción de AMPc. Este nucleótido que puede señalar a través de un mecanismo dependiente de EPAC (proteína intercambiadora activada directamente por AMPc), el cual activa dos vías que convergen finalmente en la fusión de membranas completando la RA (Figura 3).

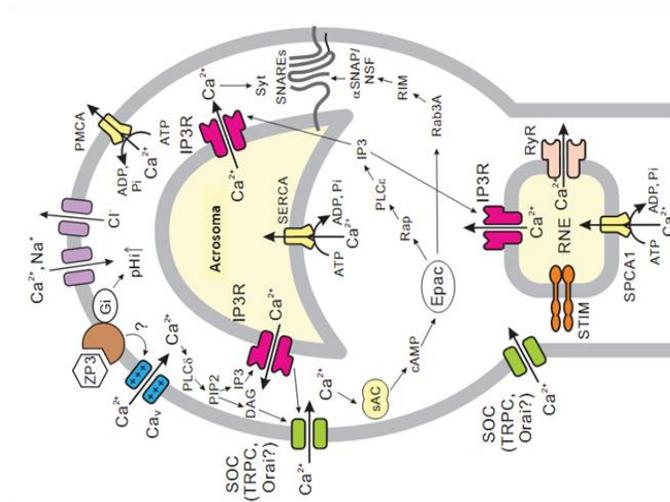


Figura 3. Modelo que describe la movilización de Ca^{2+} provocada por la unión de la glicoproteína ZP3 al (los) receptor(es) del espermatozoide durante la reacción acrosomal de mamíferos. La unión de la ZP3 activa a la proteína G_i probablemente involucrada en el incremento del pH_i , y podría también activar canales Ca_v por un mecanismo desconocido, la despolarización de la membrana. Este aumento inicial transitorio en el Ca^{2+} estimula a la $\text{PLC}\delta$ que cataboliza PIP_2 para producir IP_3 y DAG . IP_3 se une a su receptor localizado en el acrosoma y/o en la RNE (Envoltura Nuclear Redundante), liberando Ca^{2+} y activando SOCs (TRPCs y/o ORAI), posiblemente a través de la agregación de STIM. DAG y PIP_2 podrían también estimular canales TRPCs. El incremento sostenido de Ca^{2+} activa sAC (adenilil ciclasas solubles) la cual eleva el AMPc y activa a EPAC. La señalización de EPAC se bifurca en dos ramas: la activación de Rab3, promueve la unión en distintos puntos de las membranas acrosomal externa y plasmática, mediante el ensamblaje de las proteínas de fusión (SNARE; SNAP) y en la activación de Rap la cual estimula a la $\text{PLC}\epsilon$ para generar IP_3 y liberar Ca^{2+} , el paso final para la fusión de membranas. En el citosol se observan bajos y altos niveles de Ca^{2+} , los cuales se modulan a través de bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP (PMCA) y pozas de Ca^{2+} (SPCA1 y SERCA) (Tomada de Darszon *et al.* 2011).

1.2.3.1 Métodos para la evaluación de la Reacción acrosomal

La cuantificación de los espermatozoides reaccionados y no reaccionados hoy en día se puede hacer usando una variedad de métodos. El resultado de estas pruebas proporciona información que impacta en el campo de la fecundación, tanto en la investigación científica como en cuestiones de reproducción asistida. Los métodos usados comúnmente se describen a continuación.

Microscopía óptica de campo claro. Este método tiñe el contenido del acrosoma y la tinción diferencial permite la distinguir entre espermatozoides reaccionados y no reaccionados. Consiste en una tinción triple utilizando azul de tripano que marca espermatozoides muertos y Bismarck Brown Y con Rose Bengala que tiñen el segmento post-acrosomal de espermatozoides vivos (Talbot *et al.* 1980; 1981). Otro ensayo que utiliza este tipo de microscopía es el que utiliza Azul de Coomassie (Aarons *et al.*, 1993) y el método basado en el uso de la tinción de plata (Gosálvez *et al.*, 1986). En estos dos métodos la membrana plasmática debe permeabilizarse para permitir que los colorantes entren a la célula y puedan detectar el contenido del acrosoma. Esto se logra gracias a las severas condiciones del proceso de fijación y tinción, las cuales son suficientes para perturbar la membrana de los espermatozoides.

Los ensayos de microscopía óptica son usados comúnmente debido a su simplicidad y a su relativo bajo costo. Sin embargo, la identificación exacta de los espermatozoides reaccionados es difícil.

Microscopía de fluorescencia utilizando lectinas. Se utilizan una amplia variedad de lectinas acopladas a moléculas fluorescentes, las cuales permiten una mejor diferenciación entre espermatozoides reaccionados y no reaccionados (Amin *et al.*, 1996). Las lectinas más usadas comúnmente son la aglutinina de *Pisum sativum* (Cross *et al.*, 1986) la cual se une al contenido acrosomal y la aglutinina de cacahuate (Mortimer *et al.*, 1987) que se une a la membrana acrosomal externa. En estos ensayos se permeabiliza la membrana de los espermatozoide, por lo que, estas lectinas detectan el contenido acrosomal cuando los espermatozoides no han reaccionado. Existen otros métodos que detectan la membrana acrosomal interna o el contenido acrosomal excitado, y de esta manera tiñen espermatozoides que han completado la reacción acrosomal. Los marcadores que utilizan son Concanavalina A y el inhibidor de tripsina de soya (Holden *et al.*, 1990; Arts *et al.*, 1994).

Microscopía de fluorescencia utilizando anticuerpos. Los anticuerpos utilizados para evaluar el estado acrosomal son: anti-espermatozoide, antisuero anti-acrosina, antisuero anti-membrana acrosomal externa, anti-HS21 (Wolf *et al.*, 1985; Sánchez *et al.*, 1991), los cuales detectan espermatozoides intactos. El marcaje con estos anticuerpos es más laborioso ya que es necesario el uso de un anticuerpo secundario acoplado a una molécula fluorescente.

Existe otra categoría de ensayos de este tipo que utiliza los anticuerpos monoclonales GB24 y MH61 (Fénichel *et al.*, 1989). Estos anticuerpos detectan las cabezas de solo los espermatozoides reaccionados que han expuesto su membrana acrosomal interna o han exocitado sus componentes acrosomales, por lo cual no es necesaria la permeabilización de la membrana plasmática del espermatozoide. Por otra parte el ensayo “acrobead” utiliza perlas cubiertas con el anticuerpo monoclonal anti-CD 46 para determinar el estado acrosomal (Hershlag *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1997).

Fluorescencia de clortetraciclina. Este ensayo se basa en el principio de que el compuesto clortetraciclina (CTC) y los iones Ca^{2+} se unen a la membrana mostrando una fluorescencia altamente aumentada, son lo cual se pueden distinguir cuatro patrones diferentes (Lee *et al.*, 1987; DasGupta *et al.*, 1993; Fraser *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 1998). Patrón 1: EF (espermatozoides “frescos”) caracterizado por una fluorescente en la región post-acrosomal y otra en la pieza media, lo presentan espermatozoides de humano capacitados durante 1 hora. Patrón 2: DP (cabeza posterior oscura) caracterizado por presentar fluorescencia en la porción anterior de la cabeza y una banda oscura en la pieza media, se observa en espermatozoides de humano que se dejaron 3 horas capacitando. Patrón 3: (CP) se observa la cabeza completamente fluorescente con el perímetro muy brillante y fluorescencia en la pieza media, este patrón lo presentan espermatozoides de humano que se capacitaron durante 10 horas. Patrón 4: (RA) se pierde la fluorescencia en la cabeza y en la pieza media, se observa en espermatozoides de humano reaccionados. (Lee *et al.*, 1987).

Este método es fácil de realizarse pero el mecanismo por el que funciona aun se desconoce.

Citometría de flujo. Este método consiste en marcar a los espermatozoides con sondas fluorescentes. Con esta técnica se puede medir la fluorescencia de un gran número de células en muy corto tiempo. Las sondas que se han desarrollado para este propósito incluyen anticuerpos monoclonales (Fénichel *et al.*, 1989; Okabe *et al.*, 1990; Tao *et al.*, 1993), la aglutinina de cacahuete (PNA) (Purvis *et al.*, 1990; Engh *et al.*, 1991) y la aglutinina de *Pisum sativum* (Henley *et al.*, 1994). Un anticuerpo usado comúnmente es el anti-CD46, el cual se une a la membrana acrosomal interna (D'Cruz, y Haas, 1992; Carver-Ward *et al.*, 1994).

La Citometría de flujo es muy exacta y muy sensible, no es laboriosa como contar en el microscopio y consume menos tiempo, pero es necesario contar con un citómetro de flujo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Inductores de la reacción acrosomal

A pesar de que la glicoproteína ZP3 se ha considerado como el inductor natural de la RA, existen evidencias recientes que cuestiona fuertemente este modelo (ver más adelante); asimismo, se ha demostrado que diversas moléculas son capaces de inducir esta reacción. Muchas de ellas se encuentran en el tracto genital femenino por lo que podrían tener relevancia fisiológica. A continuación se describen brevemente algunos de estos inductores en el posible orden en que los espermatozoides los encontrarían durante su trayecto en el tracto reproductor femenino.

2.1.1 Ácido γ -aminobutírico (GABA)

GABA actúa como un neurotransmisor inhibitorio cuando se une a su receptor (GBRC, canal de Cl⁻/Receptor de GABA_A) en las neuronas postsinápticas del sistema nervioso central y periférico (Kaila, 1994). El GBRC se encuentra en la membrana plasmática como un receptor complejo acoplado a un canal de Cl⁻. Su activación conduce a la apertura del canal, induciendo flujo de iones Cl⁻ y consecuentemente, la hiperpolarización o despolarización de la membrana, dependiendo del tipo celular (Calogero *et al.*, 1999; Sieghart, 2006).

Interesantemente, existen altos niveles de GABA en la mucosa del oviducto, incluso mayores a los encontrados en el cerebro (hasta 10 veces más) (Murashima y Kato, 1986). Hay evidencias que apoyan la idea de que en el tracto reproductor femenino se encuentran los elementos necesarios para proporcionar un ambiente fisiológico adecuado para que un sistema GABAérgico module la función de los espermatozoides.

Las subunidades del receptor de GABA_A (α 1, α 5, β 1, β 3) se han identificado por inmunocitoquímica en el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide humano (Wistrom y Meizel, 1993) y en la superficie ventral del acrosoma de espermatozoides de rata (Hu *et al.*, 2002).

Los estudios *in vitro* han demostrado que GABA induce la RA en espermatozoides de humano, ratón y rata. Por lo tanto estos resultados sugieren que el canal de Cl⁻/receptor de GABA_A y un receptor quizás unido a un canal de Ca²⁺ o a un receptor de progesterona, participan en este proceso, esto último se respalda en gran medida por experimentos de RA en los que se observa un efecto aditivo en el porcentaje de espermatozoides que reaccionan en respuesta a GABA+progesterona. De manera interesante la habilidad de GABA para inducir la RA se bloquea en presencia de antagonistas de GBRC. Estos datos sugieren que GABA interactúa con GBRC para inducir la RA (Jin *et al.*, 2009).

2.1.2 Glicina

Al igual que el GBRC, el receptor de glicina (GlyR) se encuentra en la membrana plasmática como un receptor complejo unido a un canal de Cl⁻. Su activación conduce a la apertura del canal, induciendo un flujo de iones Cl⁻ y consecuentemente la hiperpolarización o despolarización de la membrana, dependiendo del valor del potencial de equilibrio del Cl⁻ en relación al potencial de reposo de la célula (Lynch, 2004.). Cuando la glicina induce la despolarización del potencial de membrana, esta provoca la activación de un influjo de Ca²⁺, el cual resulta necesario para el desarrollo de numerosos procesos celulares (Kneussel *et al.*, 2000).

Se sabe que hay glicina en el tracto genital femenino, sin embargo se desconoce la concentración exacta de este aminoácido en las diferentes regiones del tracto, únicamente se cuenta con reportes que indican que la concentración de este aminoácido en el fluido oviductal porcino es 380 μM, pero la concentración de glicina en el sitio usual de la fecundación, el ántrix, no está reportada (Iritani *et al.*, 1974).

Existe evidencia de que la glicina es capaz de inducir la RA en espermatozoides de cerdo, de humano (Melendrez, y Meizel, 1995) y de ratón (Sato, Son, & Meizel, 2009). Mediante inmunocitoquímica se ha observado que el receptor de glicina (GlyR) se encuentra presente en la región periacrosomal, y la densidad de esta proteína aumenta durante la capacitación. Además las concentraciones de glicina que estimulan la RA en espermatozoides de ratón (380 μM) coinciden con las reportadas en el fluido oviductal porcino (Sato *et al.*, 2000).

2.1.3 Acetilcolina (ACh)

Los receptores de acetilcolina (nAChR) pertenecen a la superfamilia de canales iónicos abiertos por ligandos, y son activados por nicotina además del neurotransmisor endógeno ACh. Los AChR se encuentran abundantemente en el cerebro, localizados tanto en las sinapsis (pre-sinápticamente y post-sinápticamente) como también extra sinápticamente (Dani *et al.*, 2007).

Los nAChRs son proteínas pentaméricas, formadas a partir de combinaciones entre nueve subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y tres β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (Champtiaux *et al.*, 2003; Fucile S., 2004). Algunos nAChRs son homoméricos, por ejemplo los receptores $\alpha 7$, sin embargo, otros son heteroméricos, los cuales comprenden subunidades α y β . Los diferentes subtipos de nAChRs neuronales se distinguen por ser diferencialmente permeables a Ca^{2+} . El nAChRs $\alpha 7$ tiene una de las más altas permeabilidades a Ca^{2+} , la activación del cual puede aumentar los niveles de Ca^{2+} citoplásmico y disparar una serie de procesos intracelulares dependientes de este ión (Szabo S.I., *et al.* 2008; Fayuk *et al.*, 2007).

Hay tres tipos de señales de Ca^{2+} iniciadas por la activación del nAChR neuronal; (1) entrada directa de Ca^{2+} a través del nAChR (Dajas-Bailador *et al.*, 2004; Rathouz *et al.*, 1994), (2) entrada de Ca^{2+} indirecta a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCCs) los cuales son activados por la depolarización mediada por nAChR (Dajas-Bailador *et al.*, 2004; Tsuneki *et al.*, 2000), y (3) la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} del retículo endoplasmático a través de los receptores de rianodina y de los de inositol trifosfato (Gueorguiev, 2000; Sharma, 2001; Dajas-Bailador, 2002).

La ACh dentro del tracto reproductor femenino se secreta por las células de la mucosa vaginal, las células de la granulosa del *cumulus oophorus* y por el ovario (Mayerhofer *et al.*, 2003). Además se sintetiza por las enzimas colina acetiltransferasa y la carnitina acetiltransferasa, cuya presencia se ha reportado en el espermatozoide de humano (Ibañez *et al.*, 1991). Así la ACh podría influenciar el comportamiento de los espermatozoides de una manera paracrina o autocrina.

Los espermatozoides de humano expresan las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, y $\beta 4$ del nAChR, localizadas en la pieza media, unión cabeza-flagelo y región post-acrosomal (Kumar y Meizel, 2005), y se sabe que a concentraciones micromolares de Ach pueden iniciar la RA en espermatozoides de humano y ratón capacitados (Bray *et al.*, 2002b). Esta respuesta se inhibe por antagonistas que bloquean al $\alpha 7$ nAChR y también inhiben la RA inducida por ZP3 de humano recombinante (ZP3hr) o ZP de ratón solubilizada en espermatozoides de humano y ratón, respectivamente (Bray *et al.*, 2002a).

2.1.5 ATP

Además del papel que juegan los nucleótidos en la fisiología celular, estas moléculas pueden secretarse de la célula y actuar como transmisores químicos en diversos sistemas celulares. Particularmente, el trifosfato de adenosina o ATP, una vez fuera de la célula, es degradado por ecto-ATPasas, formando ADP, AMP y adenosina. Todas estas moléculas ejercen su acción a través de los receptores tipo P, que se dividen en receptores P1 y P2, los cuales se activan principalmente por adenosina y ATP respectivamente. De manera general, al subtipo P1 pertenece a receptores acoplados a proteínas G; por otra parte, los receptores del subtipo P2 se subdividen en P2Y y P2X. Los receptores P2Y, también son receptores acoplados a proteínas G. Por su parte los receptores P2X, son canales catiónicos activados directamente por el ligando (Bean, 1992). La cascada de acción en otros tipos celulares involucra el influjo de Ca^{2+} , hidrólisis de fosfolípidos de inositol y producción de segundos mensajeros (Kozawa *et al.*, 1993).

El ATP extracelular es un potente activador de la exocitosis acrosomal en espermatozoides de humano. Se piensa que la exocitosis acrosomal inducida por ATP involucra el influjo de Na^+ pero no de Ca^{2+} , sin embargo el modo de acción se desconoce (Foresta *et al.*, 1996). El ATP está presente en el tracto reproductor femenino y su se sabe aumenta al momento de la ovulación, sin embargo se desconoce su concentración precisa (Karuhn, 1977).

En un trabajo previo se demostró que el ATP puede regular la exocitosis acrosomal vía receptores purinérgicos P₂ (acoplados a proteínas G y selectivos para ATP y ADP) mediante un mecanismo que involucra un incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular y la activación de proteínas cinasas C α (Luria *et al.*, 2002).

2.1.6 Esfingosina-1-fosfato

La esfingosina-1-fosfato es un esfingolípido bioactivo que regula procesos fisiológicos cruciales. Es un intermediario en el metabolismo de los esfingolípidos y su participación en las membranas biológicas se conoce desde hace muchos años. Ahora se sabe que también participa como mensajero en forma endócrina (comunicación general o sistémica en el organismo o por hormonas), paracrina (comunicación entre células cercanas de diferente estirpe o por factores locales) y autocrina (comunicación entre células cercanas de la misma estirpe, incluyendo a la secretora), regulando una gran cantidad de funciones de suma importancia, como la proliferación, la diferenciación y la migración, entre muchas otras (Álvarez *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que este esfingolípido dispara la exocitosis acrosomal en espermatozoides de humano por un mecanismo que involucra la activación de proteínas G_i . Además se mostró que la exocitosis inducida por esfingosina-1-fosfato requiere la activación de la fosfolipasa C y de la proteína cinasa C. Por otra parte, registros de Ca^{2+} mediante imágenes en tiempo real muestran un incremento significativo de Ca^{2+} citosólico en respuesta a la activación con esfingosina-1-fosfato y los experimentos farmacológicos mostraron que este proceso requiere el influjo de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} tanto operados por pozas internas como por voltaje y el eflujo a través de pozas intracelulares por medio de canales de Ca^{2+} sensibles a inositol trifosfato. En cuanto a la localización espacial de este evento de señalización se encontró que la esfingosina cinasa 1, que interviene en la síntesis de la esfingosina-1-fosfato, está distribuida en la región acrosomal (Suhaiman *et al.*, 2010) lo cual aporta evidencia adicional de la participación de este lípido.

Se desconoce el papel fisiológico de este lípido y si éste es producido por el ovocito o por el espermatozoide. Si fuera este último el caso, el esfingolípido se transportaría al medio extracelular y cumpliría una función autocrina/paracrina.

2.1.7 Progesterona

La progesterona, es una hormona secretada por las células del *cumulus oophorus*, y es capaz de estimular entre otros eventos fisiológicos, la RA. Esta hormona provoca un incremento rápido en la $[Ca^{2+}]_i$, y dicho incremento depende de la $[Ca^{2+}]$ extracelular, además se piensa que la liberación de Ca^{2+} de pozas intracelulares podría estar involucrada (Blackmore *et al.*, 1990). Sin embargo, trabajos recientes sugieren que el canal CatSper, un canal de Ca^{2+} cuya actividad es dependiente de pH y que se encuentra de manera exclusiva en el flagelo del espermatozoide, podría ser el receptor de la progesterona en el espermatozoide de humano, ya que se demostró mediante registros electrofisiológicos, que concentraciones nanomolares de esta hormona potencian la actividad del CatSper. Se postula que dicho canal es activado sinérgicamente por la elevación del pH intracelular y extracelularmente por progesterona (Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011).

2.1.7 *Cumulus oophorus*

Las funciones que se le atribuyen a las células del cumulus durante la fecundación comprenden 1) constituir un anclaje mecánico a los espermatozoides y guiar sólo a los hiperactivados hacia el ovocito, 2) prevenir que los espermatozoides no aptos entren a la matriz del cumulus y 3) crear un microambiente que favorezca la capacitación y penetración del espermatozoide al ovocito (Somm *et al.*, 2002). Sin embargo, recientemente se han acumulado evidencias que sugieren que el papel del *cumulus oophorus* es mucho más importante en la fecundación del que se le había atribuido, como se describe a continuación.

Para dilucidar el sitio exacto del inicio de la RA *in vivo*, se han adoptado varios métodos para observar la presencia o ausencia del acrosoma del espermatozoide a lo largo de su trayecto hacia el óvulo. Por ejemplo, recientemente utilizando los espermatozoides de un ratón genéticamente modificado, que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en su acrosoma y la proteína roja fluorescente en sus mitocondrias, se observó en tiempo real la RA en espermatozoides expuestos a ovocitos rodeados de células del cumulus. Este trabajo demostró que un porcentaje grande de espermatozoides reaccionan en el cumulus y de manera importante, el espermatozoide que logra fecundar al óvulo fue en la mayoría de los casos, uno que ya no tenía acrosoma. (Jin *et al.*, 2011).

A esto último se suma un trabajo posterior, donde se demostró que espermatozoides ya reaccionados, colectados del espacio perivitelino de óvulos de ratón, son capaces de fecundar óvulos con la ZP intacta y rodeados de células del cumulus. Además, tales óvulos fecundados son capaces de dar origen a descendencia fértil. Por consiguiente la idea de que espermatozoides ya reaccionados son incapaces de unirse a la ZP y pierden su capacidad de fecundar debe ser reconsiderada (Inoué *et al.*, 2011). Estos datos contradicen el paradigma de que el inductor fisiológico de la RA es la ZP3, sin embargo provienen de un par de trabajos, en una especie en particular y no son suficientes para rebatir muchos años de estudio. Aunque si abren preguntas muy interesantes y se pueden plantear nuevas hipótesis que nos permitan entender dónde ocurre la RA y la importancia fisiológica de los diferentes inductores.

Por otra parte se ha demostrado que la dispersión del contenido del acrosoma persiste por lo menos 15 minutos después de la iniciación de la RA *in vitro*, lo cual indica que al evaluar el estado del acrosoma no es adecuado clasificar a los espermatozoides como reaccionados y no reaccionados, ya que durante este proceso se presentan una serie de estados intermedios (Hardy *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2001; Kim y Foster, 2003; Sutovsky, 2010). Tomando en cuenta esto, es importante modificar los patrones utilizados para la evaluación de este proceso, que generalmente es del todo o nada, ahora se hace importante la evaluación de patrones intermedios.

Otra acción que se le podría atribuir al *cumulus oophorus* en mamíferos es en la quimiotaxis, ya que se sabe que posibles quimioatrayentes, tales como la heparina, progesterona, el péptido natriurético atrial (ANP), adrenalina, oxitocina, calcitonina y acetilcolina, podrían secretarse del *cumulus oophorus* e influenciar el comportamiento de los espermatozoides durante su trayecto hacia el óvulo (Sliwa, 1993; Sliwa, 1994; Anderson *et al.*, 1995; Sliwa, 1995; Villanueva-Díaz *et al.*, 1995; Teves *et al.*, 2009 y Guidobaldi *et al.*, 2008).

En un trabajo reciente se descubrió un “factor del espermatozoide” que se libera cuando se da la interacción cumulus-espermatozoide provocando la liberación de progesterona por las células del cumulus en un proceso dependiente de Ca^{2+} (Yin *et al.*, 2009). Este factor denominado NYD-SP8 es una proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) localizada en la parte posterior de la cabeza de espermatozoides de humano y de ratón. Cuando los espermatozoides se tratan con la fosfolipasa específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), la cual corta específicamente proteínas ancladas a GPI de la membrana, se ha observado que NYD-SP8, se detecta en el sobrenadante de la preparación. Por lo que se propone que NYD-SP8 se corta de la membrana del espermatozoide y se une a las células del cumulus en cuanto interaccionan, debido a que este factor solo se detecta en las células del cumulus después de ser incubadas con espermatozoides durante 6 horas. El NY-SP8

recombinante incrementa el Ca^{2+} intracelular en las células del cumulus, e induce que estas células liberen progesterona. Por lo tanto es probable que NY-SP8 se corte de la cabeza del espermatozoide en respuesta a la interacción con el cumulus, posteriormente se una a estas células, con la consecuente movilización de Ca^{2+} y liberación de progesterona. Esta progesterona secretada podría iniciar la RA dentro de las capas del cumulus (Yin *et al.*, 2009).

2.1.8 La zona pelúcida

Al finalizar su trayecto a través del tracto genital femenino y después de atravesar el *cumulus oophorus*, el espermatozoide tiene todavía que atravesar la zona pelúcida (ZP) para poder fecundar al óvulo. La ZP es una matriz glicoproteica fibrosa y porosa que se sintetiza y secreta por el óvulo durante el desarrollo folicular. La ZP de óvulos de ratón está integrada por filamentos de heterodímeros de las glicoproteínas ZP2 y ZP3, conectados mediante homodímeros de la glicoproteína ZP1. Esta matriz desempeña un papel crucial durante y después del proceso de fecundación, ya que actúa como sustrato especie-específico para la unión del espermatozoide, además se ha propuesto como el principal agonista de la RA, evita la polispermia y protege al cigoto hasta que este se implanta en la superficie del útero (Gupta *et al.*, 2007).

A diferencia de los óvulos de ratón en donde la ZP está integrada solo por tres glicoproteínas, en los óvulos de otras especies como la humana, la ZP está formada por cuatro glicoproteínas: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Lefievre *et al.*, 2004). Las funciones propuestas para cada glicoproteína provienen mayoritariamente de estudios en óvulos de ratón. De acuerdo con estos resultados, la ZP1 contribuye a mantener la integridad estructural de la ZP, actuando como la unión molecular entre los filamentos que conforman a la matriz extracelular (Greve *et al.*, 1985), la ZP3 actúa como ligando para el/los receptor(es) de los espermatozoides con acrosoma intacto e induce la RA (Bleil *et al.*, 1983) y la ZP2 es el receptor responsable de la unión a los espermatozoides que perdieron el acrosoma (Bleil, *et al.*, 1988). Ensayos utilizando ZP1 y ZP4 recombinantes, así como ZP4 nativa de óvulos de humano, indican que estas proteínas son capaces de inducir la RA probablemente a través de una vía de señalización distinta a la de ZP3, al menos en el caso de la ZP4 (Chakravarty *et al.*, 2005; Caballero-Campo *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2008; Ganguly *et al.*, 2010).

Es importante resaltar que a pesar de la gran diversidad de los inductores de la RA, todos comparten el requerimiento de un aumento de Ca^{2+} intracelular. Además, tomando en cuenta las recientes evidencias que cuestionan el papel de la ZP3 como el inductor fisiológico de la RA, toman importancia todos los inductores alternativos que se han reportado pero cuya función fisiológica se desconoce.

Considerando esto último, podríamos especular que la fecundación es un evento cooperativo que involucra a una población de espermatozoides, los cuales de manera diferencial podrían iniciar la RA en el *cumulus oophorus*, en donde algunos espermatozoides reaccionarían primero para permitir el paso de otros espermatozoides aun no reaccionados hacia la ZP y ya en este sitio llevar a cabo la RA que les permitirá fecundar al óvulo. Esto ayudaría a explicar porque hay tantos y tan diversos inductores de la RA y porque se requieren millones de espermatozoides para lograr que solo uno fecunde al óvulo (Sun, Chung, y Chan, 2011).

Para contribuir a dilucidar el papel fisiológico de cada uno de estos inductores, es necesario realizar estudios que midan con alta resolución temporal y espacial la movilización de Ca^{2+} que cada uno de estos induce, obteniendo de esta manera, información que nos ayude a identificar a los canales involucrados y a determinar si las vías de señalización en las que participan son compartidas. Hasta el momento solo existe un trabajo en el que se midió con alta resolución temporal el aumento de Ca^{2+} en respuesta a progesterona en espermatozoides de humano (Strünker *et al.*, 2011).

3. HIPÓTESIS

El aumento de Ca^{2+} intracelular en espermatozoides de humano en respuesta a GABA, Glicina, y Acetilcolina presenta características cinéticas distintas, siendo esto indicativo de la vía de señalización en la que participan estos inductores.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la cinética del aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por GABA, Glicina, y Acetilcolina en espermatozoides de humano.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Corroborar la inducción de la RA mediada por GABA, Glicina, y Acetilcolina.
- Determinar con baja y alta resolución temporal la cinética del aumento de Ca^{2+} intracelular en poblaciones de espermatozoides de humano en respuesta a GABA, Glicina, y Acetilcolina.
- En célula única (resolución espacial), analizar la movilización de Ca^{2+} mediada por GABA, Glicina, y Acetilcolina.

6. MATERIALES

6.1 Reactivos

Para los ensayos de RA y las mediciones de la cinética de Ca^{2+} se utiliza ionomicina, que se obtuvo de Alomone labs (Israel, Jerusalén), yoduro de propidio (PI) obtenido de Molecular Probes, Fluo-3 AM adquirido en Invitrogen, mientras que progesterona, GABA, Glicina, Acetilcolina, bicuculina, la lectina de *Pisum sativum* acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), el ionóforo de Ca^{2+} A-23187, el cloruro de calcio (CaCl_2), la albúmina sérica bovina (BSA), la Poly-L-lysine, la Concanavalina A, el dimetil sulfóxido (DMSO; CH_3SOCH_3), el medio HAM's F-10, el cloruro de sodio (NaCl), el cloruro de potasio (KCl), el bicarbonato de sodio (NaHCO_3), el HEPES (ácido [N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico]), el cloruro de magnesio (MgCl_2), el cloruro de manganeso (MnCl_2), el lactato de sodio, el piruvato de sodio y el Tritón X-100 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos).

6.2 Biológicos

Las muestras de espermatozoides eyaculados se obtuvieron de donadores sanos y se verificó que las muestras, cumplieran con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS 2010) (Tabla 1).

Parámetro	Valor
Volumen	~ 1.5 mL
pH	≥ 7.2
Concentración espermática	$\sim 15 \times 10^6$ céls/mL
Cantidad total de espermatozoides	$\sim 39 \times 10^6$ céls/eyaculado
Movilidad	32% con movilidad progresiva
Morfología	4% con morfología normal
Viabilidad	58% espermatozoides vivos

Tabla I. Parámetros establecidos por la OMS muestras de semen humano.

7. MÉTODOS

7.1 Nado hacia arriba y capacitación

Cada muestra de semen se colecta en el laboratorio dentro de un frasco estéril de plástico, y se incuba en una cámara húmeda a 37° C y 5% de CO₂ durante ~40 minutos, promoviendo así la licuefacción de la muestra. Después los espermatozoides móviles se separan del semen mediante la técnica de “swim-up” (del inglés, *nado hacia arriba*).

El método de nado hacia arriba se basa en la separación de los espermatozoides mediante nado propio, desde el fluido seminal hacia una capa superior de medio artificial dentro de un tubo de ensayo. Para lo cual se colocan dentro de un tubo, 1 ml de semen previamente licuado, y sobre éste se agrega 1 ml de medio HAM's F-10 con 2 mM de Ca²⁺ y 5 mg/ml de BSA (HAM'S F-10 suplementado), evitando la mezcla de ambas fases. El tubo se coloca con una inclinación de 30° dentro de una gradilla y se incuba durante 1 hora en una cámara húmeda a 37° C y 5 % de CO₂. Posteriormente las células móviles se recuperaran tomando los 750 µl superiores de la fase de medio HAM's F-10 suplementado. Finalmente se cuentan las células con una cámara de Makler y se ajusta la densidad de espermatozoides (10x10⁶/ml) (Henkel, 2003).

Los espermatozoides móviles recuperados se incuban durante 4 horas en una cámara húmeda a 37° C y 5 % de CO₂ para promover la capacitación. Al finalizar el proceso, se toma el número de espermatozoides requeridos para cada experimento (Yanagimachi, R., 1994).

7.2 Ensayos de reacción acrosomal

Se utilizan espermatozoides capacitados. En cada experimento se coloca el volumen necesario de cada inductor (ZP3hr, GABA, glicina, Acetilcolina, progesterona, ionomicina, A23187). Después se adiciona medio HAM's F-10 suplementado, al volumen final de 200 µl con 300,000 células capacitadas y se resuspenden. La prueba se almacena durante 30 minutos en una incubadora con las siguientes características: cámara húmeda a 37° C y 5 % de dióxido de carbono (CO₂), con la finalidad de estimular la RA de las células. Posteriormente se agregan 200 µl de PBS al tubo y se centrifugan durante 5 minutos a 740 xg. El sobrenadante se descarta y se adicionan 40 µl de

metanol frío para permeabilizar las membranas, plasmática y acrosomal. Las células se transfieren a su respectivo pozo sobre un portaobjetos con cubierta de teflón y se dejan secar.

Posteriormente, a cada pozo se le adicionan 10 μ l de FITC-PSA (25 μ g/ml en PBS) (PSA: lectina de *Pisum sativum*, dimérica con alta afinidad por α -D-manosa y α -D-glucosa, por lo cual reconoce varias proteínas glicosiladas presentes en el acrosoma) y la placa se coloca en ambiente húmedo dentro de una cámara oscura durante 30 minutos. Después el portaobjetos se introduce en un frasco oscuro con agua bidestilada fría y se mantiene en agitación constante durante 15 minutos, cambiando el agua cada 5 minutos para eliminar el exceso de FITC-PSA. El agua se descarta del portaobjetos y la placa se deja secar sobre una plancha a 37° C y protegida de la luz. Finalmente los espermatozoides se observan en un microscopio de fluorescencia con un objetivo 100X y se evalúa el estado del acrosoma en no menos de 200 células elegidas al azar (Cross *et al.*, 1989).

7.3 Ensayos de reacción acrosomal: citómetro de flujo

Se utilizan espermatozoides obtenidos mediante la técnica de nado hacia arriba, y posteriormente se capacitan (4-12 horas). En cada experimento se coloca el volumen necesario de cada inductor (GABA, Glicina, Acetilcolina, etc.) para obtener la concentración final deseada, después se adiciona medio HAM's F-10 suplementado (200 μ l) y 2×10^6 células capacitadas. La prueba se mantuvo durante 30 minutos en una incubadora, con la finalidad de estimular la RA en las células. Posteriormente se agregan 200 μ l de PBS al tubo y se centrifugan durante 5 minutos a 740 xg. El sobrenadante se descarta y se adiciona FITC-PSA a una concentración final de 0.2 μ g/ml en 500 μ l de medio de registro (MR; en mM, KCl 4, NaHCO₃ 15, D-glucosa 5, L-lactato de sodio 10, HEPES 10, NaCl 120, Piruvato de Sodio 1, MgCl₂ 1, pH 7.4). La suspensión de células se guarda durante 30 minutos en la incubadora. Adicionalmente se utilizó ioduro de propidio (PI), como indicador de viabilidad ya que su ingreso a la célula indica muerte, el cual se incubó durante 1 minuto, previo a pasar la muestra por el citómetro de flujo (modificado de Nagy *et al.*, 2003).

Finalmente la cuantificación de la RA se realiza en un citómetro de flujo (FACSAria/FACSCanto/FACSCalibur). Se seleccionó una ventana en una distribución "dot plot" de "forward scatter" (FSC: detector de dispersión frontal de la luz) contra "side scatter" (SSC: detector de dispersión lateral de la luz). El detector frontal brinda información acerca del volumen de la célula, mientras que los detectores laterales brindan información acerca de la

complejidad interna de la misma. La gráfica de puntos FSC contra SSC se utiliza para excluir partículas indeseables (basura o restos de células muertas) del análisis. Las muestras se excitaron con longitudes de onda de 490 nm (FITC-PSA) y 536 nm (PI); y los datos de fluorescencia de 10000 células se colectaron en escala logarítmica para el espectro de emisión: 525 nm y 617 nm específica para la tinción de la lectina marcada fluorescentemente y el colorante de viabilidad, respectivamente. Los datos se analizaron en el programa FlowJ.

Se consideran espermatozoides reaccionados aquellos en los que se detecta fluorescencia para FITC-PSA (PSA: lectina de *Pisum sativum*, dimérica, con alta afinidad por α -D-manosa y α -D-glucosa, por lo cual reconoce varias proteínas glicosiladas presentes en el acrosoma), mientras que los muertos serán aquellos que presentan fluorescencia para PI.

7.4 Cargado de la sonda fluorescente sensible a Ca^{2+}

Se utilizan espermatozoides previamente capacitados. Al finalizar la capacitación, las células se centrifugan durante 5 minutos a 740 xg, se retira el sobrenadante y posteriormente se resuspenden en 1 ml de medio Ham's F-10 suplementado con una concentración final de 2 μM de Fluo-3 AM. Las células se incuban durante 30 minutos y después de transcurrido el tiempo de cargado con la sonda, se centrifugan nuevamente durante 5 minutos a 740 xg. Finalmente se descarta el sobrenadante y la pastilla de células se resuspende en MR para obtener la cantidad final de células/ml, requerida para cada experimento (Nishigaki *et al.*, 2006)

7.5 Medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en población con flourometría convencional

La cuantificación de los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en poblaciones de espermatozoides de humano capacitados, se realiza mediante el registro de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo en un espectrofluorómetro de la marca SLM-AMINCO operado con el software de adquisición OLIS Global Works. Se colocan en un tubo 3×10^6 espermatozoides de humano (previamente cargados con Fluo3-AM) en un volumen de 600 μl de MR y se transfiere a la cámara de muestra del espectrofluorómetro. Durante los primeros 120 segundos se registra la fluorescencia basal de las células. Posteriormente se agrega GABA, Glicina o Acetilcolina a diferentes concentraciones, luego Progesterona a una concentración final de 4 μM como control positivo y finalmente Tritón

X-100 0.1 % para obtener la señal máxima de fluorescencia. La muestra se mantiene en agitación y a una temperatura de 37 °C. Los datos se adquieren a una frecuencia de 0.5 Hz durante 4 minutos. (Servin-Vences *et al.*, 2012).

Los valores crudos de la intensidad de fluorescencia se importaron a Microsoft Excel y se normalizaron utilizando la siguiente ecuación: F/F_0-1 , donde F es la intensidad de fluorescencia a un tiempo dado (t) y F0 es la fluorescencia basal antes de cualquier adición. La serie total de F/F_0-1 se representa en función del tiempo. Al llevar a cabo los registros de Ca^{2+} con Fluo-3 se utilizan longitudes de onda de excitación y emisión de 505 nm y 525 nm, respectivamente y el suministro de la iluminación está mediado por un LED (Luxeon V Star Lambertian Cyan LED)

7.6 Medidas de Ca^{2+} en población con alta resolución temporal

Se utiliza un espectrofluorómetro de mezclado rápido (SFM400, Bio-Logic). Durante el experimento se colocan en las jeringas de mezclado las células (cargadas previamente con la sonda fluorescente) y el agonista a probar. La mezcla se lleva a cabo por el desplazamiento de los émbolos de las jeringas a una velocidad de 1.5 ml/segundo (Strünker *et al.*, 2011). Ambas sustancias ingresan en una celda de mezclado (con regulación de temperatura a 37° C) que está acoplada a un monocromador de excitación, y la iluminación proviene de una lámpara de Xenón de 150 W. En cada disparo se mezclan un total de 160 μ l (80 μ l de cada jeringa). Los datos de fluorescencia se colectan durante 50 segundos, muestreando cada 10 milisegundos y durante 5 minutos muestreando cada 50 milisegundos.

Finalmente, la fluorescencia producto de la respuesta se detecta con un fotomultiplicador de alta resolución temporal que amplifica la señal y la envía hacia un ordenador en donde se pueden registrar los cambios en la intensidad de la fluorescencia con respecto al tiempo.

Al llevar a cabo los registros de Ca^{2+} con Fluo-3 AM se utilizan longitudes de onda de excitación y emisión de 505 nm y 525 nm, respectivamente.

7.7 Medidas de $[Ca^{2+}]_i$ en célula única

Las células previamente cargadas con el colorante se adhirieron de la cabeza a cubreobjetos cubiertos con poly-L-lysine 0.01% (w/v) o Concanavalina A 0.25 mg/ml. Los cubreobjetos se montan en una cámara de registro (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) que se coloca en la plataforma con temperatura regulada de un microscopio invertido Nikon Diaphot 300 (Nikon Inc., El Segundo, CA, USA). El suministro de la iluminación está mediado por Luxeon V Star Lambertian Cyan LED. LXHL-LE5C (Lumileds Lighting LLC, San José, CA, USA) instalado en una caja de control estroboscópico. El LED está sincronizado a la señal externa de exposición de una cámara CCD vía la caja de control para producir un flash único de 2 ms de duración por exposición individual. El tiempo de exposición de la cámara se ajusta de manera equivalente a la duración del flash (2 ms). Las imágenes se colectaron cada 250 ms o cada 100 ms usando el programa IQ (Andor Bioimaging, Morrisville, NC, USA) y utilizando un objetivo Nikon 60X/1.40 AN (apertura numérica) (aceite) (Nishigaki *et al.*, 2006).

En los experimentos en los que se quela el Ca^{2+} extracelular se utiliza EGTA, cuya concentración necesaria se calculó en: <http://maxchelator.stanford.edu/>

El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J (National Institutes of Health, <http://rsbweb.nih.gov>).

7.8 Análisis estadístico

Se realizaron experimentos independientes utilizando muestras de al menos cinco donadores distintos. El análisis estadístico y procesamiento de datos se realiza utilizando los programas Microsoft Excel y KyPlot. Las diferencias entre los valores experimentales crudos y los valores controles crudos se analizaron mediante pruebas Tukey-Kramer y ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas cuando $*p \leq 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Reacción acrosomal

8.1.1 Curva dosis respuesta de GABA, Glicina y Acetilcolina

Existen reportes que indican que GABA, Glicina y Acetilcolina inducen la RA, sin embargo dichos trabajos son aislados y fueron publicados hace más de diez años. Además se utilizaron concentraciones superiores a las encontradas en el tracto reproductor femenino y no todos los experimentos se hicieron en espermatozoides humanos. Es por esto que decidimos verificar la habilidad de estos compuestos para inducir la RA en espermatozoides de humano.

Los ensayos de RA se llevaron a cabo como se describe en el apartado de **MÉTODOS**, y en todos se utilizó el mismo lote de los inductores. Inicialmente se determinó la concentración de GABA, Glicina y Acetilcolina que generaran el mayor porcentaje de RA utilizando cinco concentraciones distintas. Es importante mencionar que todos los valores de RA mostrados en este trabajo corresponden a la diferencia obtenida de sustraer el porcentaje promedio de RA espontánea (en la mayoría de los casos este porcentaje fue menor a 5 %) a los porcentajes promedio de RA obtenidos en cada condición. Por esta razón el valor del control negativo (DMSO) siempre es cero. Así mismo, en todos los experimentos se utilizaron tres controles positivos: el ionóforo de Ca^{2+} A-23187 (10 μ M), progesterona (10 μ M) y ZP3hr (10 ng/ μ l). En la **Figura 4** se muestran las curvas obtenidas con GABA, Glicina y Acetilcolina:

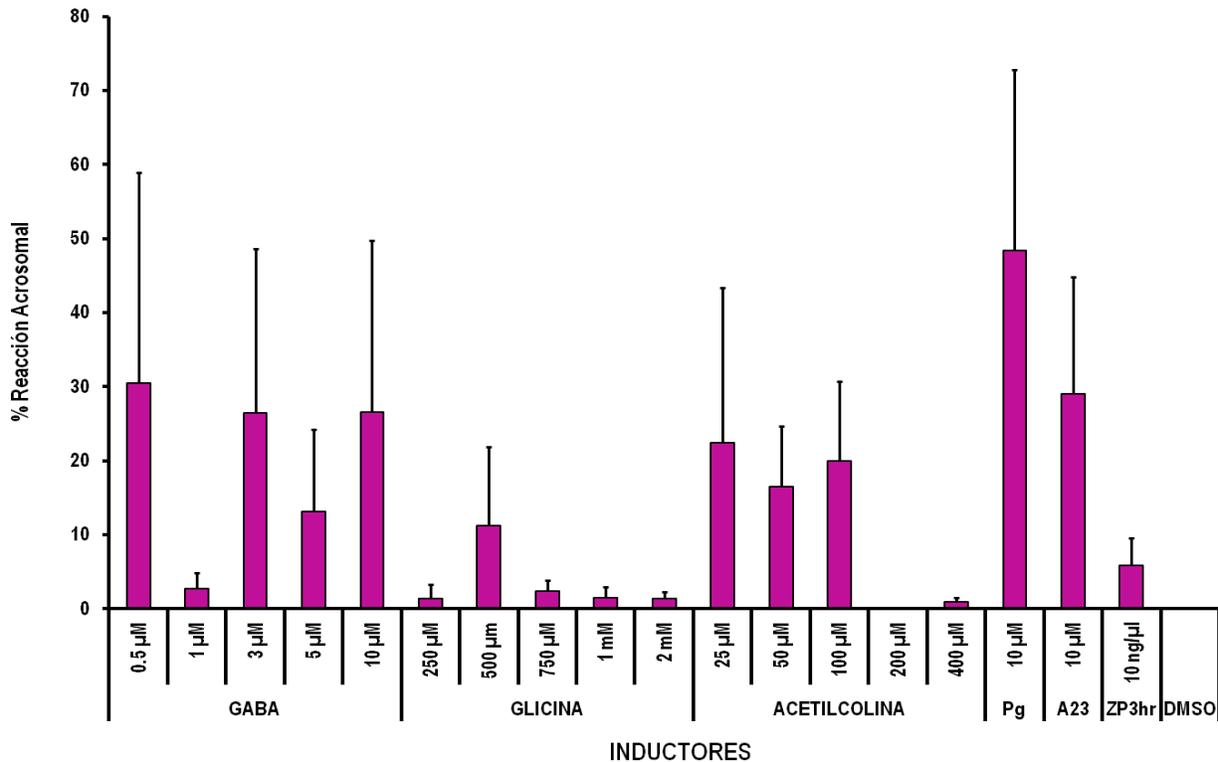


Figura 4. Curva dosis-respuesta de la RA inducida por GABA, Glicina y Acetilcolina. Ensayos de RA utilizando espermatozoides capacitados de humano incubados en presencia de cinco concentraciones distintas de GABA (0.5, 1, 3 5 y 10 μM), Glicina (250, 500 Y 700 μM y 1 y 2 mM), Acetilcolina (25, 50, 100, 200 y 400 μM) y como controles positivos: progesterona (Pg) (10 μM), A23187 (10 μM) y ZP3hr (10 ng/(10 μl)). Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea y se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n = 3.

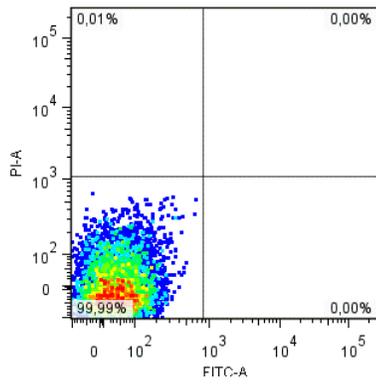
En la gráfica se observa que GABA, Glicina y Acetilcolina, así como también los controles positivos: A23187, progesterona y ZP3hr son capaces de inducir RA, sin embargo el efecto de estos inductores no es claro dada la alta variabilidad en los datos. Pensamos que esto puede ser un problema metodológico, como por ejemplo fallas en el proceso de permeabilización de la membrana de los espermatozoides, por lo cual es necesario realizar más experimentos considerando variaciones en la metodología que nos permitan asegurar una buena permeabilidad de la membrana para así obtener resultados reproducibles y concisos.

8.1.2 Reacción acrosomal: citómetro de flujo

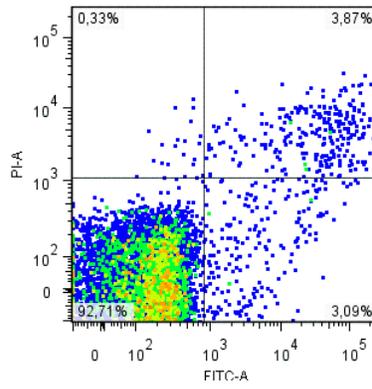
A pesar de que la técnica tradicional (ensayos en laminilla y conteo manual de acrosomas excitados por observación al microscopio) es reconocida en el campo de estudio de la fisiología del espermatozoide y se ha usado rutinariamente en nuestro laboratorio, por lo que se considero cuantificar la RA mediante este método. Sin embargo, los problemas de reproducibilidad persistieron por lo que decidimos explorar la técnica de citometría de flujo que nos permite cuantificar este evento, y simultáneamente distinguir células vivas de muertas. Para este fin comenzamos estableciendo un protocolo con las condiciones experimentales adecuadas (densidad celular, concentración de indicadores fluorescentes, controles de tinción, etc.) óptimas para esta determinación.

Posteriormente los ensayos de RA se llevaron a cabo como se describe en el apartado de **MÉTODOS**, y en todos se utilizó el mismo lote de los inductores. Con base a los datos de cuantificación de ingreso de Ca^{2+} obtenidos en experimentos realizados en población y en célula única (ver más adelante) decidimos utilizar, como primera aproximación, la concentración de estos inductores con la que habíamos observado el mayor ingreso de Ca^{2+} : GABA 3 μM , Glicina 750 μM y Acetilcolina 400 μM que posiblemente generarían el mayor porcentaje de RA. Así mismo, en los experimentos se utilizaron tres controles positivos: los ionóforos de Ca^{2+} , ionomicina (10 μM) y A-23187 (10 μM) y la progesterona (10 μM). Mientras que como controles negativos se utilizaron células sin teñir y tratadas solo con DMSO 0.1% (vehículo únicamente de ambos ionóforos y progesterona). En la **figura 5** se muestran gráficas de puntos en donde se presenta la fluorescencia de FITC-PSA: indicador de RA contra PI: indicador de células muertas. Cada gráfica está dividida en 4 cuadrantes e indican: superior izquierdo: células que incorporaron PI y por tanto están muertas, superior derecho: células que incorporaron tanto PI como FITC-PSA y por tanto indica que están muertas y reaccionadas, en el inferior izquierdo se muestran células que no incorporaron ninguno de los dos colorantes fluorescentes, por lo que están vivas pero no reaccionadas y finalmente en el inferior derecho se muestran células vivas y reaccionadas.

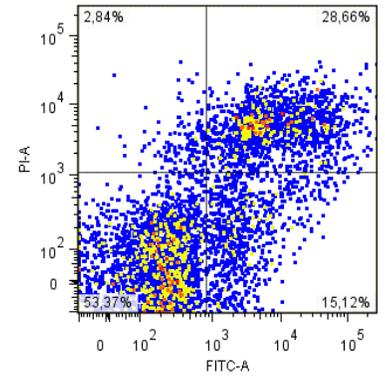
a) Control sin teñir



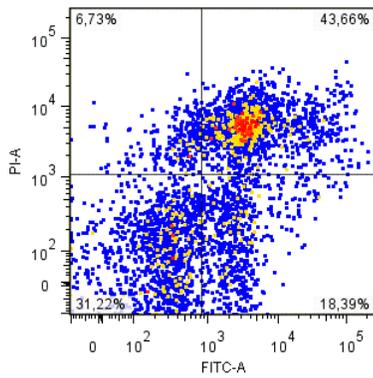
b) DMSO



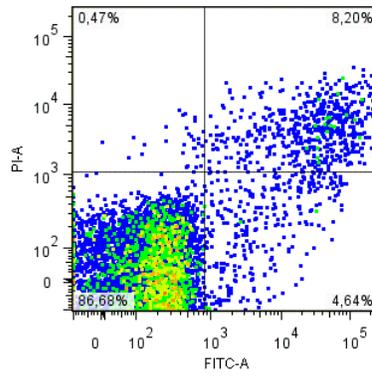
c) Ionomicina



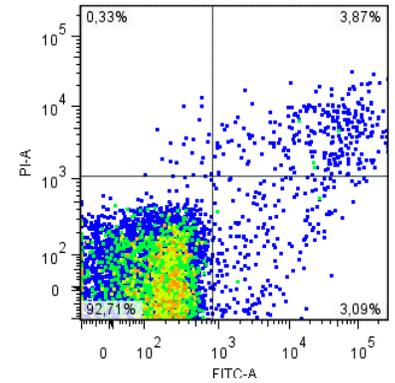
d) A23187



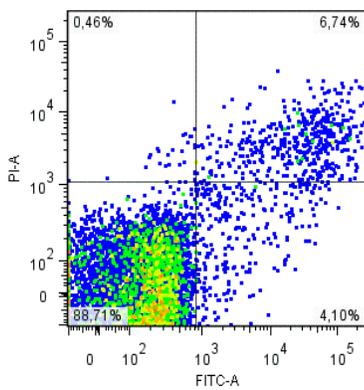
e) Progesterona



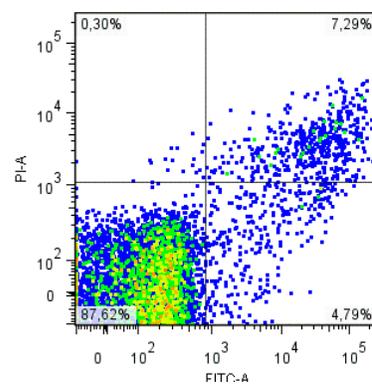
f) GABA



g) Glicina



h) Acetilcolina



i)

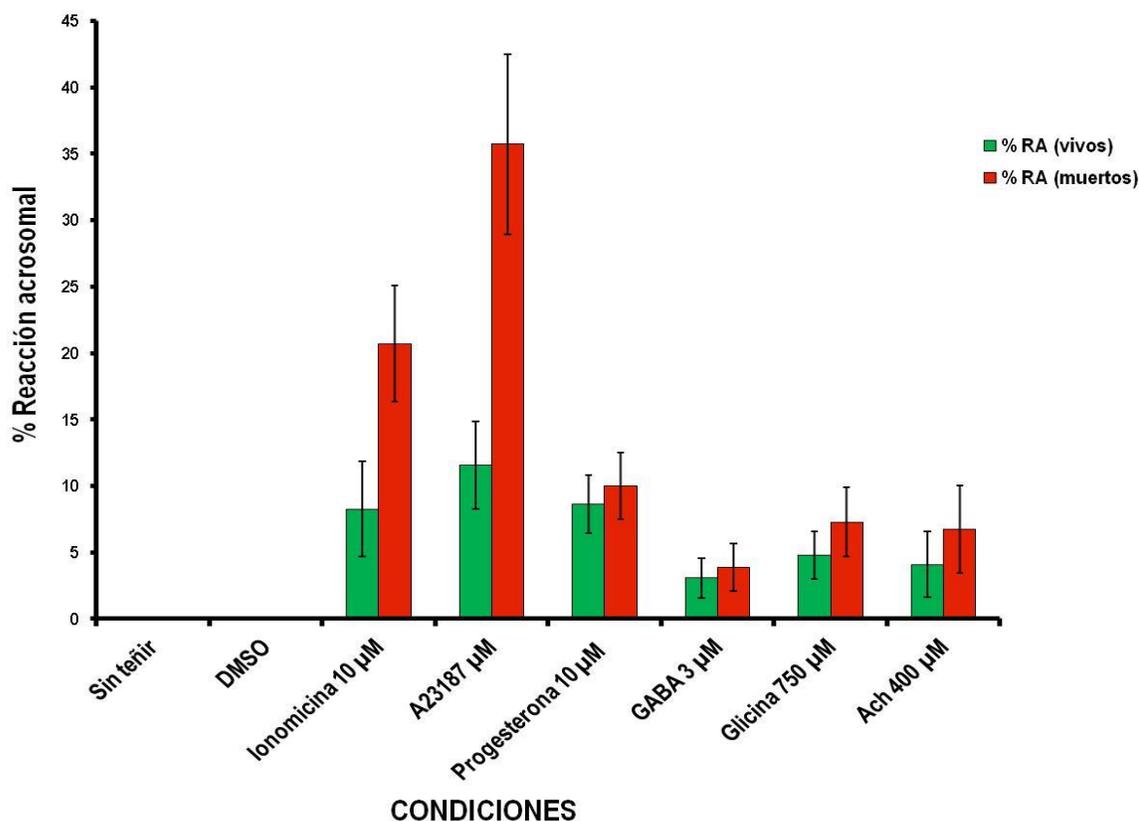


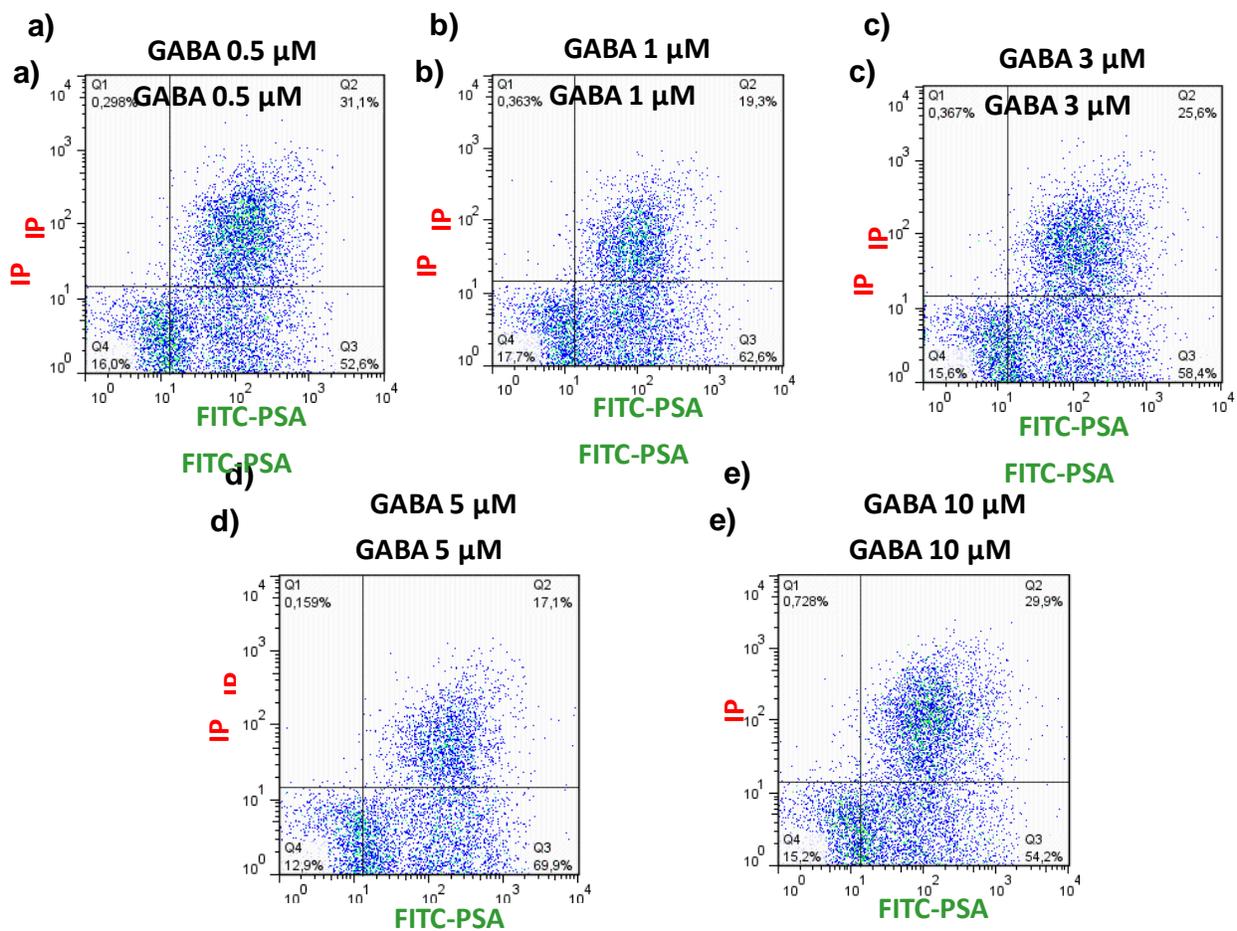
Figura 5. RA inducida por GABA, Glicina y Acetilcolina cuantificada en citómetro de flujo. Ensayos de RA utilizando espermatozoides capacitados de humano incubados en presencia de distintos inductores (concentraciones finales): GABA (3 µM), Glicina (750 µM), Acetilcolina (400 µM) y como controles positivos: progesterona (10 µM), A23187 (10 µM), ionomicina (10 µM). La cuantificación de RA se realizó utilizando el citómetro de flujo FACS Aria. En cada gráfica de puntos se esquematiza la fluorescencia de FITC-PSA (indicador de reacción acrosomal) contra PI (indicador de células muertas). En cada cuadrante inferior derecho de las figuras (a-h) se indican los porcentajes de espermatozoides vivos y reaccionados, mientras que en el superior derecho se muestran los espermatozoides muertos y reaccionados. Se muestra un experimento representativo de 3. En (i) se grafican los porcentajes de RA de células vivas y muertas. Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea y la inducida con DMSO, se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n = 3.

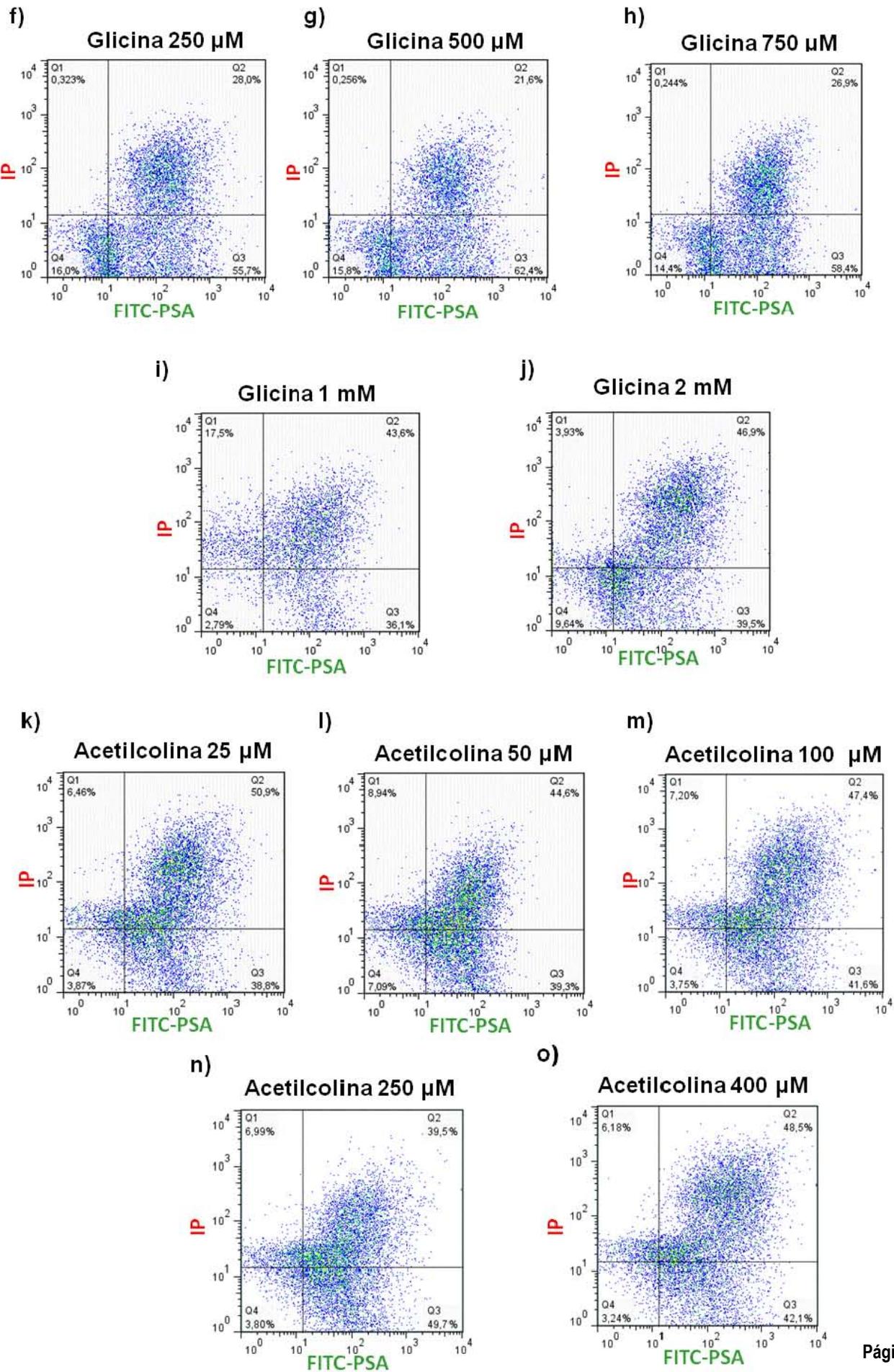
Tanto en la gráfica de puntos como en la de barras observamos que GABA, Glicina y Acetilcolina, así como también los controles positivos: A23187, ionomicina, progesterona son capaces de inducir RA, sin embargo también se observa que el DMSO 0.1%, que usamos como control negativo induce RA, por lo que debemos de tratar de eliminar el efecto de este compuesto y además en posteriores experimentos hacer controles de los solventes específicos de cada uno de los inductores probados, ya que para este caso, el DMSO es el control estricto solo para A23187, ionomicina y progesterona (por lo que el % de RA inducido con DMSO se le resta al % de RA producido por estos tres compuestos), mientras que para los tres neurotransmisores es agua.

Lo interesante de estos experimentos es que pudimos detectar porcentajes de RA, en respuesta a inductores conocidos, que concuerdan con los valores reportados, lo cual es indicativo de que el diseño del experimento está

funcionando adecuadamente pero además nos permite distinguir a las células vivas, lo cual no es posible con la tinción tradicional. Con base en estos resultados podemos confirmar que los inductores de nuestro interés son capaces de inducir la RA.

Utilizando esta metodología nos interesó realizar la curva dosis-respuesta de la RA mediada por GABA (0.5, 1, 3, 5 y 10 μM), Glicina (250, 500, 750 μM , 1 y 2 mM), Acetilcolina (25, 50, 100, 250 y 400 μM) y comparar los resultados obtenidos con la metodología clásica (en laminilla), los resultados se muestran en la **figura 6**.





p)

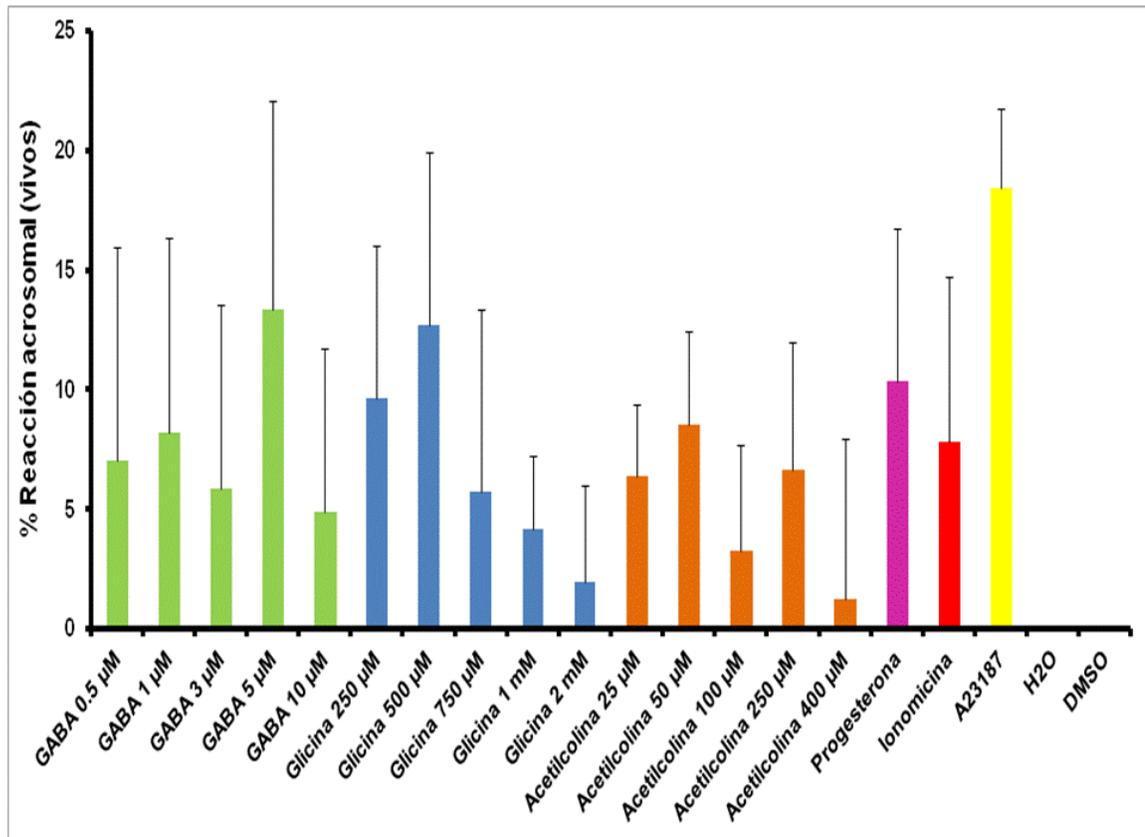


Figura 6. RA inducida por GABA, Glicina y Acetilcolina cuantificada en citómetro de flujo. Ensayos de RA utilizando espermatozoides capacitados de humano incubados en presencia de cinco concentraciones distintas de GABA (0.5, 1, 3 y 10 μM), Glicina (250, 500, 750 μM y 1 y 2 mM), Acetilcolina (25, 50, 100, 200 y 400 μM). La cuantificación de RA se realizó utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur. En cada gráfica de puntos observamos la fluorescencia de FITC-PSA (indicador de reacción acrosomal) contra PI (indicador de células muertas). En cada cuadrante inferior derecho de las figuras (a-o) se indican los porcentajes de espermatozoides vivos y reaccionados, mientras que en el superior derecho se muestran los espermatozoides muertos y reaccionados. Se muestra un experimento representativo de 5. En (p) se grafican los porcentajes de RA de células vivas, los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea (H₂O y DMSO) y se presentan como promedio ± error estándar del promedio (S.E.M.). n = 5.

Al analizar los porcentajes de RA que obtuvimos utilizando esta metodología observamos que las curvas dosis respuesta de los tres neurotransmisores que probamos muestran un comportamiento de campana (fácilmente observable cuando se analizan los porcentajes de RA de cada experimento de manera individual). Interesantemente dicho comportamiento es similar a los datos obtenidos en las mediciones de Ca²⁺ (mostrados en la siguiente sección).

Por otra parte observamos una gran variabilidad en los porcentajes de RA y esto lo atribuimos a que los experimentos no se realizaron en las condiciones óptimas, debido a que tuvimos que utilizar el citómetro de otra institución (Cinvestav). Entre los problemas a los que nos enfrentamos al realizar estos ensayos se encuentra la imposibilidad de mantener a los espermatozoides a la temperatura y niveles de CO₂ adecuados y además las muestras de semen con las que trabajamos se obtuvieron de individuos que donaron por primera vez sin realizar las pruebas necesarias para comprobar que cumplieran con los parámetros establecidos por la OMS para individuos sanos (viabilidad, morfología, movilidad, etc.). Consideramos que estas variables contribuyeron de manera importante sobre la viabilidad de las células, por lo cual tenemos claro que aun tenemos que realizar más ensayos procurando eliminar hasta la menor variable que obstaculice obtener resultados contundentes. Sin embargo, es importante mencionar que logramos establecer las condiciones para realizar esta metodología nueva para nuestro laboratorio, ahora utilizando el citómetro del IBT (FACSCanto), que nos permitirá evaluar uno de los procesos más importantes que se presentan en el espermatozoide y que es indispensable para que se lleve a cabo la fecundación de manera exitosa, además nos brinda la enorme ventaja de poder discriminar entre células vivas y muertas.

8.2 Registros de Ca^{2+} en población

En estudios previos se ha demostrado que GABA, Glicina y Acetilcolina son capaces de inducir la RA y también se sabe que para que este proceso se lleve a cabo se requiere de un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Yanagimachi, R., 1994). Además dada la variabilidad en los resultados obtenidos en los ensayos de RA decidimos explorar el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en poblaciones de espermatozoides de humano capacitados inducido por diferentes concentraciones de GABA, Glicina y Acetilcolina. Inicialmente determinamos las concentraciones ideales de GABA, Glicina y Acetilcolina capaces de producir un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en poblaciones de espermatozoides, para lo cual utilizamos el espectrofluorómetro (SLM-AMINCO). En la **figura 7** se muestra un trazo representativo en el que se muestra el aumento de Ca^{2+} producido por la concentración de cada inductor que fue capaz de generar el mayor incremento en la intensidad de fluorescencia. Se grafican los valores normalizados del cambio en la fluorescencia contra tiempo, lo cual es proporcional al cambio en la concentración intracelular de Ca^{2+} , producidos en repuestas a la concentración indicada de cada compuesto, como control positivo se adiciona progesterona.

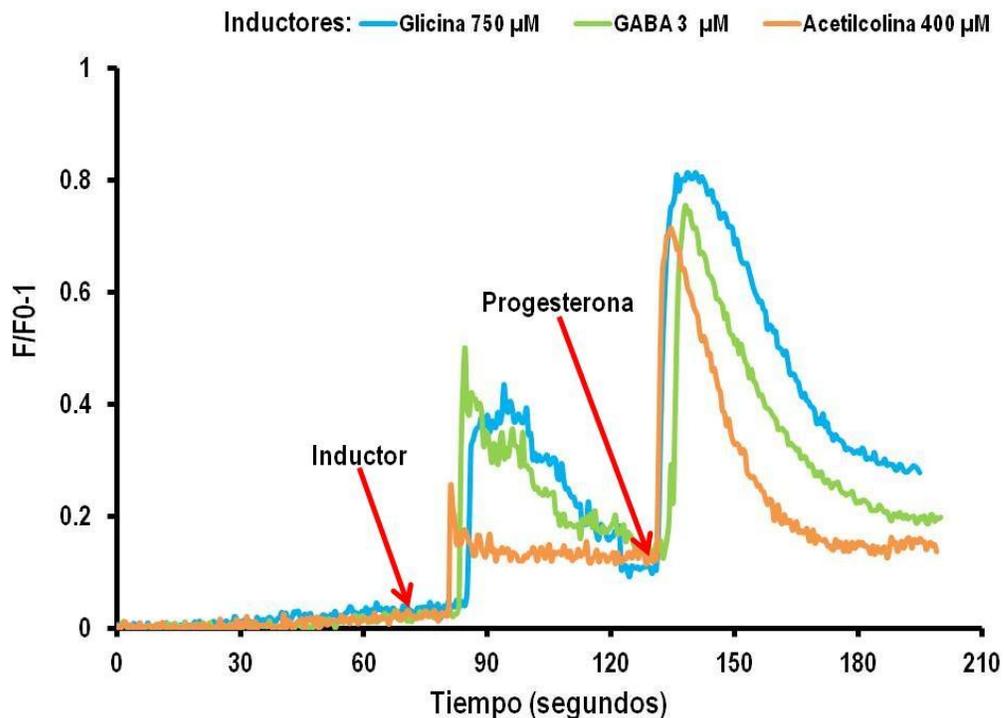
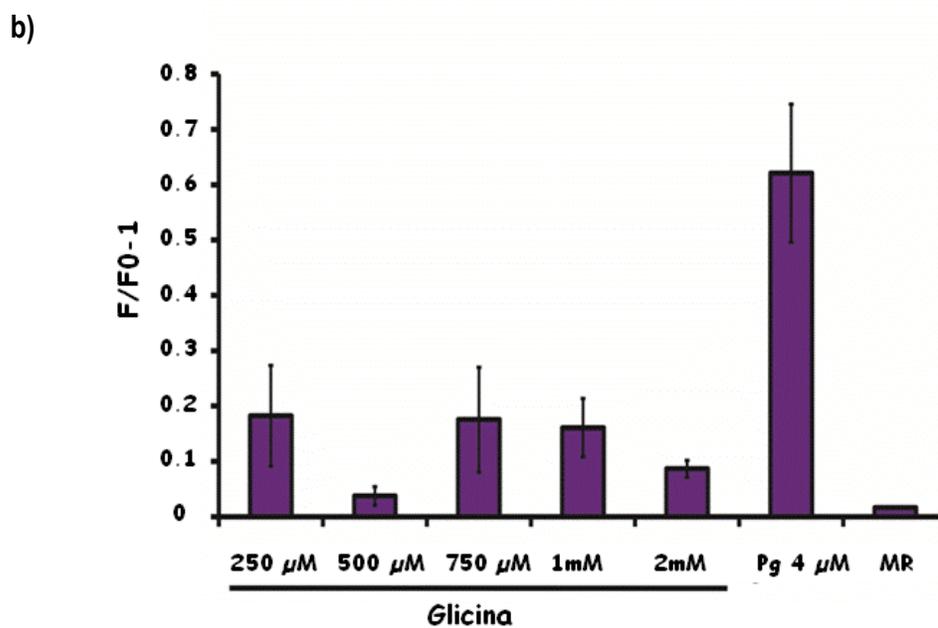
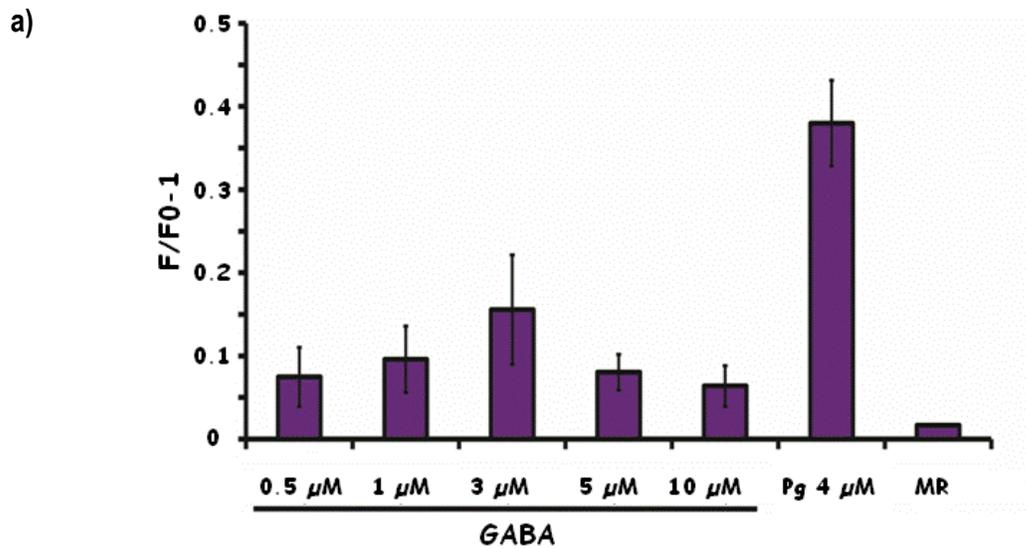


Figura 7. GABA, Glicina y Acetilcolina estimularon un aumento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides. Trazo representativo de espermatozoides de humano capacitados cargados con Fluo 3 mostrando el incremento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causado por la adición de Glicina (750 µM), GABA (3 µM) y Acetilcolina (400 µM), seguido de la aplicación de progesterona (4 µM) como control positivo. Las escalas indican $(F/F_0)-1$ contra tiempo (segundos), donde F es la intensidad de fluorescencia al tiempo t y F0 es la fluorescencia inicial antes de cualquier adición.

Para determinar la capacidad de GABA, Glicina y Acetilcolina en el aumento de Ca^{2+} intracelular se probaron cinco concentraciones diferentes de cada uno de estos compuestos. En la **figura 8** se muestra la curva dosis-respuesta del aumento de Ca^{2+} en espermatozoides de humano capacitados, utilizando progesterona ($10 \mu\text{M}$), como control positivo y como control negativo la respuesta producida al adicionar solamente MR (medio de registro).



c)

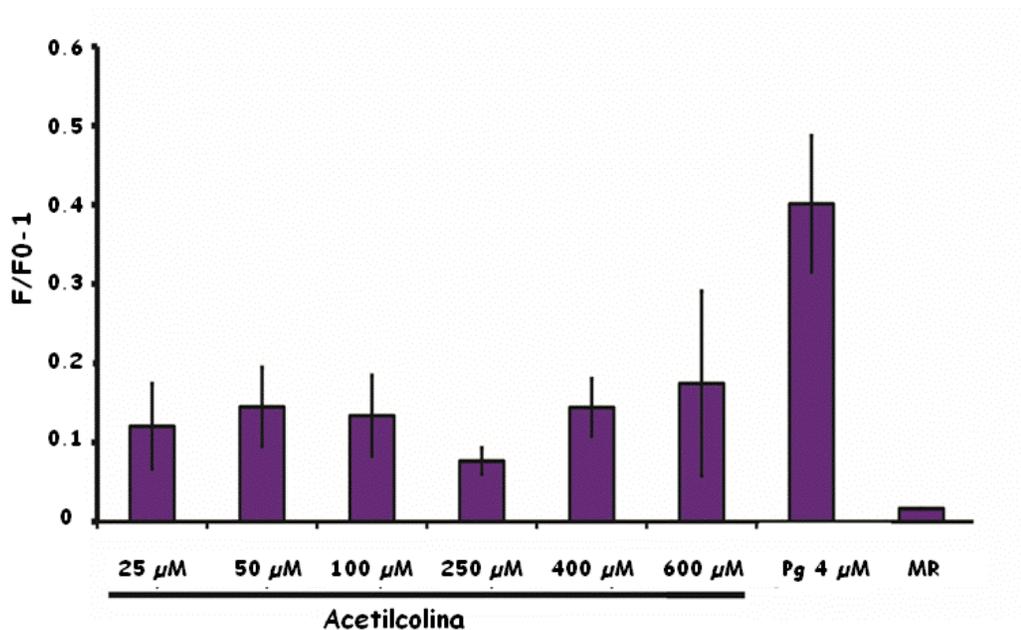


Figura 8. GABA, Glicina y Acetilcolina inducen aumentos en el $[Ca^{2+}]_i$. Cambios en la intensidad de fluorescencia (Ca^{2+} intracelular) causados por la adición de GABA (a), Glicina (b) y Acetilcolina (c) a las concentraciones indicadas. Además se utilizó progesterona (Pg) y medio de registro (MR) como control positivo y negativo, respectivamente. Cada grupo representa la media \pm SEM de 5 experimentos independientes, (n=5). Los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ indicados como F/F0, donde F es la intensidad de fluorescencia al tiempo t y F0 es la intensidad de fluorescencia inicial antes de cualquier adición. Prueba Tukey-Kramer (N.S. diferencias no significativas entre las distintas concentraciones de GABA, Glicina y Acetilcolina utilizadas ($p \leq 0.05$)).

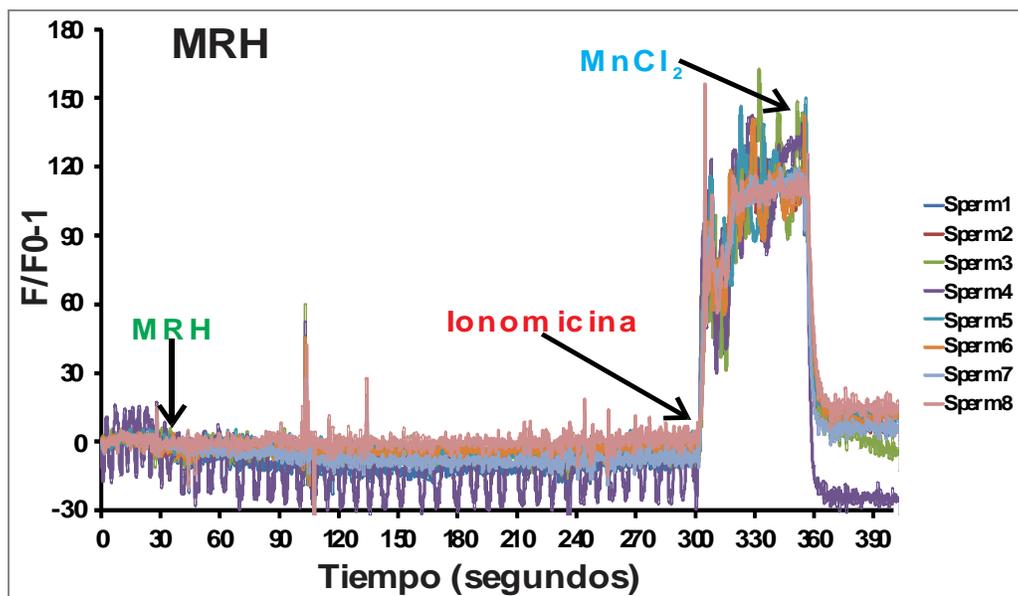
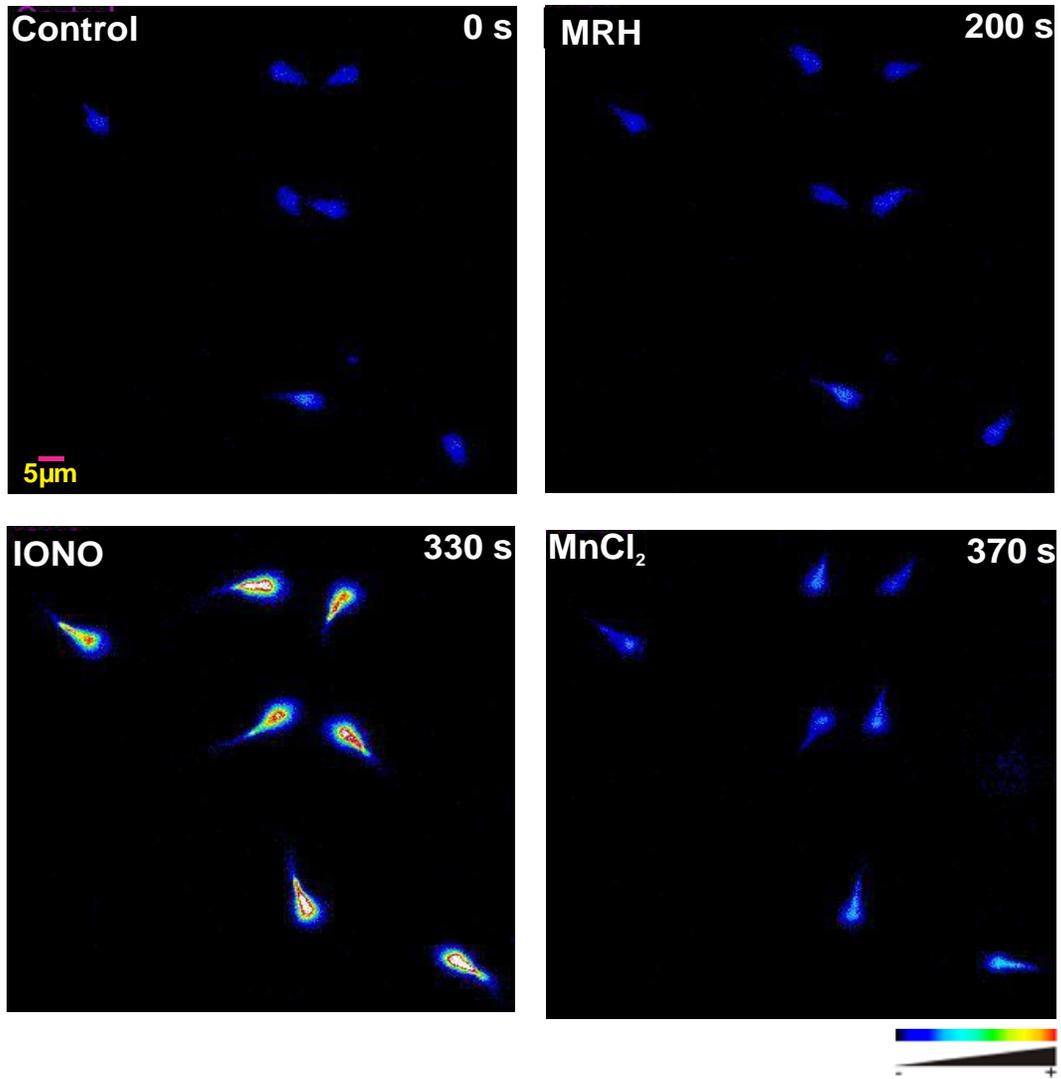
Los resultados anteriores muestran que GABA 3 μ M, Glicina 750 μ M y Acetilcolina 400 μ M, son capaces de inducir un incremento en la concentración intracelular Ca^{2+} . Tomando en cuenta estos resultados decidimos utilizar dichas concentraciones de inductores en los siguientes experimentos.

8.3 Registros de $[Ca^{2+}]_i$ en célula única

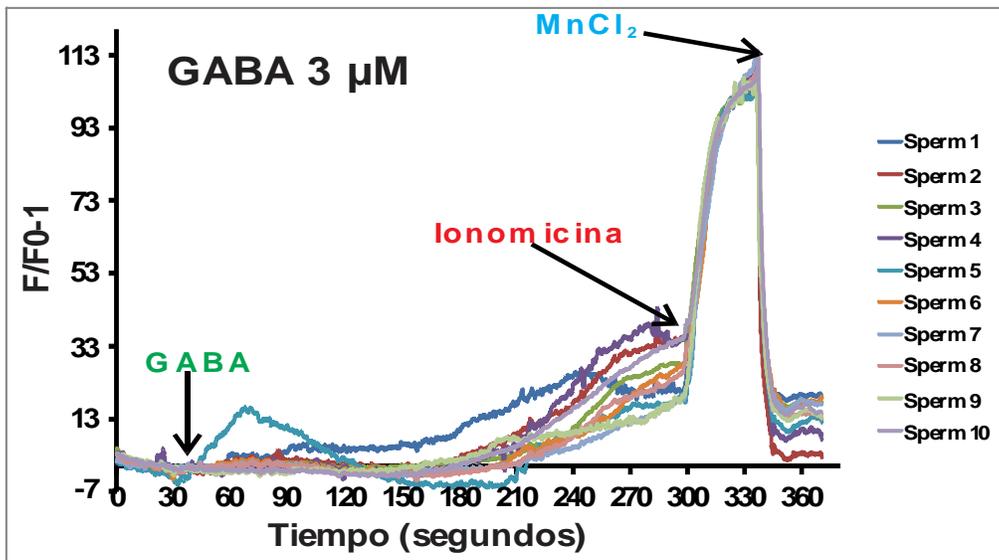
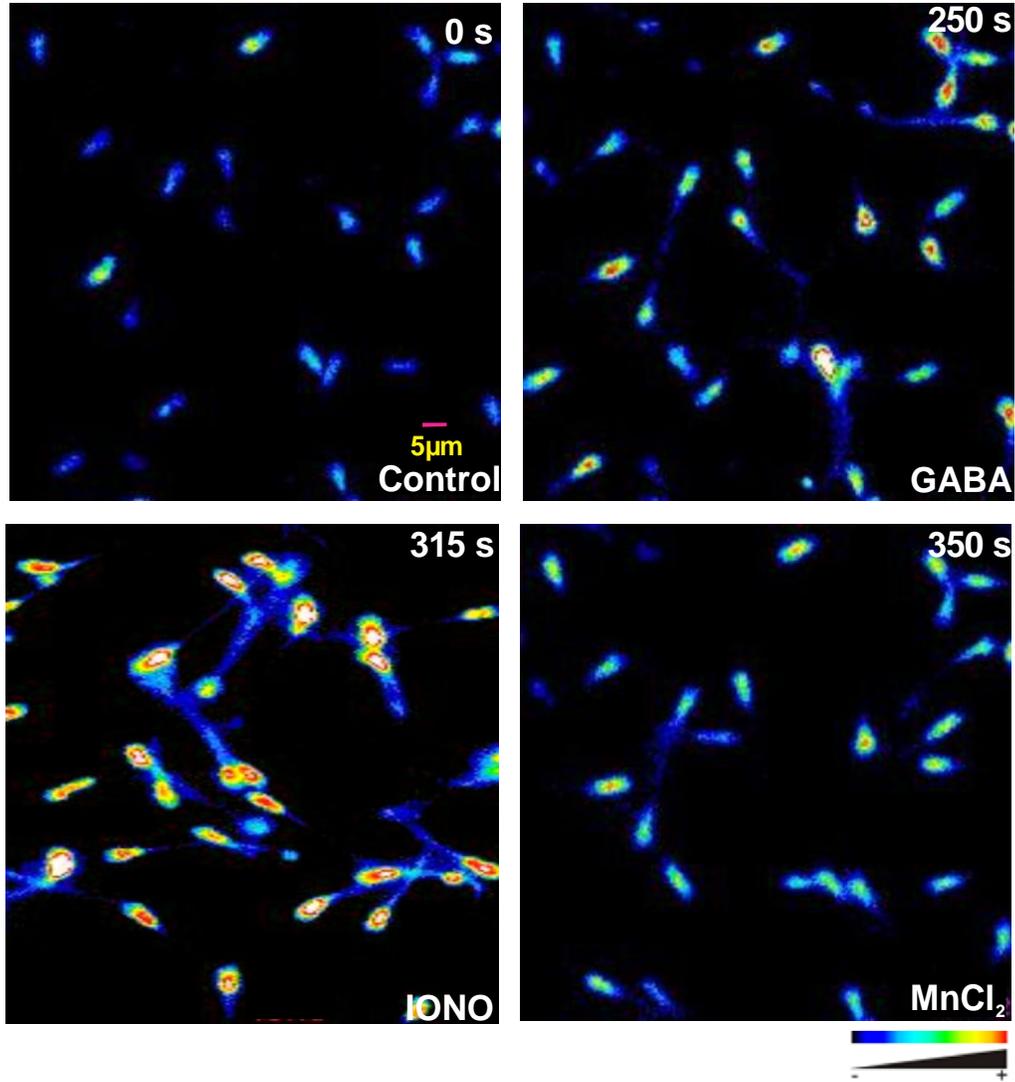
Los registros anteriores muestran un promedio de la respuesta de las células en suspensión pero no proporcionan información espacial ni idea de la heterogeneidad de la respuesta en la población celular. Evidencias recientes sugieren que el canal principal que conduce Ca^{2+} en el espermatozoide es CatSper, algunos reportes demuestran que este canal es activado por una gran variedad de compuestos, y se encuentra únicamente en la pieza principal del flagelo (**figura 1**), por lo tanto la espacialidad de los aumentos de Ca^{2+} puede contribuir a dilucidar la participación de CatSper u otro canal del calcio del que se conozca su distribución. Por tal motivo es importante investigar el sitio en el que inicia el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ mediado por GABA, Glicina y Acetilcolina.

Para este fin realizamos medidas de Ca^{2+} intracelular mediante adquisición de imágenes fluorescentes en célula única, en respuesta a GABA 3 μ M, Glicina 750 μ M y Acetilcolina 400 μ M y obtuvimos los resultados que se muestran en las imágenes de la **figura 9** en los cuales se observa el cambio en la intensidad de fluorescencia del sensor de Ca^{2+} Fluo 3 respecto al tiempo, lo cual es directamente proporcional al aumento en $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides. Al final de cada experimento se utilizó como control positivo ionomicina a una concentración final de 20 μ M, para obtener la señal máxima de fluorescencia y comprobar que las células son capaces de responder, y para apagar la fluorescencia de Fluo 3 se utilizó $MnCl_2$ 5 mM (concentración final).

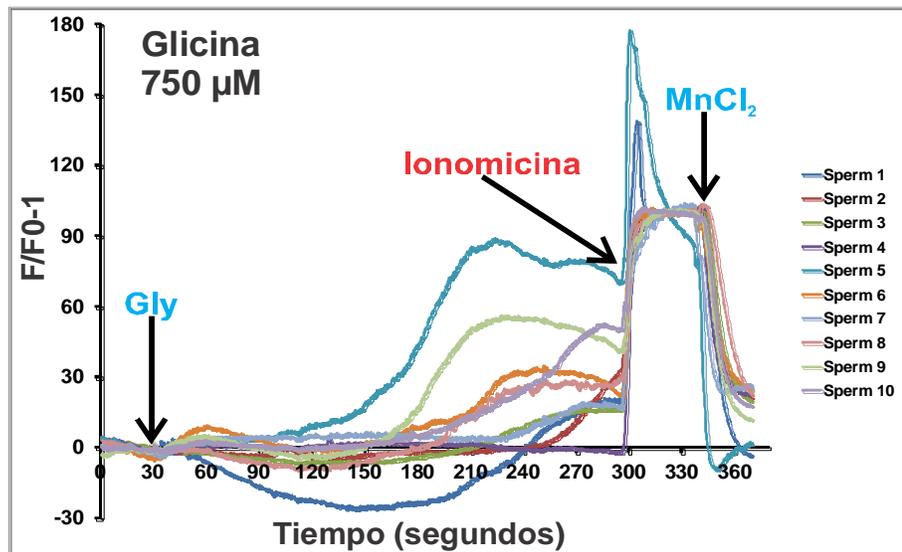
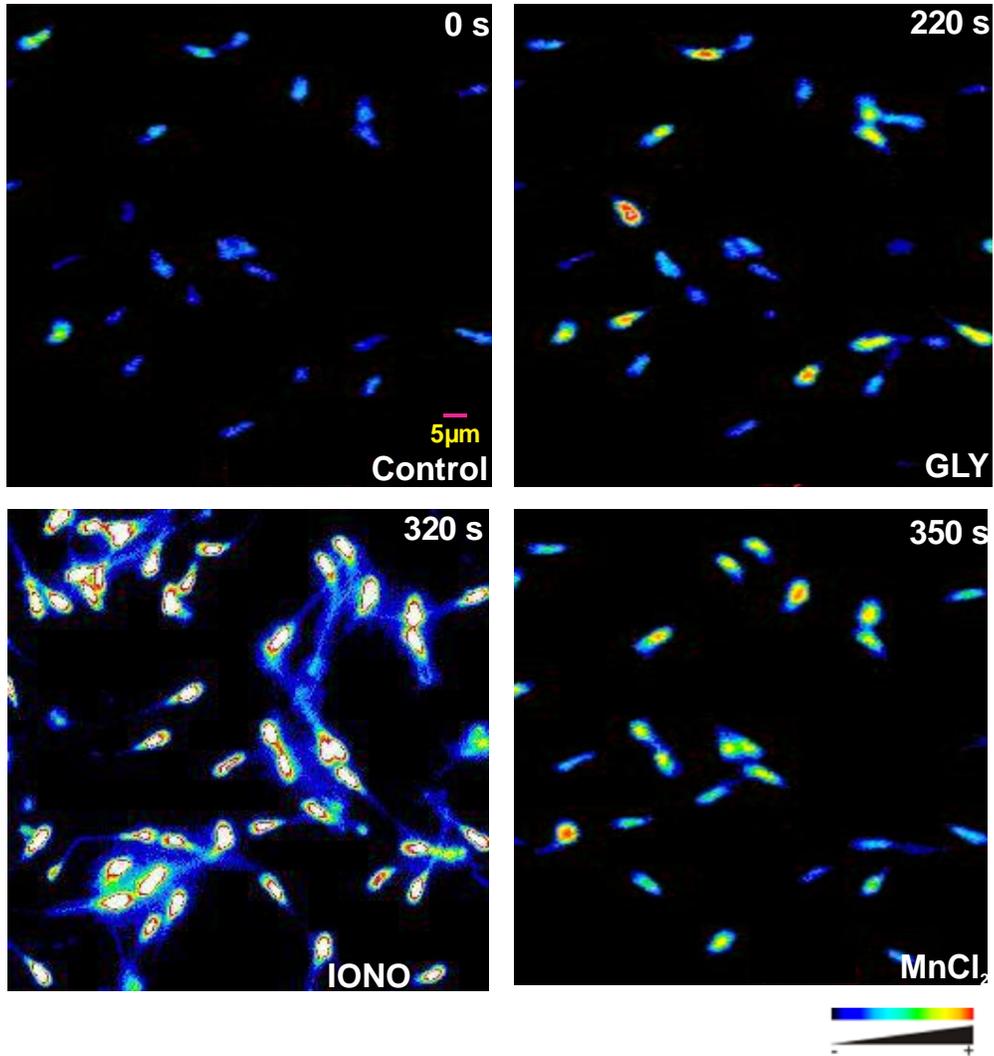
a) a)



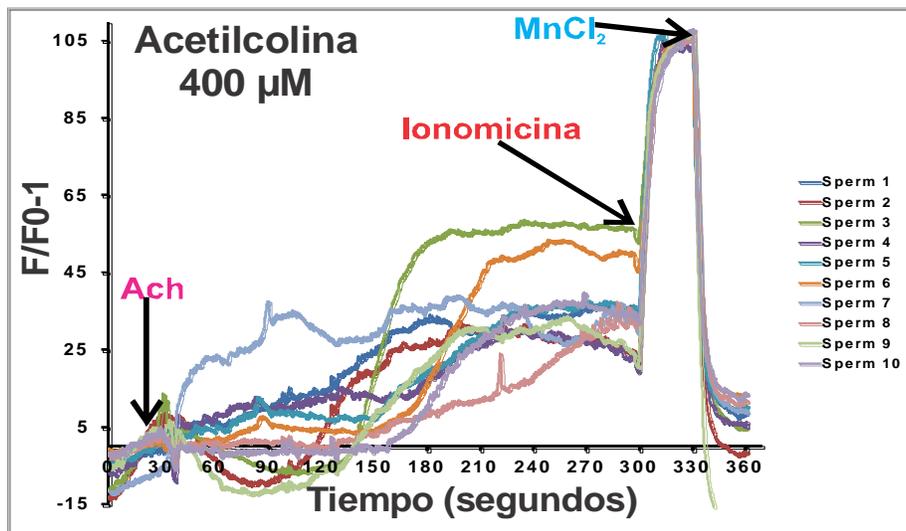
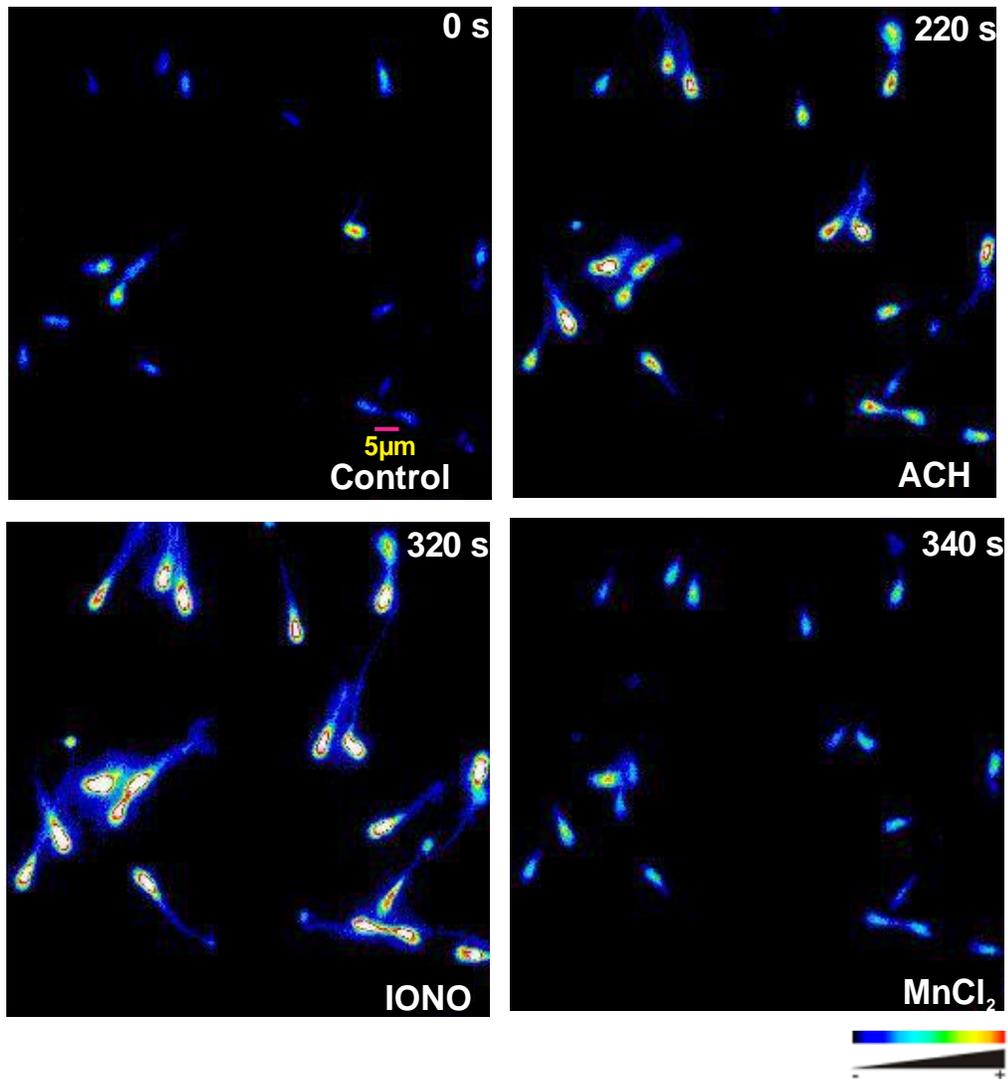
b)



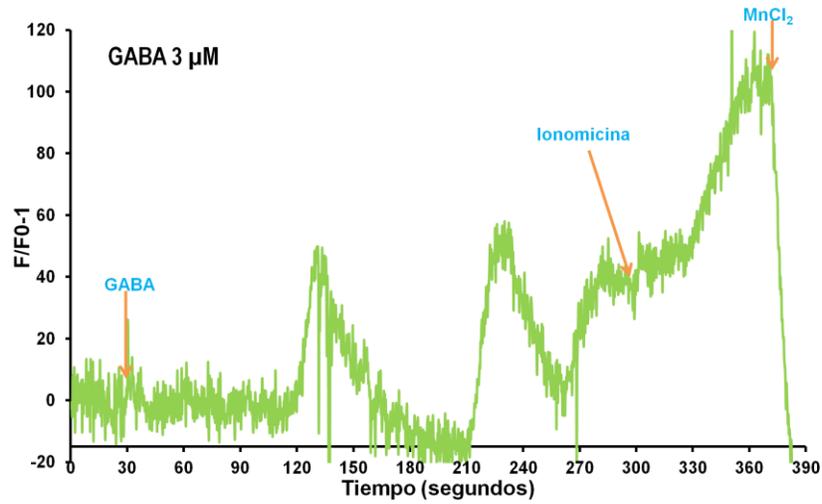
c)



d)



e)



f)

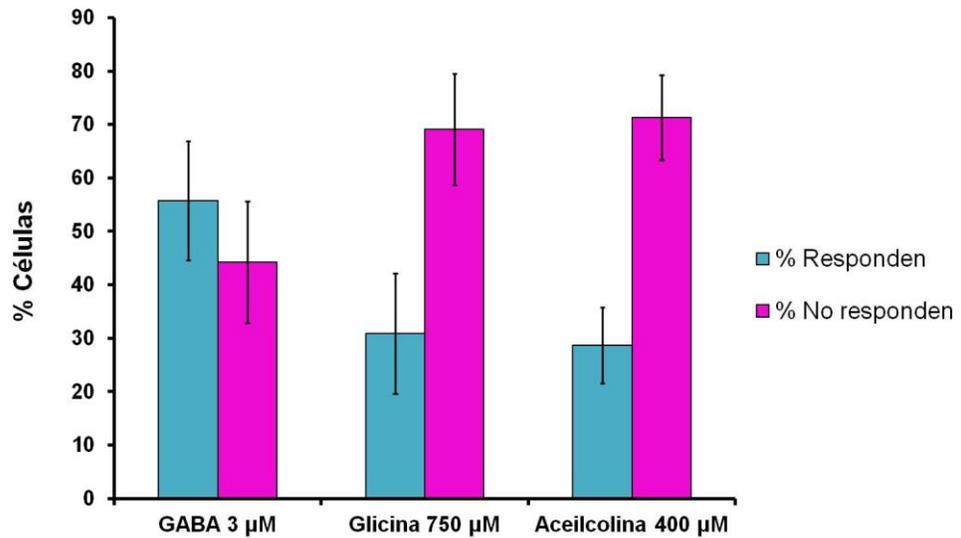


Figura 9. GABA, Glicina y Acetilcolina estimulan un aumento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en experimentos de célula única. Imágenes (arriba) de espermatozoides de humano cargados con Fluo 3 mostrando el incremento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causado por la adición de (a) Medio de registro (b) GABA 3 μM y (c) Glicina 750 μM y (d) Acetilcolina 400 μM . La ionomicina se adicionó como un control positivo y el MnCl_2 se utilizó para apagar la fluorescencia del Fluo 3. En cada imagen se indica el compuesto adicionado y el tiempo en segundos. Las graficas (abajo) muestran trazos de los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (segundos) de 8-10 células (sperm 1-10). Los cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se indican como F/F_0 , donde F es la intensidad de fluorescencia al tiempo t y F_0 es la intensidad de fluorescencia inicial antes de cualquier adición. El código de colores: negro (-) a rojo (+) indican bajo a alto $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Experimento representativo ($n \geq 5$). En (e) observamos un trazo que ejemplifica las oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} mediadas por GABA 3 μM (una sola célula). Por otra parte en (f) se muestra la cuantificación del porcentaje de células que responden a cada uno de los estímulos indicados; se analizaron ≥ 70 en cada condición. Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.) $n \geq 5$.

Se observa en las imágenes que el aumento claro en la $[Ca^{2+}]_i$ mediada por GABA y Glicina requiere de un tiempo mínimo de 270 segundos, lo cual nos sugiere que la movilización de Ca^{2+} mediada por estos compuestos pudiera ser a través de una cascada de señalización y no por activación directa de la proteína que regule el flujo de Ca^{2+} en sí misma y que actué como su receptor. Además en el caso particular de GABA observamos oscilaciones de los niveles de Ca^{2+} en un 30% de las células analizadas lo que sugiere una modulación de la señal por señalización más que una acción directa sobre algún canal (**Figura 9e**).

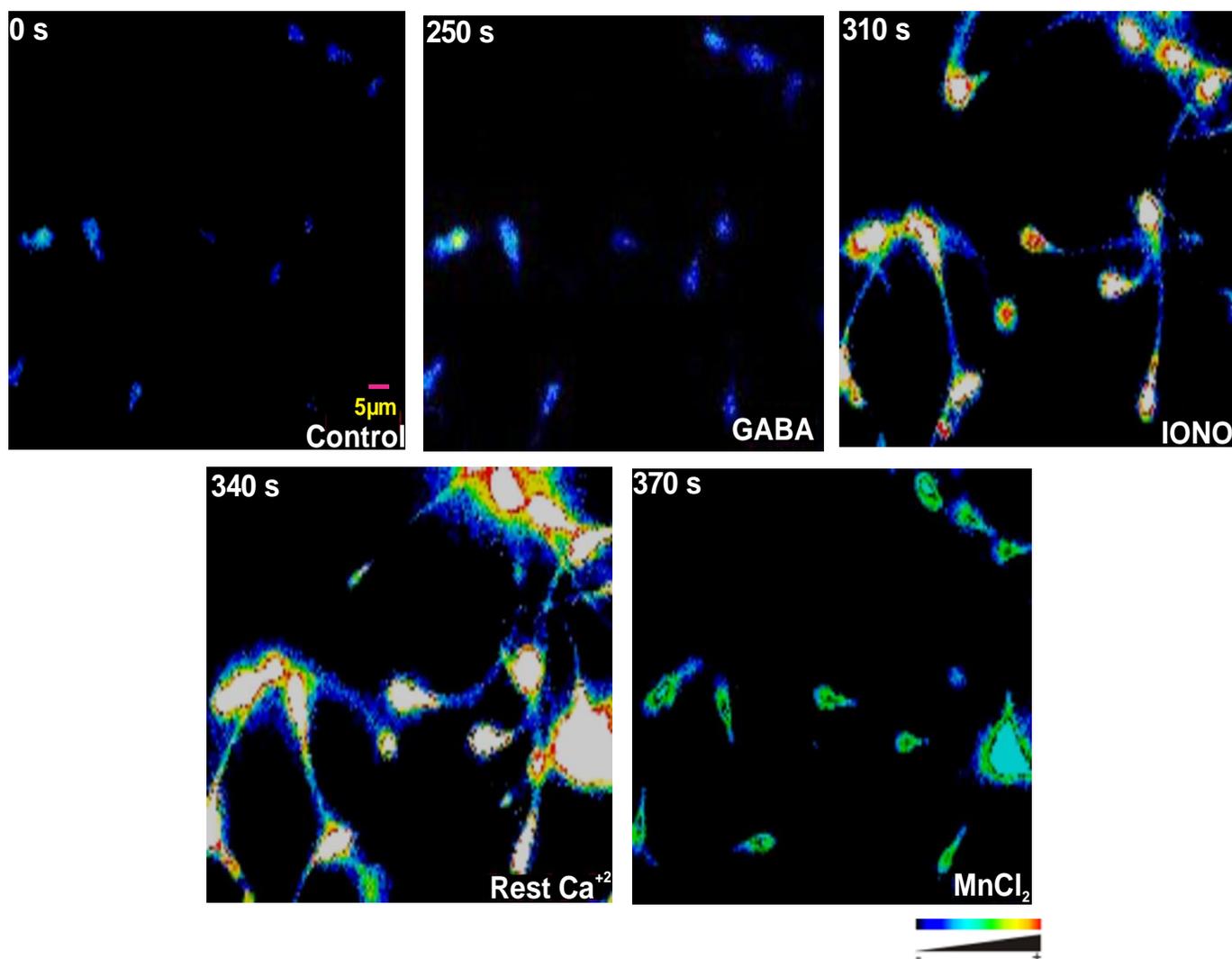
Con respecto a la respuesta mediada por Acetilcolina mostramos que el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ es inmediato a la adición del compuesto y que en un 70% de las células analizadas dicho aumento es cualitativamente más pequeño que el provocado por GABA o Glicina, además no se detectaron oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} . Es importante mencionar que el control (adición de MR) que se presenta en la **figura 9a** permite descartar que el aumento de Ca^{2+} sea un artefacto producido por la simple adición de los compuestos.

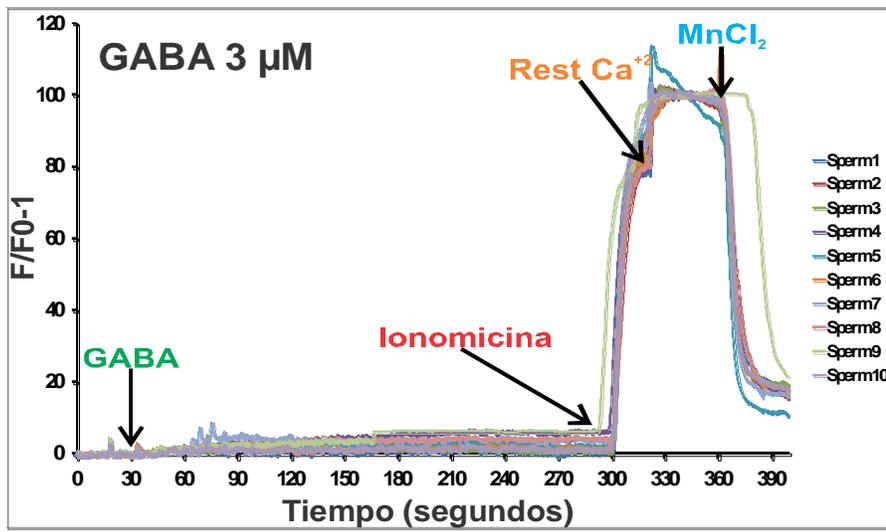
Con este conjunto de experimentos nos fue posible demostrar que estos tres neurotransmisores son capaces de de movilizar Ca^{2+} en espermatozoides de humano capacitados, proceso indispensable para que ocurra la RA, y al mismo tiempo comenzamos con la caracterización de estas respuestas. Observamos que la respuesta es poco sincronizada en la población celular y además se presentan células que no responden, lo que sugiere una heterogeneidad de la población a la respuesta y explica la dificultad que se observo en los análisis de población (**Figura 9f**). Por otra parte a pesar de no ser totalmente claro, parece que los tres inductores que probamos, provocan que el inicio del aumento de Ca^{2+} sea en la cabeza, lo que descartaría la participación de CatSper.

Otro objetivo interesante de dicha caracterización es determinar la región en la que empieza el incremento de Ca^{2+} , sin embargo, aunque se realizaron varios intentos para establecer las condiciones que nos permitieran determinarlo no tuvimos éxito. Uno de los requerimientos para poder realizar las mediciones de los cambios en la fluorescencia tanto en el flagelo como en la cabeza es mantener el flagelo en foco, realizar esto es difícil porque normalmente los flagelos están batiendo constantemente. Probamos pegar los espermatozoides tanto de la cabeza como del flagelo y lo logramos solo que la viabilidad disminuyó considerablemente, provocando que los espermatozoides murieran durante el transcurso de la grabación de la película. A pesar de esto consideramos que vale la pena seguir intentando, ya que para detectar cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en el flagelo, como se reporto recientemente (Lefièvre *et al.*, 2012), este tipo de mediciones requiere analizar un gran número de células y tomar en cuenta solo las que se pegan bien del flagelo y continúan vivas.

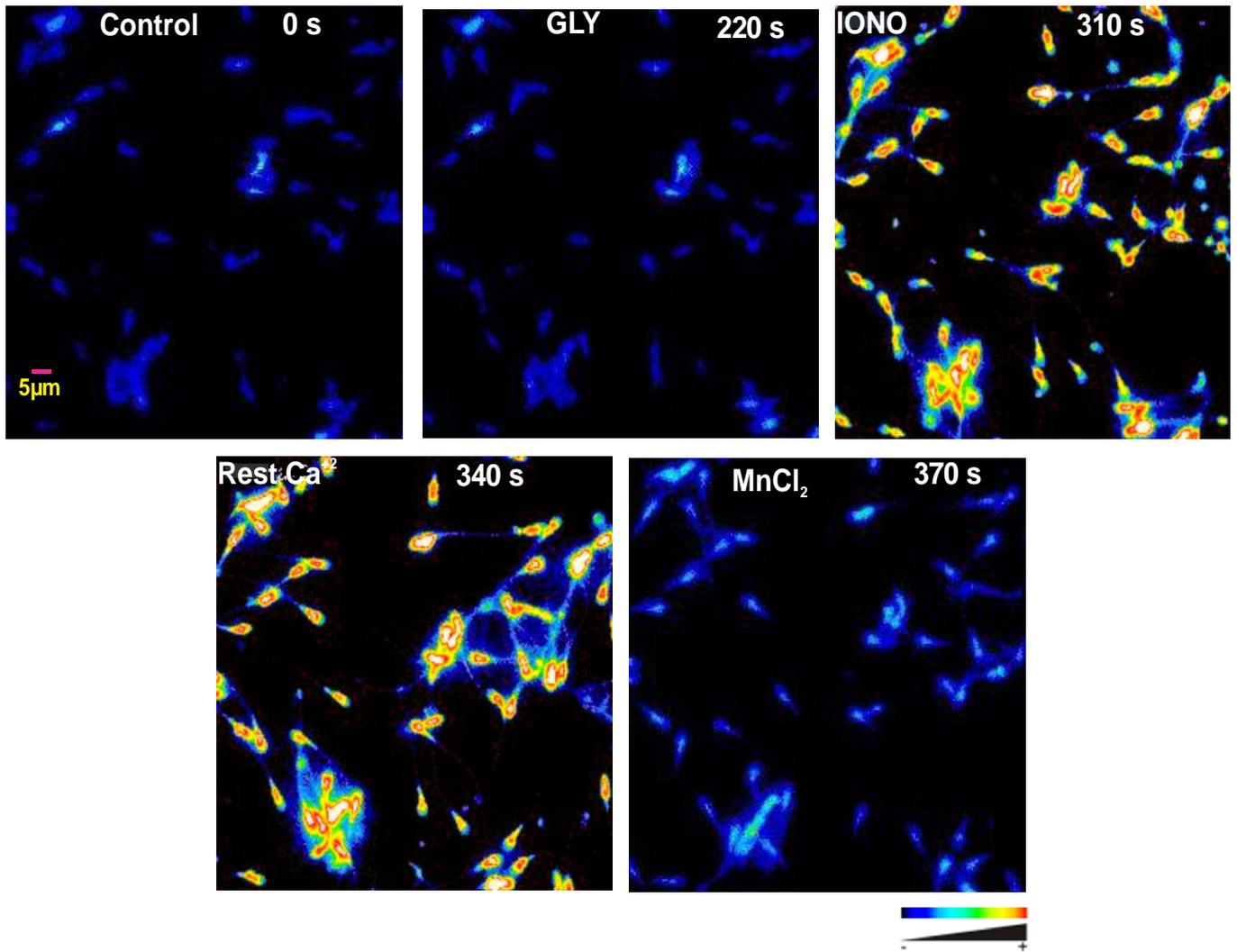
Habiendo determinado que los compuestos que estamos analizando inducían un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ ahora queríamos saber el origen de dicho aumento, es decir si era producto de una entrada o se debía a movilización del Ca^{2+} intracelular. Para este análisis utilizamos el mismo protocolo que para los experimentos anteriores solo que esta vez se elimino el Ca^{2+} extracelular (2 mM) con EGTA 150 μ M para tener una concentración final de 100 nM de Ca^{2+} extracelular. Los resultados se muestran en la **figura 10**.

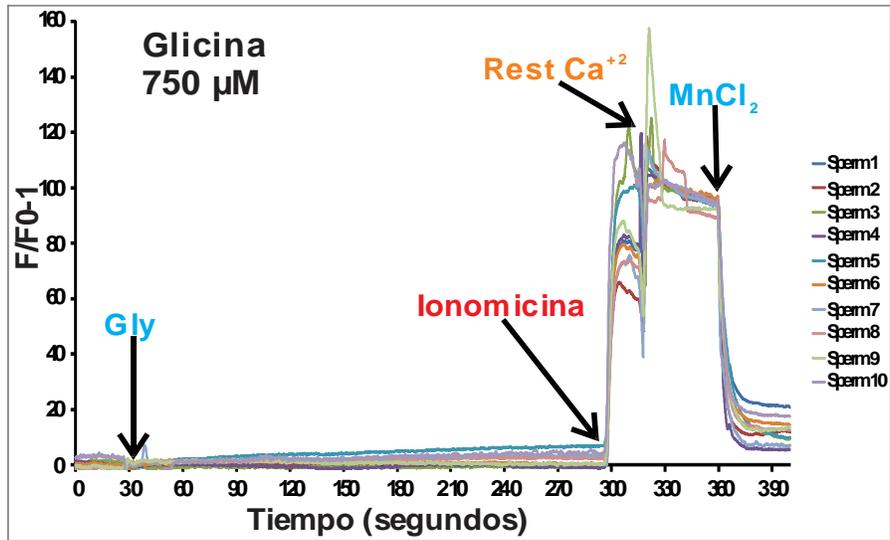
a)



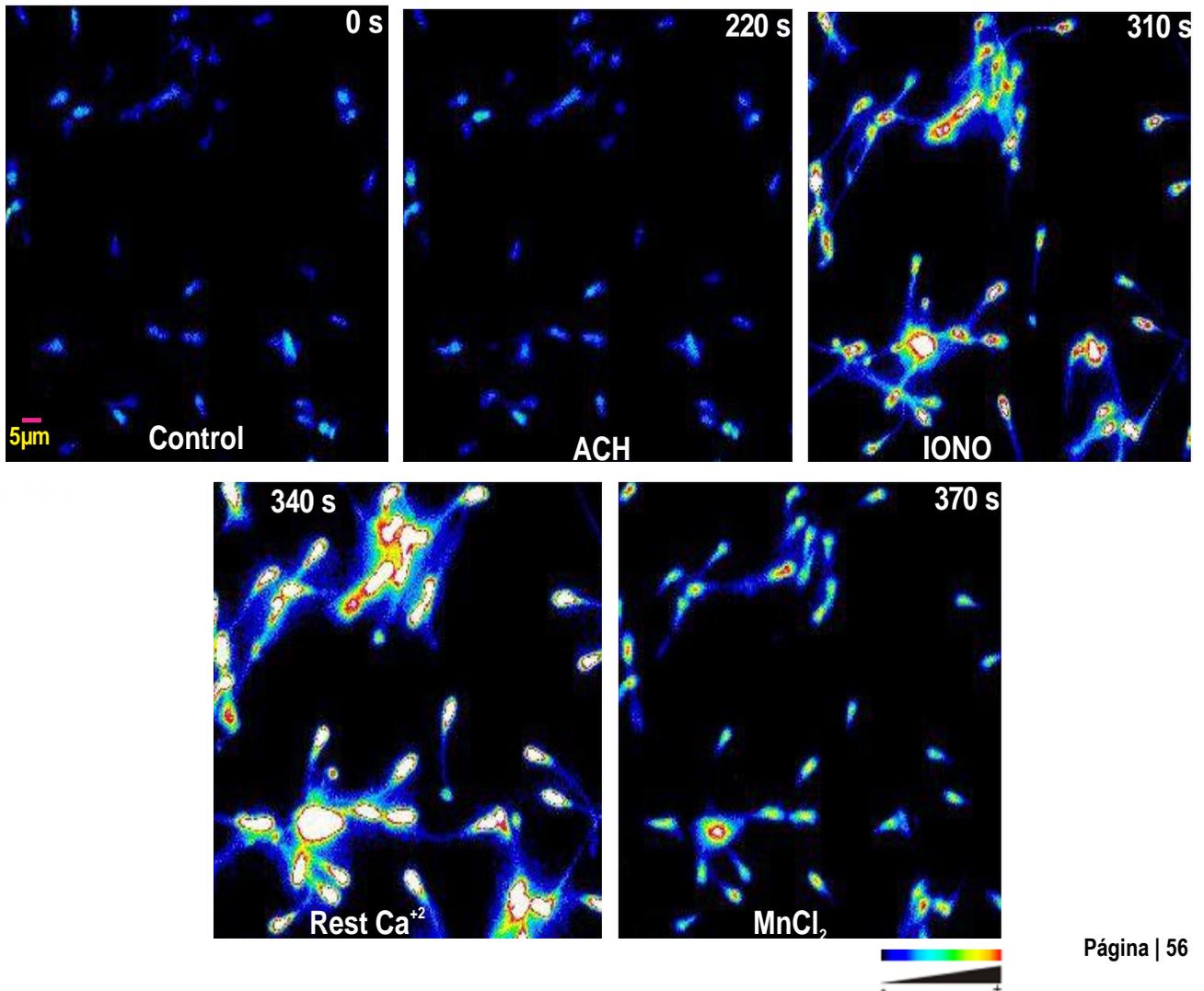


b)





c)



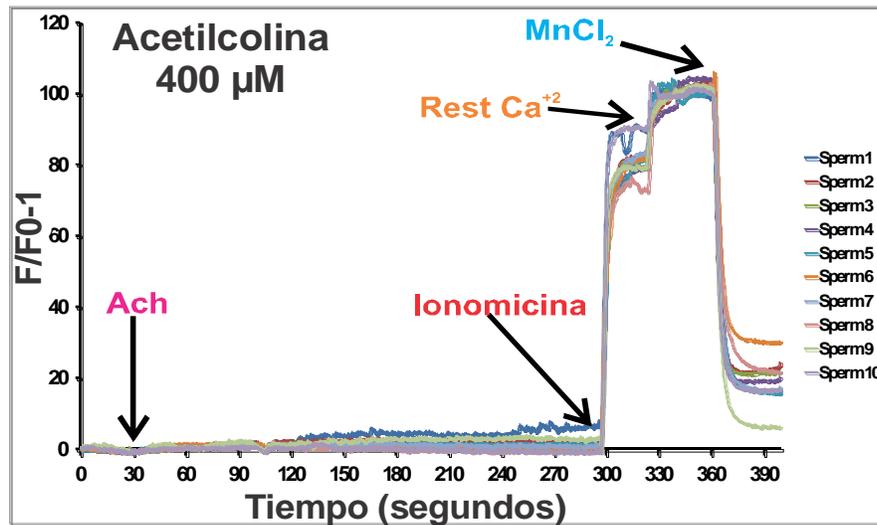
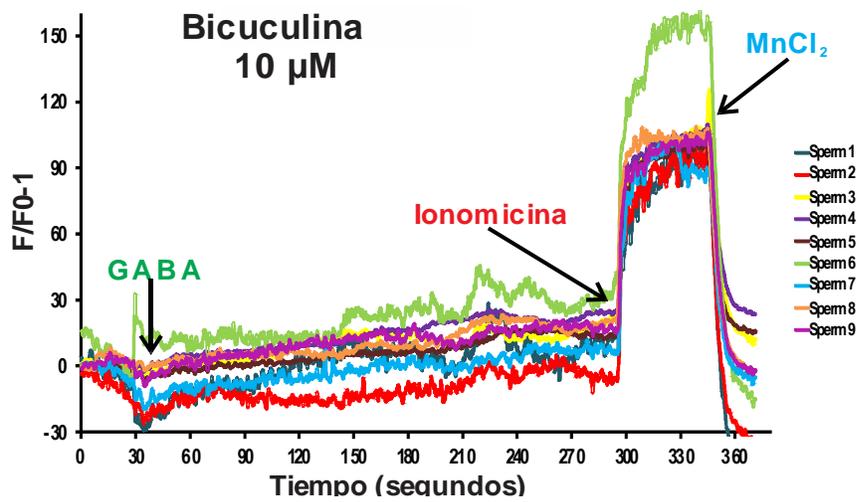
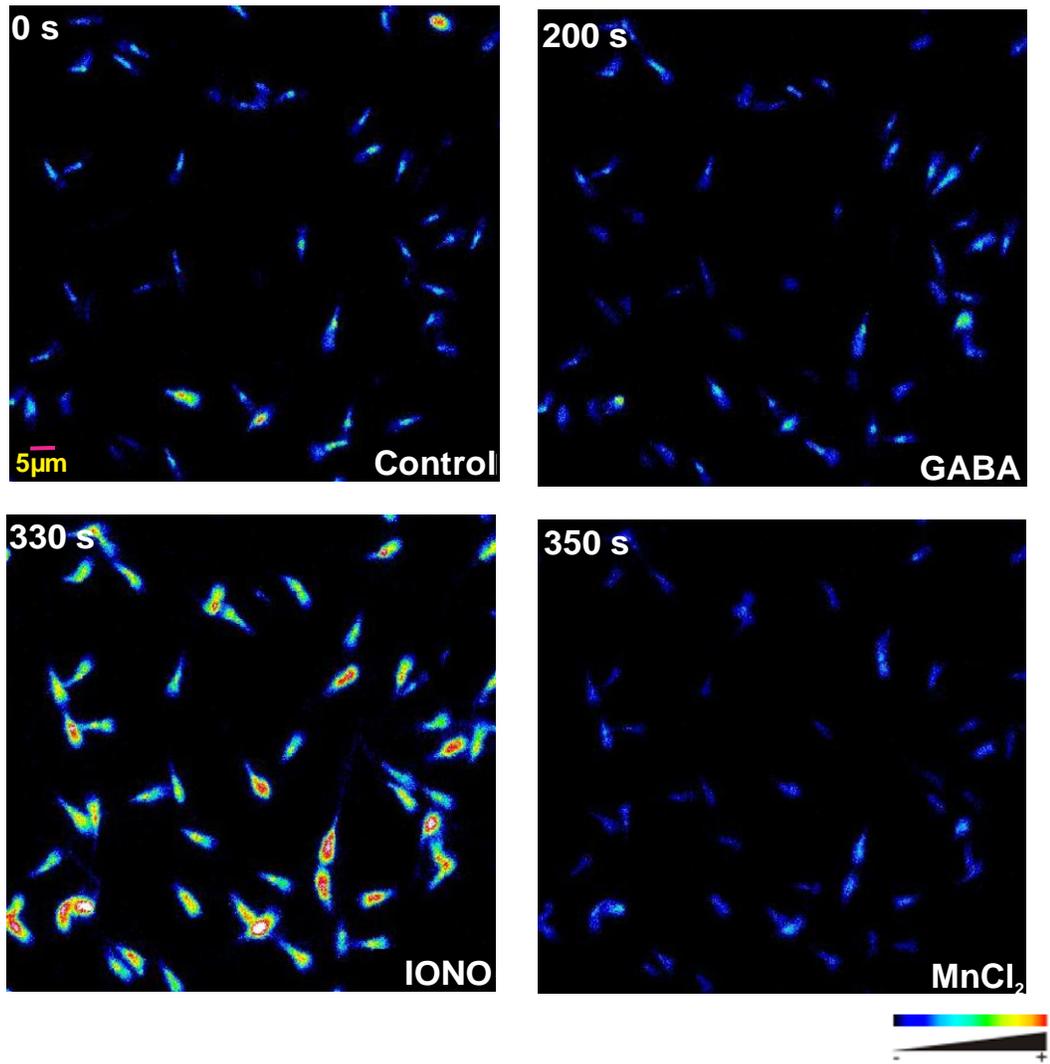


Figura 10. GABA Glicina y Acetilcolina no estimulan un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en experimentos de célula única en medio libre de Ca^{2+} . Imágenes (arriba) de espermatozoides de humano cargados con Fluo 3 sin mostrar incremento en $[Ca^{2+}]_i$ causado por la adición de (a) GABA $3 \mu M$ (b) Glicina $750 \mu M$ y (c) Acetilcolina $400 \mu M$, en un medio libre de Ca^{2+} . La ionomicina se adicionó como un control positivo, se agregó Ca^{2+} para restablecer a 2 mM el Ca^{2+} extracelular (Rest Ca^{2+}), y el $MnCl_2$ se utilizó para apagar la fluorescencia del Fluo 3. En cada imagen se indica el compuesto adicionado y el tiempo en segundos. Las gráficas (abajo) muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (segundos) de 10 células analizadas (sperm 1-10). Los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ indicados como F/F_0-1 , donde F es la intensidad de fluorescencia al tiempo t y F_0 es la intensidad de fluorescencia inicial antes de cualquier adición. El código de colores: negro (-) a rojo (+) indican bajo a alto $[Ca^{2+}]_i$. Experimento representativo ($n \geq 5$).

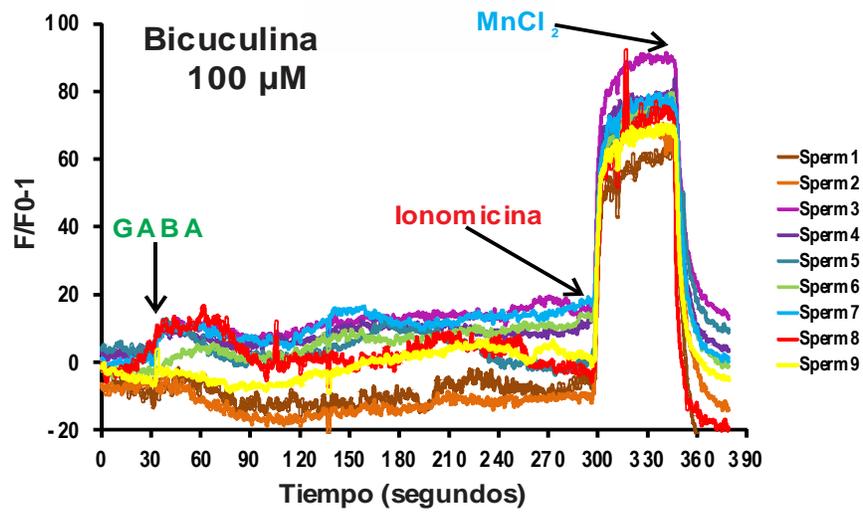
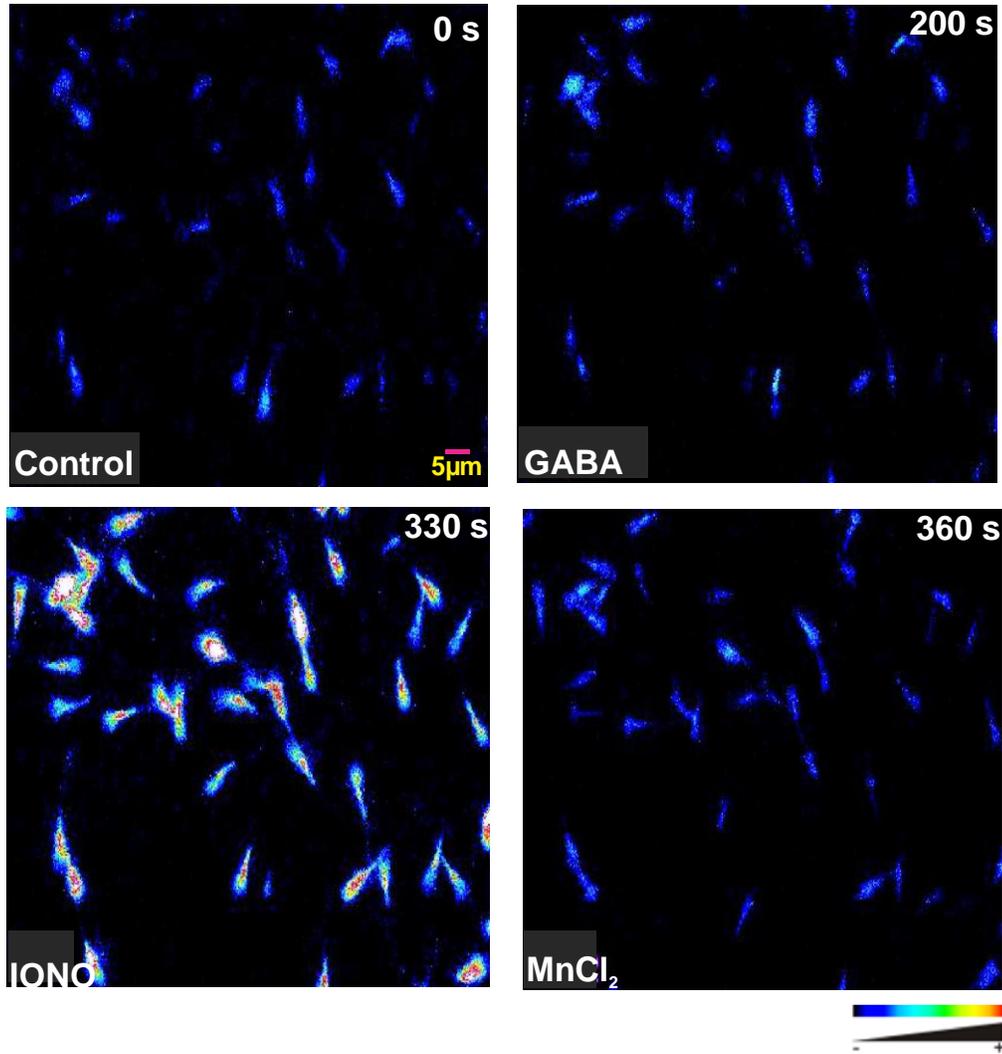
Los experimentos anteriores muestran que el aumento Ca^{2+} mediado por GABA, Glicina y Acetilcolina es dependiente de Ca^{2+} extracelular, ya que la señalización mediada por los tres inductores se eliminó casi completamente en la mayoría de los experimentos, en los cuales el Ca^{2+} extracelular era 100 nM .

Una vez obtenidos estos resultados el siguiente paso fue caracterizar farmacológicamente las respuestas producidas por estos neurotransmisores, comenzamos explorando la respuesta mediada por GABA, ya que nos pareció la más interesante por presentar oscilaciones y ser la de mayor magnitud (cualitativamente). Para este fin utilizamos al antagonista de los receptores de $GABA_A$: bicucullina, se sabe que estos receptores son los que se encuentran en la membrana de espermatozoides humanos. La bicuculina tiene una IC_{50} DE $3 \mu M$, nosotros utilizamos $10 \mu M$ y además $100 \mu M$ al ser esta última concentración probada con anterioridad en espermatozoides de humano. Tomando esto en cuenta se hicieron registros de Ca^{2+} en célula única incubando los espermatozoides de humano capacitados durante 20 minutos con estas dos concentraciones de inhibidor, los resultados se muestran en la **figura 11**.

a)



b)



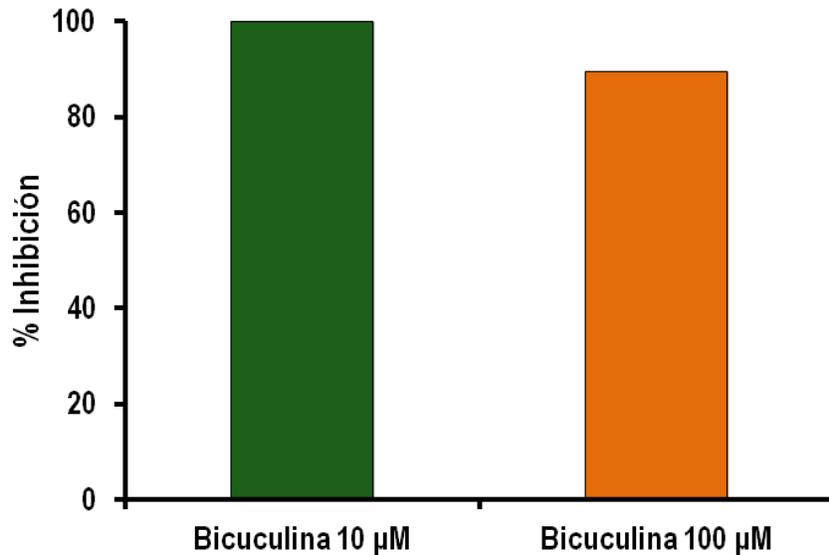


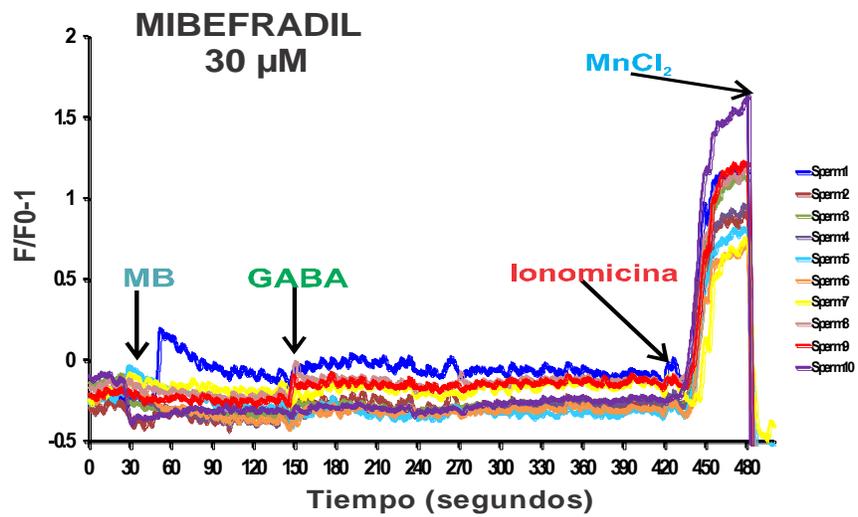
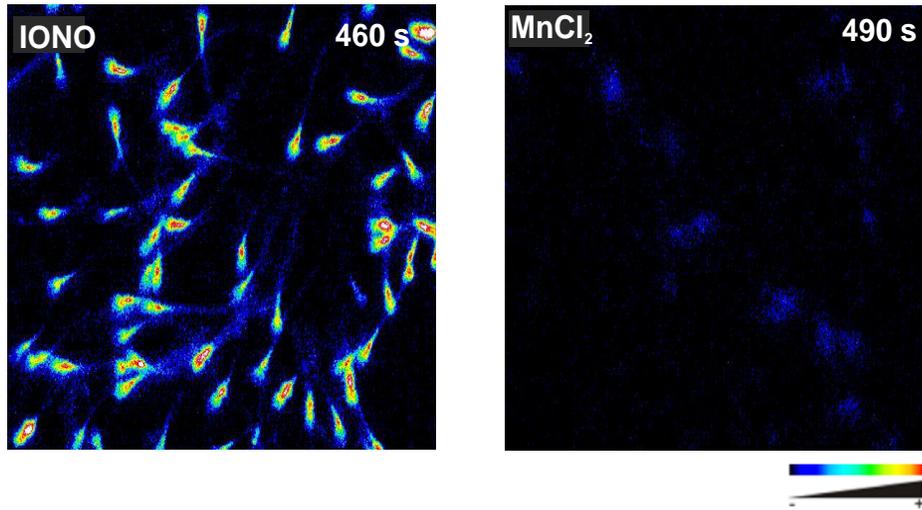
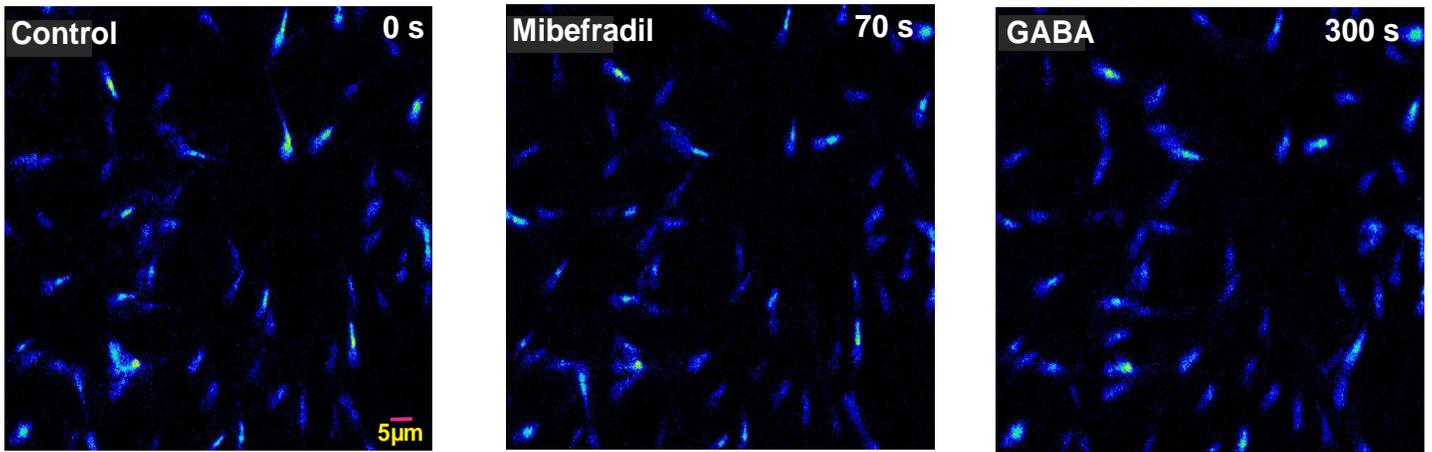
Figura 11. Bicuculina inhibe el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por GABA. Imágenes (arriba) de espermatozoides de humano cargados con Fluo 3 e incubados por 20 minutos con bicuculina 10 μ M (a) y 100 μ M (b) sin mostrar incremento en $[Ca^{2+}]_i$ causado por la adición de GABA 3 μ M. La ionomicina se adicionó como un control positivo y el $MnCl_2$ se utilizó para apagar la fluorescencia del Fluo 3. En cada imagen se indica el compuesto adicionado y el tiempo en segundos. Las gráficas (abajo) muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (segundos) de 8 células analizadas. Los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ indicados como F/F_0 , donde F es la intensidad de fluorescencia al tiempo t y F_0 es la intensidad de fluorescencia inicial antes de cualquier adición. El código de colores: negro (-) a rojo (+) indican bajo a alto $[Ca^{2+}]_i$. En c se muestran los porcentajes de inhibición del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por GABA 3 μ M producidos por bicuculina (10 μ M y 100 μ M). Experimento representativo (n=4).

Con estos resultados podemos sugerir que la movilización de Ca^{2+} inducida por GABA está mediada por el receptor $GABA_A$, ya que con las dos concentraciones de su antagonista utilizadas observamos que la respuesta se inhibe en un 90 y 100% (**figura 11c**).

Posteriormente y dado que, el canal CatSper se ha propuesto como el principal canal de Ca^{2+} en el espermatozoide y que éste por sí mismo o sus proteínas asociadas contienen sitios de unión para varios ligandos, sirviendo como un sensor polimodal para múltiples señales químicas (Brenker *et al.*, 2012), probamos los inhibidores de CatSper (mibefradil y NNC 55-0396) para descartar la participación de este canal en el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediada por GABA.

En la **figura 12** se muestran los resultados obtenidos utilizando mibefradil 30 μ M y NNC 55-0396 10 μ M, concentraciones a las cuales se bloquea al CatSper sin generar por sí mismo aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ (Strünker *et al.*, 2011).

a)



b)

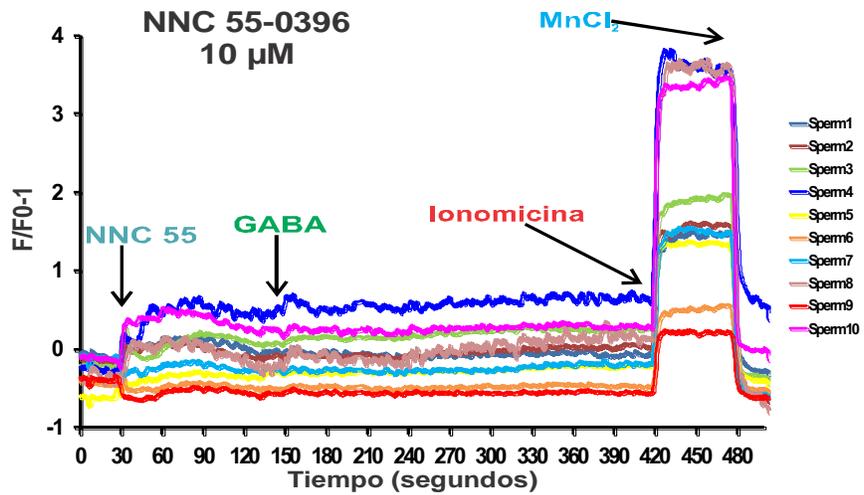
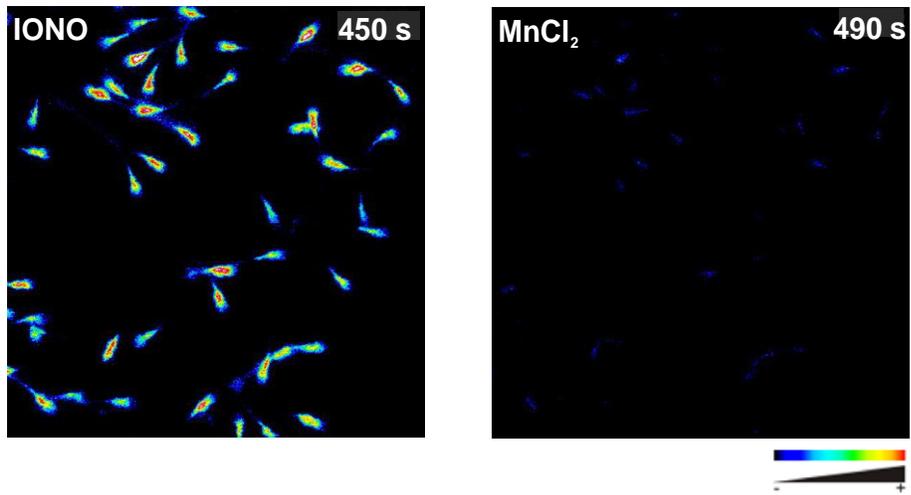
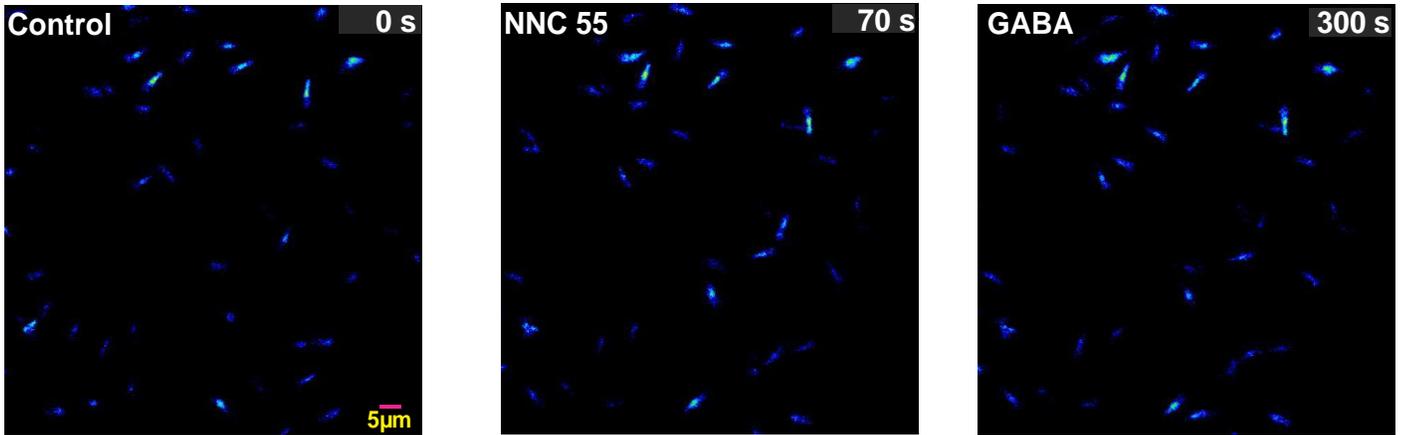


Figura 12. Mibefradil y NNC 55-0396 inhiben el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por GABA. Imágenes (arriba) de espermatozoides de humano cargados con Fluo 3 tratados con Mibefradil 30 μ M (a) y NNC 55-0398 10 μ M (b) sin mostrar incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ posterior a la adición de GABA 3 μ M. La ionomicina se adicionó como un control positivo y el $MnCl_2$ se utilizó para apagar la fluorescencia del Fluo 3. En cada imagen se indica el compuesto adicionado y el tiempo en segundos. Las gráficas (abajo) muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (segundos) de 10 células analizadas (sperm 1-10). Los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ indicados como F/F₀, donde F es la intensidad de fluorescencia al tiempo t y F₀ es la intensidad de fluorescencia inicial antes de cualquier adición. El código de colores: negro (-) a rojo (+) indican bajo a alto $[Ca^{2+}]_i$. Experimento Representativo n≥5.

Contrario a lo que esperábamos resultó que los inhibidores de CatSper bloquean el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por GABA, lo cual sugiere que posiblemente la entrada de Ca^{2+} inducida por GABA se da a través de CatSper o que este neurotransmisor participe en la señalización para activar a este canal y promover así la movilización de Ca^{2+} . Aunque la otra posibilidad es que estos compuestos a las concentraciones empleadas también interfieran en la actividad de los canales de Ca_v , que se sospecha están involucrados en la vía de señalización mediada por GABA.

8.4 Espectrofluorómetro de mezclado rápido

Con el objetivo de determinar desde los primeros milisegundos la cinética del ingreso de Ca^{2+} mediado por GABA, Glicina y Acetilcolina en espermatozoides de humano capacitados decidimos utilizar un espectrofluorómetro de mezclado rápido cuya ventaja radica en la velocidad de su sistema de mezclado, siendo ~5 veces más rápida que la de un espectrofluorómetro convencional. Las mediciones realizadas con esta metodología nos permitirían inferir acerca de la vía de señalización que median estos neurotransmisores.

Estos experimentos se realizaron en un espectrofluorómetro de mezclado rápido (SFM400, Bio-Logic) recién llegado al laboratorio por lo que primero que se hizo fue establecer las condiciones para realizar las mediciones en espermatozoides de humano como se describe a continuación.

8.4.1 Viabilidad

El primer parámetro que se evaluó fue la viabilidad de las células en respuesta a diferentes velocidades de desplazamiento de los émbolos de las jeringas de disparo. Para este propósito, las células que pasaban por el espectrofluorómetro se recuperaron y se tiñeron con eosina Y al 0.5% (colorante aniónico que no penetra en el interior celular a no ser que la membrana sea permeable, por tanto, solo las células muertas tendrían teñido el interior) para determinar la viabilidad (**figura 13**).

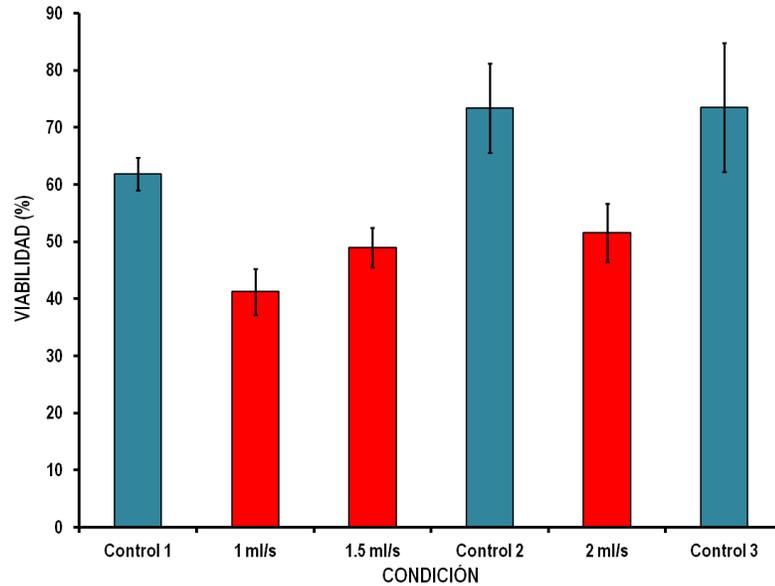


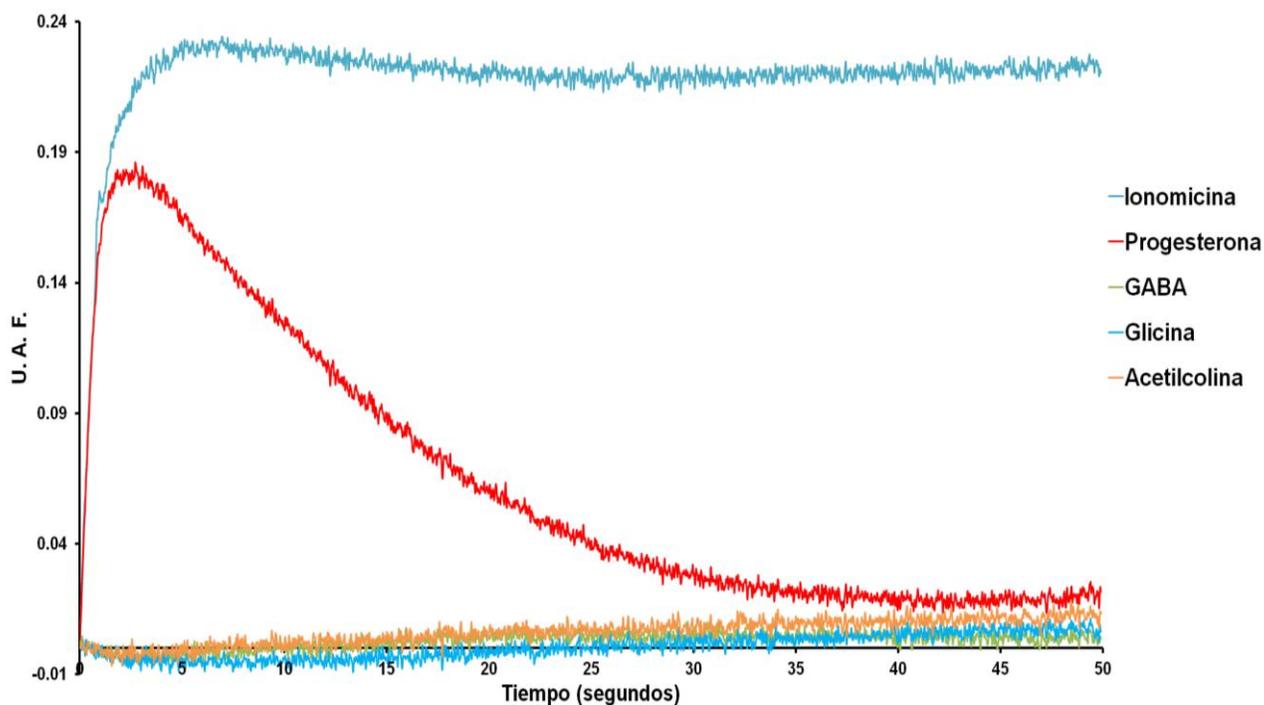
Figura 13. El uso de distintas velocidades de disparo no afecta significativamente la viabilidad de las células. Se muestra el porcentaje de células vivas a diferentes velocidades de desplazamiento de los émbolos de las jeringas de disparo y también la viabilidad de las células mantenidas en la incubadora; Control 1 al inicio, Control 2 a la mitad y Control 3 al final del experimento. No se observan diferencias en los porcentajes de viabilidad con respecto a las diferentes velocidades utilizadas. Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n=4.

Como se puede observar en la gráfica no hay diferencias significativas en los porcentajes de viabilidad obtenidos al comparar las tres velocidades de desplazamiento de los émbolos de las jeringas (donde están contenidos los espermatozoides), incluso se observa que aumenta el porcentaje de sobrevivencia conforme aumenta dicha velocidad. Por lo cual para los experimentos posteriores decidimos utilizar 1.5 ml/segundo.

8.4.2 Medidas de Ca²⁺ en población con alta resolución temporal

Se realizaron experimentos para analizar la temporalidad de la respuesta de Ca²⁺ producida por los compuestos de interés (GABA (3 μM), Glicina (750 μM), Acetilcolina (400 μM)), como control positivo se uso Ionomicina (10 μM) y progesterona (10 μM) cuya respuesta está caracterizada. Como control negativo se utilizo MR, los valores de fluorescencia a lo largo del tiempo producido con este último se le restaron a cada uno de los valores de fluorescencia producidos por los inductores previamente mencionados. Los trazos correspondientes se muestran en la **figura 14**.

a)



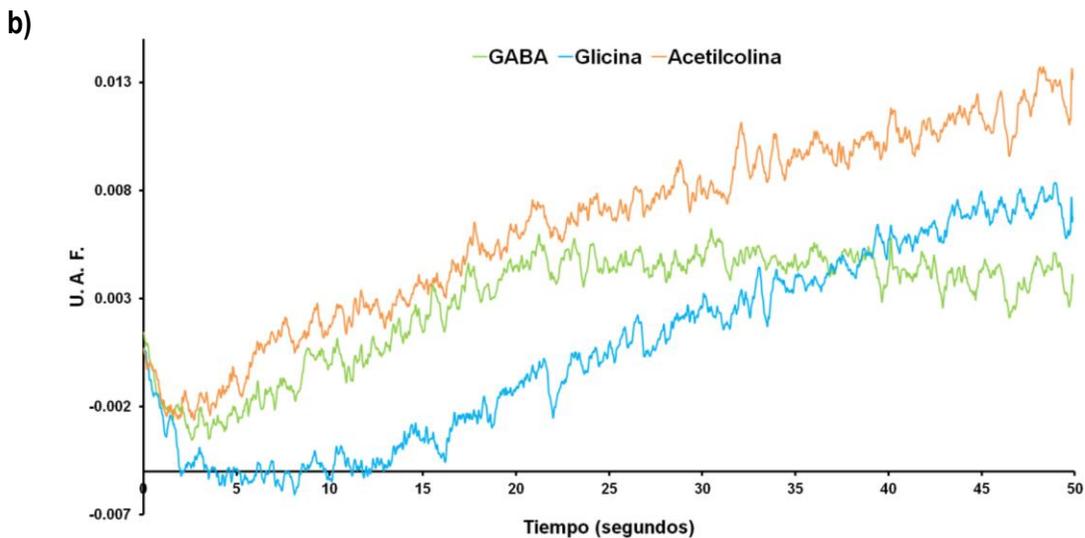
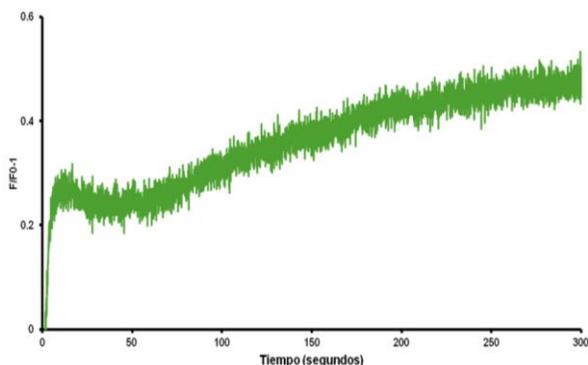


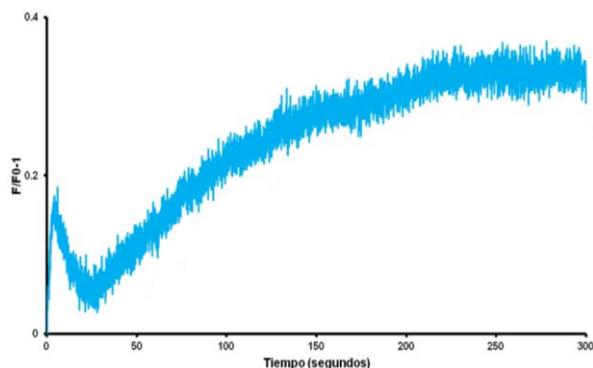
Figura 14. Ionomicina, Progesterona GABA, Glicina y Acetilcolina estimulan un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides. (a) Trazo representativo de espermatozoides de humano capacitados cargados con Fluo 3 mostrando el incremento en el $[Ca^{2+}]_i$ causado por la adición de Ionomicina ($10 \mu M$), Progesterona ($10 \mu M$), GABA ($3 \mu M$), Glicina ($750 \mu M$), y Acetilcolina ($400 \mu M$). Las escalas indican unidades arbitrarias de fluorescencia contra tiempo (U.A.F.) (segundos). (b) Amplificación de los trazos producidos por la adición de GABA, Glicina y Acetilcolina. Experimento representativo de 3.

Como se observa en las gráficas los compuestos que analizamos por primera vez en este equipo, provocan, en espermatozoides de humano capacitados, un aumento muy pequeño de Ca^{2+} con una cinética distinta comparado con los controles positivos, ionomicina y progesterona. La cinética del ingreso de Ca^{2+} mediado por los controles positivos presentó el comportamiento esperado (respuesta inmediata) dado que la ionomicina es un ionóforo de Ca^{2+} y la progesterona activa directamente al canal de Ca^{2+} CatSper, lo cual nos habla de que el equipo está funcionando adecuadamente. Con respecto a GABA, Glicina y Acetilcolina es evidente que el rango en el cual aumenta el $[Ca^{2+}]_i$ es similar entre ellos. Sin embargo es claro que con este tiempo de registro únicamente estamos viendo los primeros segundos de la respuesta de GABA, Glicina y Acetilcolina, además como vimos en los experimentos de célula única, la movilización de Ca^{2+} mediada por estos neurotransmisores no es inmediata, por lo cual consideramos importante registrar durante un mayor tiempo los cambios en la fluorescencia (indicativo de cambios en la $[Ca^{2+}]_i$). Tomando esto en cuenta decidimos registrar durante 5 minutos (**figura 15**).

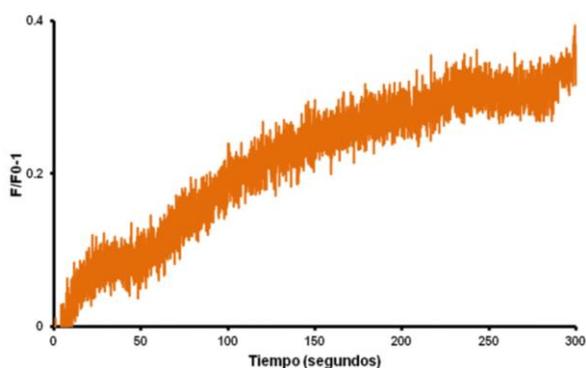
a) GABA 3 μM



b) Glicina 750 μM



c) Acetilcolina 400 μM



d) GABA, Glicina y Acetilcolina

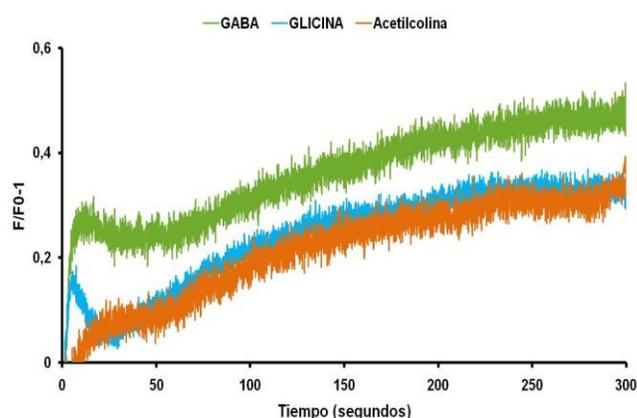


Figura 15. GABA, Glicina y Acetilcolina estimulan un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bifásico. Trazo promedio de espermatozoides de humano capacitados cargados con Fluo 3 mostrando el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causado por la adición de GABA 3 μM (a), Glicina 750 μM (b), Acetilcolina 400 μM (c) y los trazos de los tres neurotransmisores: GABA, Glicina y Acetilcolina (d). Se grafica el promedio de los cambios de fluorescencia contra tiempo (segundos) de 5 experimentos independientes. Los cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indicados como F/F_0 , donde F es la intensidad de fluorescencia al tiempo t y F_0 es la intensidad de fluorescencia inicial $n \geq 5$.

Estos experimentos nos permitieron observar la cinética de los aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producidos por GABA, Glicina y Acetilcolina, los cuales presentan un primer pico que es rápido (~30 segundos) seguido de uno lento (minutos), los cuales son más evidentes para GABA y Glicina. Al cuantificar: a) la pendiente de los dos aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediada por los tres neurotransmisores (Tabla 2), b) los tiempos al pico máximo y c) los tiempos al

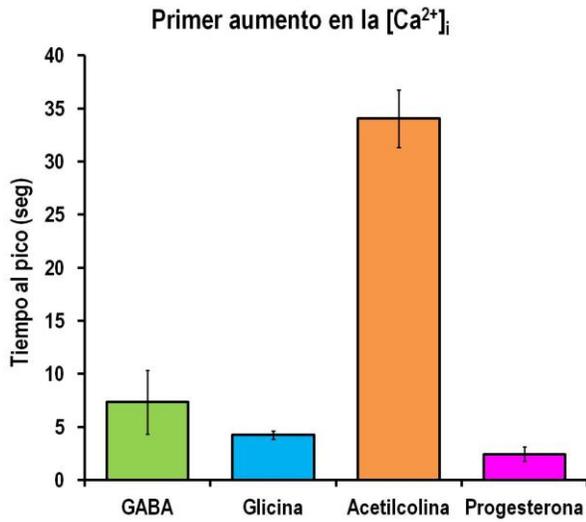
50% del pico, observamos que la velocidad del primer aumento es, en orden descendente: Glicina, GABA y Acetilcolina; mientras que para el segundo aumento es: GABA , Glicina y Acetilcolina, también en orden descendente (**Figura 16**). Con estos datos constatamos que la cinética del aumento en el Ca^{2+} es diferente entre los neurotransmisores; además, al comparar las velocidades de estos con respecto a progesterona podríamos sugerir que las vías de señalización que median son diferentes y que por tanto CatSper no estaría participando, aunque aún tenemos que analizar esta respuesta en presencia de los inhibidores de CatSper.

Además con estos resultados confirmamos que la movilización de Ca^{2+} que median los neurotransmisores realmente presenta un retraso y descartamos que el retraso que vemos en célula única se deba a la difusión del compuesto. Por otra parte es importante mencionar que las magnitudes de las respuestas en el aumento de Ca^{2+} provocadas por los tres neurotransmisores se relacionan muy bien con las mediciones hechas en el espectrofluorómetro convencional y de manera interesante también son proporcionales con los porcentajes de RA.

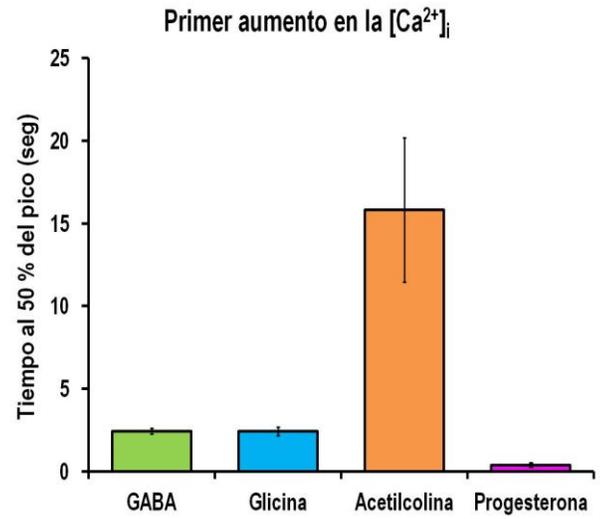
Primer aumento		Segundo aumento	
Compuesto	Pendiente	Compuesto	Pendiente
GABA	0.0319±0.0094	GABA	0.0018±0.0003
Glicina	0.0278±0.0145	Glicina	0.0020±0.0003
Acetilcolina	0.0114±0.0044	Acetilcolina	0.0021±0.0001
Progesterona	0.8125±0.2364		

Tabla 2. Pendientes de los aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediados por GABA, Glicina y Acetilcolina. Los valores se muestran como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.) $n \geq 5$.

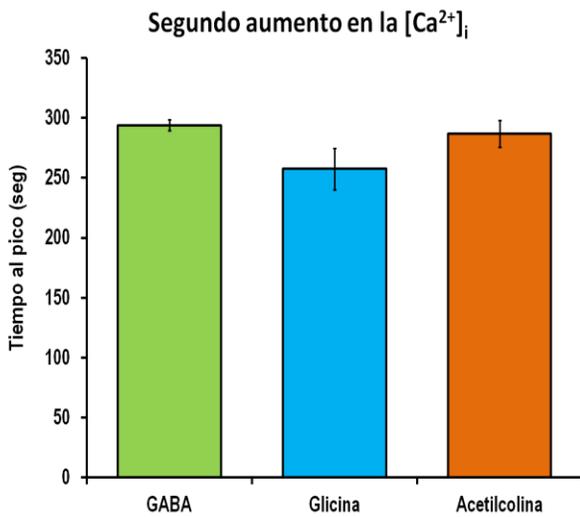
a)



b)



c)



d)

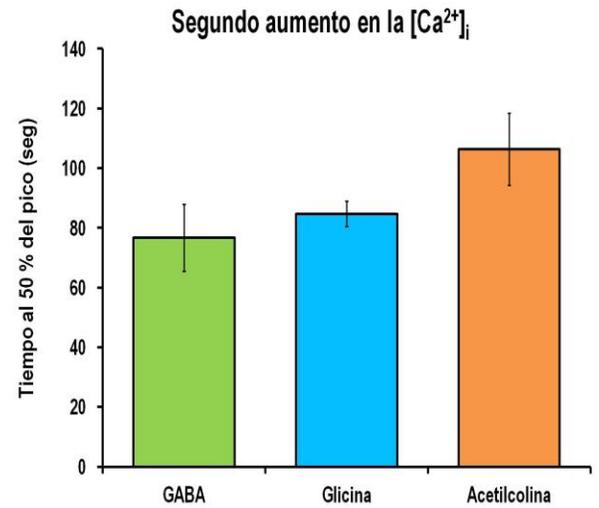


Figura 16. La cinética del ingreso de Ca^{2+} mediado por GABA, Glicina y Acetilcolina es diferente. Los tiempos al pico máximo y los tiempos al 50% del pico de los aumentos en el Ca^{2+} indican la velocidad a la cual se llevan a cabo estos eventos en espermatozoides capacitados. En las gráficas se muestran los tiempos del primer aumento (a y b) y los del segundo aumento (c y d). Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). $n \geq 5$.

9. DISCUSIÓN

La fecundación es un evento fundamental para los organismos que dependen de la reproducción sexual, para dar origen a un nuevo individuo. Este proceso está altamente sincronizado e involucra una serie compleja de interacciones entre el espermatozoide y el óvulo, culminando con la fusión de éstos. Existen distintos eventos moleculares, como la RA, cuya acción organizada es indispensable y permite que la fecundación se lleve a cabo exitosamente.

Aunque una de las glicoproteínas de la matriz externa del óvulo (ZP3) se ha considerado como el inductor natural de la RA, otros estudios han demostrado que diversos compuestos son capaces de inducir esta reacción con la previa movilización de Ca^{2+} en el espermatozoide.

Los objetivos principales de este trabajo fueron explorar la capacidad de GABA, Glicina y Acetilcolina para inducir RA, aumentar el Ca^{2+} intracelular y analizar la cinética del aumento como un intento de entender las implicaciones fisiológicas de estos ligandos en el proceso de fecundación.

El primer paso fue constatar que GABA, Glicina y Acetilcolina realmente eran capaces de inducir la RA, por lo cual realizamos los ensayos para evaluar este proceso empleando la metodología utilizada de manera tradicional, que consiste en un proceso de tinción utilizando lectinas (que reconocen componentes del acrosoma) acopladas a fluoróforos y el conteo es manual (Cross *et al.*, 1989). Sin embargo, en nuestros experimentos observamos una variabilidad muy grande en los porcentajes de RA (**Figura 4**), esto lo atribuimos a la subjetividad de la técnica *per se*, ya que sólo se cuentan como máximo 200 células por condición; además, hay cierta incertidumbre en el ensayo ya que cuando se presentan tinciones intermedias, quien realiza el conteo decide bajo su propio criterio si el espermatozoide reaccionó o no, lo cual influye de manera considerable en los resultados obtenidos. Por otra parte, esta técnica no permite diferenciar células vivas de muertas, esto resulta de gran utilidad para evitar que durante la contabilización de los porcentajes de RA se incluyan falsos positivos, es decir, diferenciar entre los inductores de RA que realmente promueven este proceso en células vivas de aquellos que por sí mismos provocan que los espermatozoides mueran y en consecuencia reaccionen.

Al enfrentarnos a las dificultades mencionadas decidimos establecer las condiciones para evaluar la RA mediante Citometría de flujo. Una de las ventajas principales de esta metodología con respecto al método clásico de evaluar la RA es que podemos estudiar este proceso en células vivas, lo cual representa de manera más fidedigna las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso biológico fisiológicamente. Basándonos en algunos reportes previos (Nagy *et al.* 2003), diseñamos el protocolo, determinamos la concentración de fluoróforos adecuada para la medición de nuestro fenómeno de interés, tiempos de incubación con la lectina marcada fluorescentemente, etc.

Una vez establecidas las condiciones demostramos que GABA, Glicina y Acetilcolina inducen RA en espermatozoides capacitados (**Figura 5**). Los porcentajes de RA que obtuvimos son menores a los reportados (Jin *et al.*, 2009; Melendrez, y Meizel, 1995; Bray *et al.*, 2002a; Son y Meizel, 2003), esto se lo adjudicamos a que en dichos reportes se empleo la metodología tradicional para evaluar el proceso y podría ser que, dada la subjetividad del método, se incluyan falsos positivos.

Por otra parte, es importante mencionar que observamos gran variabilidad en nuestros resultados, la cual atribuimos a que los experimentos se tuvieron que realizar en un laboratorio fuera del IBT donde no se contaba con las condiciones ideales para el manejo de los espermatozoides de humano y a que las muestras de semen no fueron de calidad probada, creemos que es indispensable repetir estos ensayos en nuestras instalaciones, donde es posible mantener controladas las variables que pudieran afectar la viabilidad de los espermatozoides.

Así mismo valdría la pena realizar los siguientes experimentos basándonos en un trabajo reportado recientemente, donde evalúan la RA en espermatozoides de humano mediante Citometría de flujo (Zoppino *et al.*, 2012). La metodología que emplean es muy similar a la que empleamos nosotros, la única diferencia consiste en agregar el inductor y la lectina (marcador de RA) al mismo tiempo, esto reduce la manipulación de las células, con lo cual se aumentaría la viabilidad de los espermatozoides.

Es importante mencionar que esta es la primera vez que se ha explorado la RA mediante Citometría de flujo en nuestro laboratorio, aunque tuvimos algunos inconvenientes que afectaron nuestros resultados, consideramos que la técnica está establecida.

Consideramos que la Citometría de flujo no descarta por completo a la metodología tradicional en la evaluación de la reacción acrosomal, ya que los porcentajes de RA que detectamos para los ionóforos, es similar entre las dos técnicas. Sin embargo la Citometría de flujo constituirá una herramienta excelente para estudiar este evento tan importante en la fecundación, al ser una técnica sumamente sensible, que nos proporciona resultados confiables

en unos pocos minutos y que además de permitirnos evaluar individualmente hasta 50 veces más el número de células que la técnica tradicional, podemos también estudiar la RA en células vivas e identificar que espermatozoides reaccionaron sin morir y cuales murieron en el proceso o previo a este. Además los resultados son completamente cuantitativos y no existe sesgo de objetividad, por lo que consideramos la implementación de este método como una gran herramienta para el estudio de la RA y otros eventos fisiológicos del espermatozoide.

Posteriormente investigamos si diferentes concentraciones de GABA, Glicina y Acetilcolina eran capaces de aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ en poblaciones de espermatozoides de humano capacitados, sabiendo que este aumento es indispensable para que se lleve a cabo la RA.

Realizamos dichas mediciones en un espectrofluorómetro convencional y observamos que los tres neurotransmisores movilizaban Ca^{2+} de forma transitoria en el espermatozoide, siendo la mediada por GABA cualitativamente la más grande en magnitud (**Figura 7**). Además, de forma interesante, al graficar el aumento de Ca^{2+} al pico provocado por las cinco concentraciones de cada compuesto probado observamos un comportamiento de campana (**Figura 8**). Estos datos son valiosos debido a que hasta la fecha no existen trabajos donde se mida de manera directa el efecto de estos neurotransmisores en la $[Ca^{2+}]_i$ de espermatozoides de humano capacitados. Con base en la curva dosis-respuesta elegimos la concentración de cada neurotransmisor que usaríamos en los experimentos posteriores.

El siguiente paso fue estudiar los aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ en célula única, ya que a diferencia de los registros anteriores que solo nos muestran un promedio de las células en suspensión estos experimentos nos brindan información espacial de células individuales, lo cual es de gran utilidad para inferir el sitio de inicio y la propagación de la señalización de Ca^{2+} mediada por los neurotransmisores que estamos estudiando, así como determinar el porcentaje de la población que responde al estímulo.

Los resultados obtenidos de los experimentos muestran que los tres inductores provocan un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y que este aumento con la resolución que tenemos parece empezar en la cabeza del espermatozoide (**Figura 9**), sin embargo no estamos completamente seguros de esto puesto que no logramos establecer las condiciones adecuadas que nos permitieran determinar, de manera específica, el cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza y en el flagelo por separado. Lo que si observamos fue que la movilización de Ca^{2+} mediada por GABA y Glicina presentaba un retraso, esto tiene sentido con la siguiente idea: al unirse estos ligandos a sus receptores, que se ha descrito en otras células, están acoplados a un canal de Cl^- se genera una hiperpolarización del potencial de membrana, al abrirse la permeabilidad a este ión, la cual (entre otros efectos) puede liberar de su estado de inactivación a canales Ca_v , posteriormente estos canales se activarían, a través de una depolarización, permitiendo

el ingreso de Ca^{2+} al espermatozoide y este aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ serviría para desencadenar la vía de señalización que condujera a la RA.

A diferencia de los dos neurotransmisores mencionados previamente, los aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediados por Acetilcolina fueron inmediatos a su adición, lo cual sugiere que en este caso los cambios observados fueron por activación directa del receptor, como se ha observado sucede en otros tipos celulares (Dajas-Bailador *et al.*, 2004; Rathouz *et al.*, 1994). Adicionalmente observamos que este compuesto provoca que los espermatozoides batan su flagelo vigorosamente, lo cual indica que el receptor a Acetilcolina tiene una función en la regulación del movimiento flagelar y sería interesante investigar a detalle esta respuesta observada.

Una vez determinado que GABA, Glicina y Acetilcolina provocaban aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ investigamos si este aumento dependía de Ca^{2+} externo, para lo cual realizamos experimentos en los que quelamos el $[\text{Ca}^{2+}]_e$ a 100 nM con EGTA, con estos experimentos mostramos que, en estas condiciones, no se genera ingreso de Ca^{2+} al agregar cualquiera de los tres neurotransmisores, lo cual nos indica que la movilización de Ca^{2+} mediada por estos compuestos es dependiente de Ca^{2+} extracelular (**Figura 10**).

Otra característica muy interesante de la movilización de Ca^{2+} mediada por GABA fue la presencia de oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular (**Figura 9e**). En otros tipos celulares, las oscilaciones de Ca^{2+} codifican información importante para la célula (Bonfont *et al.*, 2005 y Sato *et al.*, 2005) y en el caso específico del espermatozoide este comportamiento se ha relacionado con el hecho de influir en que un espermatozoide lleve a cabo la reacción acrosomal o no. Un estudio realizado en nuestro laboratorio (no publicado) mostró que los espermatozoides expuestos a progesterona que presentaban oscilaciones en sus niveles de Ca^{2+} no reaccionaban, mientras que aquellos en los que no se observaba este fenómeno reaccionaban.

Tomando en cuenta esta información, y dado que, durante el tránsito de los espermatozoides por el tracto reproductor femenino estarían en contacto con GABA mucho antes de hacer contacto con la ZP, podemos especular que la movilización de Ca^{2+} y los porcentajes de RA tan bajos (comparados con progesterona) inducidos por este neurotransmisor podrían servir para abrirle camino a otros espermatozoides a lo largo de su trayecto hacia el óvulo y sobre todo a través de la enorme capa de células del *cumulus oophorus* que lo recubren, con esto podríamos pensar que para que se lleve a cabo la fecundación deben existir eventos de cooperatividad, en los cuales algunos espermatozoides contribuyen para favorecer que solo uno, el más apto, fecunde al óvulo.

Tomando en cuenta que en la respuesta mediada por GABA se observan oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} y que cualitativamente es la de mayor magnitud, comparada con los otros dos neurotransmisores, decidimos iniciar con su caracterización farmacológica. Probamos bicuculina, el antagonista del receptor de GABA (GABA_A), cuya presencia se ha reportado en espermatozoides de humano (Wistrom y Meizel, 1993).

En experimentos de célula única observamos que los espermatozoides incubados con este compuesto no respondían de la forma ya caracterizada al agregar GABA (**Figura 11**). Con lo cual sugerimos que la señalización de Ca^{2+} mediada por este neurotransmisor es específica, aunque para concluir esto contundentemente sería necesario utilizar un control negativo, por ejemplo un inhibidor de los receptores GABA_B o de los receptores de Glicina, los cuales, suponemos no afectaría la movilización de Ca^{2+} mediada por GABA. Asimismo, aun existen muchas incógnitas que sería muy importante investigar, como dilucidar la identidad molecular de los participantes de esta vía de señalización posteriores a la unión de GABA con su receptor y entender por qué los inhibidores para CatSper son capaces de suprimir la respuesta a GABA.

Posteriormente, con la finalidad de determinar de manera más exacta la temporalidad de las respuestas mediadas por los neurotransmisores en estudio (GABA, Glicina y Acetilcolina) y para descartar que el retraso en las respuestas mostradas en experimentos de célula única se debiera a problemas de difusión de estos compuestos, decidimos explorar con alta resolución temporal en un espectrofluorómetro de mezclado rápido los aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Estos experimento mostraron que los tres neurotransmisores provocan un aumento bifásico en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La primera fase de dicho aumento dura unos segundos (~30 segundos) y su cinética es diferente entre los tres neurotransmisores (**Figura 15 y 16**). En términos de velocidad, es más rápido el aumento mediado por Glicina, le sigue el de GABA y finalmente se encuentra el inducido con Acetilcolina. La segunda fase del aumento efectivamente tiene un retraso (minutos) y es muy similar entre los tres neurotransmisores, solo que ahora observamos que la respuesta mediada por GABA es la más rápida, seguida de la de Glicina y por último la de Acetilcolina. En estos experimentos observamos que nuevamente GABA provoca un mayor aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, no obstante este aumento sigue siendo muy pequeño en comparación al estimulado por progesterona. Esto último nos ayudaría a descartar indirectamente, que GABA este activando al canal CatSper, el cual recientemente se ha propuesto como un canal de Ca^{2+} preponderante en la fisiología del espermatozoide y que es activado prácticamente por cualquier compuesto que se ha probado, es decir es un canal “promiscuo” a ciertos ligandos (Barratt *et al.*, 2012).

Sin embargo, aunque estos últimos datos nos indican que posiblemente los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ mediados por GABA son producto de una vía de señalización independiente al canal CatSper, los experimentos realizados en célula única utilizando los inhibidores de dicho canal muestran que la movilización de Ca^{2+} mediada por GABA se inhibe (**Figura 12**), lo cual indicaría que el CatSper se activa por GABA, aunque no lo haría directamente, dados los resultados obtenidos en el espectrofluorómetro de mezclado rápido que muestran que el ingreso de Ca^{2+} mediado por este neurotransmisor presenta un retraso y además la magnitud del aumento de Ca^{2+} es muy pequeño en comparación con el activador de este canal (progesterona). Por otra parte podría ser que estos inhibidores afecten de alguna manera a las entidades moleculares (posiblemente canales Ca_v) río abajo de la vía de señalización mediada por este neurotransmisor que conduce al aumento de Ca^{2+} que hemos reportado en este trabajo.

Finalmente, esta investigación representa un avance considerable en el estudio de los neurotransmisores presentes en el tracto reproductor femenino capaces de inducir RA y movilizar Ca^{2+} en los espermatozoides de humano, los cuales se habían dejado en el olvido por más de veinte años y ahora cobran relevancia con los reportes recientes que ponen en duda la participación de la ZP3 como el inductor natural de la RA. Por otro lado la implementación de una metodología nueva (en nuestro laboratorio) más cuantitativa para el estudio de la RA constituye una herramienta excelente en el campo de la fecundación.

10. CONCLUSIONES

- GABA, Glicina y Acetilcolina son capaces de inducir reacción acrosomal en fracciones discretas de la población de espermatozoides.
- GABA, Glicina y Acetilcolina estimulan un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ en población de espermatozoides de humano capacitados.
- En experimentos de célula única GABA (56%), Glicina (31%) y Acetilcolina (29%) inducen un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ detectable en espermatozoides de humano capacitados, dicho aumento presenta un retraso. Además este aumento, para los tres neurotransmisores, depende de Ca^{2+} extracelular.
- GABA induce oscilaciones en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$,
- La movilización de Ca^{2+} mediada por GABA se inhibe con bicuculina.
- Mibefradil y NNC 55-0396 inhiben el aumento en $[Ca^{2+}]_i$ mediado por GABA.
- Es posible detectar aumentos en $[Ca^{2+}]_i$ en población de espermatozoides de humano capacitados en el espectrofluorómetro de mezclado rápido en respuesta a GABA, Glicina y Acetilcolina y este aumento es lento y pequeño en comparación con los controles positivos.

11. PERSPECTIVAS

- Reevaluar la RA mediada por GABA, Glicina y Acetilcolina con citometría de flujo en las condiciones adecuadas.
- Determinar el perfil farmacológico de los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} mediados por GABA, Glicina y Acetilcolina.
- Determinar espacialmente el aumento de Ca^{2+} mediado por GABA, Glicina y Acetilcolina.

12. REFERENCIAS

- Aarons D., Boettger-Tong H., Biegler B., George G., Poirier G. R. 1993. The acrosomal status of human sperm evaluated by coomassie blue staining and electron microscopy. *Mol. Androl.* 5:31–37.
- Álvarez, E., Milstien, S., Spiegel, S. 2007. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol Metab.* 18(8):300-7.
- Amin A. H., Bailey J. L., Storey B. T., Blasco L., Heyner S. 1996. A comparison of three methods for the acrosome reaction in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 11:741–745.
- Anderson, R. A., *et al.*, Jr, Feathergill, K. A., Rawlins, R. G., Mack, S. R., and Zaneveld, L.J. 1995. Atrial natriuretic peptide: a chemoattractant of human spermatozoa by a guanylate cyclase-dependent pathway. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 371–378.
- Arcelay, E., Salicioni, A. M., Wertheimer, E., and Visconti, P. E. 2008. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* 52: 463-472.
- Arnoult, C., Zeng, Y., and Florman, H. M. 1996. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell. Biol.* 135: 133-146.
- Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villas, M., and Florman, H. M. 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 6757-6762.
- Arts E. G., Kuiken J., Jager S. 1994. A new method to detect acrosome reacted spermatozoa using biotinylated soybean trypsin inhibitor. *Fertil. Steril.* 62:1044–1055.
- Austin, C. R. The “capacitation” of the mammalian sperm. *Nature.* 1952. 170:326.
- Barratt, C.L., Publicover, S. J., 2012. Sperm are promiscuous and CatSper is to blame. *EMBO J.* 13; 31(7):1624-6.
- Bray, C., Son, J. H. and Meizel, S. 2002a. A nicotinic acetylcholine receptor is involved in the acrosome reaction of human sperm initiated by recombinant human ZP3. *Biol. Reprod.* 67, 782–788.

- Bray, C., Son, J. H., Kumar, P. and Meizel, S. 2002b. A role for the human sperm glycine receptor/Cl⁻ channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. *Biol. Reprod.* 66:91–97.
- Bean, B. P. 1992. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci*; 13:87–90.
- Blackmore, P. F., Beebe, S. J., Danforth, D. R., and Alexander, N. 1990. Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J. Biol. Chem.* 265: 1376-1380.
- Bleil, J. D., and Wassarman, M. P. 1983. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95: 317-324.
- Bleil, J. D., Greve, J. M., and Wassarman, M. P. 1988. Identification of a secondary sperm receptor in induction of the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev. Biol.* 128: 376-385.
- Bonnefont X., Lacampagne A., Sánchez-Hormigo A., Fino E., Creff A., Mathieu M.N., Smallwood S., Carmignac D., Fontanaud P., Travo P., Alonso G., Courtois-Coutry N., 2005. Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:16880–16885.
- Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krähling M, Müller A, Kaupp UB, Strünker T. 2012. The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J.* 21;31(7):1654-65.
- Caballero-Campo, P., Chirinos, M., Fan, X. J., González -González, M. E., Galicia-Chavarria, M., Larrea, F., and Gerton, G. L. 2006. Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biol. Reprod.* 79:760-768.
- Calogero, A. E., Burerello, N., Ferrara, E., Hall, J., Fischei, S. and D'agata, R. 1999. γ -Aminobutyric acid (GABA) A and B receptor mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone. *Fertil. Steril.* 71:930–936.
- Cariño, C., Prasad, S. V., Skinner, S., Dunbar, B., Chirinos, M., Schwoebel, E., Larrea, F., Dunbar, B. S. 2002. Localization of species conserved zona pellucid antigens in mammalian ovaries. *Reprod. Biomed. Online*; 4:116-126.

Carver-Ward J. A., Jaroudi K. A., Einspenner M., Parhar R. S., Al-Sedairy S. T., Sheth K. V. 1994. Pentoxifylline potentiates ionophore (A23187) mediated acrosome reaction in human sperm: flow cytometric analysis using CD46 antibody. *Hum. Reprod.* 9:71–76.

Chakravarty, S., Suraj, K., and Gupta, S. K. 2005. Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucid glycoprotein-C. *Mol. Human. Reprod.* 11:365-372.

Champtiaux N., Gott i C., Cordero -Erasquin M., David D. J., Przybylski C., Lena C. 2003. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J. Neurosci.* 23: 7820–9.

Chang, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in fallopian tubes. 1951. *Nature* 168:997–998.

Chiu, P. C., Wong, B. S., Chung, M. K., Lam, K. K., Pang, R. T., Lee, K. F., Sumitro, S. B., Gupta, S. K., and Yeung, W. S. 2008. Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 79: 869-877.

Costello, S., Michelangeli, F., Nahs, K., Lefievre, L., Morris, J., Machado-Oliviera, G., Barrat, C., Kirkman, J. and Publicover, S. 2009. Ca²⁺ stores in sperm: their identities and functions. *Reprod.* 128: 425-437.

Cross N.L., Meizel S. 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.*, 41: 635–641.

Cross N. L., Morales P., Overstreet J. W., Hanson F. W. 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* 15:213–226.

Dajas-Bailador FA, Mogg A J, Wonnacott S. 2002. Intracellular Ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ stores. *J. Neurochem.* 81: 606–14.

Dajas-Bailador F.A., Wonnacott S. 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 317–24.

Dani JA , Ber trand D. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 699–729.

DasGupta S., Mills C. L., Fraser L. R. 1993 Ca⁺⁺ related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. Reprod. Fertil.* 99:135–143

Darszon, A., Acevedo, J.J., Galindo, B.E., Hernandez-Gonzalez, E.O., Nishigaki, T., Treviño, C.L., Wood, C., y Beltran, C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reprod.* 131: 977-988.

Darszon, A., Guerrero, A., Galindo B. E., Nishigaki, T., Wood, C. 2008. Sperm-activating peptides of ion fluxes, signal transduction and motility. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 595-606.

Darszon, A., Nishigaki, C., Treviño, C. L. y Beltrán, C. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol. Rev.* 91(4):1305-55.

Darszon, A., Acevedo J. J., Galindo B. E., Hernández-Gonzalez, E. O., Nishigaki, T., Treviño, C. L., Wood, C., and Beltrán, C. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reprod.* 131: 977-988.

Darszon A, Sánchez-Cárdenas C, Orta G, Sánchez-Tusie A. A., Beltrán C, López-González I, Granados-González G, Treviño CL. 2012. Are TRP channels involved in sperm development and function? *Cell. Tissue. Res.*

D’Cruz O. J., Haas G. G. 1992. Flow cytometry quantitation of the expression of membrane cofactor protein as a marker for the human sperm acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 58:633–636.

Engl E., Clausen O. P., Purvis K. 1991. Acrosomal integrity assessed by flow cytometry in men with variable sperm quality. *Hum. Reprod.* 6:1129–1134.

Escoffier, J., Boisseau, S., Cerres, C., Chen, C., Kim, D., Stamboulian, S., Shin, H. S., Campbell, K. P., De Ward, and Arnoult, C. 2007. Expression, localization and function 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.* 212: 753-763.

Fayuk D., Yakel JL. 2007. Dendritic Ca²⁺ signalling due to activation of alpha7-containing nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 582: 597–611.

- Fénichel P., Hsi B. L., Farahifar D., Donzeau M., Barrier-Delpech D., Yehy C. J. 1989. Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence activated cell sorter. *J. Reprod. Fertil.* 87:699–706.
- Feugang, J.M., Rodriguez-Osorio, N., Kaya, A., Wang, H., Page, G., Ostermeier, G.C., Topper, E.K., and Memili, E. 2010. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. *Reprod. Biomed.* Online.
- Florman, H. M., Tombes, R. M., First, N. L., and Babcock, D. F. 1989. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca^{2+} and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 135: 133-246.
- Foresta, C., Rossato, M., Chiozzi, P., Di Virgilio, F. 1996. Mechanism of human sperm activation by extracellular ATP. *Am. J. Physiol.*; 270: C1709–C1714.
- Fraser R. L., DasGupta S., Mills L. C. 1996. Fertilization calcium- dependent events. Letter to the editors. *Fertil. Steril.* 65:1258–1259.
- Fraser R. L. 1998. Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 13 (Suppl 1):9–19.
- Fucile S. Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors. 2004. *Cell Calcium.* 35: 1–8.
- Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Yoshida, N., Mlkoshiba, K., and Takenawa, T. 2003. Phospholipase C delta4 is required for Ca^{2+} mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J. Cell. Biol.* 162: 79-88.
- Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A., and Brewis I. A. 2008. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int. J. Dev. Biol* 52: 473-480.
- Ganguly, A., Bukovski, A., Sharma, R. K., Bansal, P., Bhandari, B., and Gupta, S. K. 2010. In human zona pellucida glycoprotein-1 binds to spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Human. Reprod.*
- Gosalvez J., Lopez-Fernandez C., De La Torre J., Suja J. A., Rufas J. S. 1986. A method for visualizing the acrosome by light microscopy. *Stain Technol.* 61:227–230.

Greve, J. M., and Wassarman, M. P. 1985. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural. *J. Mol. Biol.* 181: 254-264.

Gueorguiev VD, Zeman RJ, Meyer EM, Sabban EL. 2000. Involvement of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in activation of tyrosine hydroxylase and dopamine beta-hydroxylase gene expression in PC12 cells. *J. Neurochem.* 75: 1997–2005.

Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Uñates, D. R., Anastasia, A., Giojalas, L. C. 2008. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One.* 22; 3(8).

Gur Y, and Breitbart H. 2006. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev.* 20: 411-416.

Gur Y, and Breitbart H. 2008. Protein synthesis in sperm: Dialog between mitochondria and cytoplasm. *Mol. Cell. Endocrinol.* 282: 45-55.

Hardy, D. M., Oda, M. N., Friend, D. S., and Huang, T. T. Jr. 1991. A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *Biochem. J.* 275, 759–766.

Harper, C.V., Barratt, C.L., and Publicover, S. J. 2004. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J. Biol. Chem.* 279: 46315-46325.

Henkel RR, Schill WB. The sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;14:108–29.

Henley N., Bacon C., Roberts K. D. 1994. Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain. *Int. J. Androl.* 17:78–84.

Hershlag A., Paine T., Scholl G.M., Rosenfeld D. L., Mandel F. S., Zhu J. Z., Guhring P., Mecerod D., Benoff S. 1997. Acrobeads test as a predictor of fertilization in vitro. *Am. J. Reprod. Immunol.* 37:291–299.

Holden C. A., Hyne R. V., Sathananthan A. H., Trounson A. O. 1990. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. *Mol. Reprod. Dev.* 25:247–257.

Hu, J. H., He, X. B., Wu, Q., Yan, Y. C. and Koide, S. S. 2002. Subunit composition and function of GABA_A receptors of rat spermatozoa. *Neurochem. Res.* 27:195–199.

Ibañez, C. F., Pelto-Huikko, M., Soder, O., Ritzen, E., Hersh, L., Hokfelt, T. and Persson, H. 1991. Expression of choline acetyltransferase mRNA in spermatogenic cells results in an accumulation of the enzyme in the postacrosomal region of mature spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88,3676–3680.

Inoué N., Satouh Y., Ikawa M., Okabe M., and Ryuzo Yanagimach. 2011. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *PNAS.* 108(50):20008-11.

Iritani, A., Sato, E., Nishikawa, Y. 1974. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *J. Anim. Sci.* 39:582–588.

Jimenez-Gonzalez, C., Michelangeli, F., Harper, C. V., Barrat, C. L., and Publicover, S. J. 2006. Calcium signaling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Hum. Reprod. Update.* 12: 253-267.

Jin, J.-yuan, Centre, R., Affiliated, T. F., Chen, W.-ying, Kong, H., Zhou, C. X., et al. (2009). Activation of GABA A Receptor / Cl Channel and Capacitation in Rat Spermatozoa: Cl are Essential. *Systems Biol.* 97-108.

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. a, et al. 2011. From the Cover: Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(12), 4892-6.

José-Ramírez, O. 2010. Los canales de Ca²⁺ activados por voltaje y su participación en la reacción acrosomal inducida por ZP3hr en espermatozoides de humano. Tesis de maestría. IBT-UNAM. México.

Kaila, K. 1994. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Progress in Neurobiol.* 42:489–537.

Karuhn, R. F. 1977. Method of predetermining time of ovulation in women and in animals to control conception. U. S. Patent. 4,036,212.

Kim, K. S., Foster, J. A., and Gerton, G. L. 2001. Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol. Reprod.* 64, 148–156.

- Kim, K.S., and Gerton, G. L. 2003. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev. Biol.* 264, 141–152.
- Kneussel M. and Betz H. 2000. Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J. Physiol* 525: 1–9.
- Kozawa, O., Miwa, M., Tokuda, H., 1993. Cross-talk between Ca^{2+} influx and phosphoinositide hydrolysis by extracellular adenosine triphosphate in rat PC12 pheochromocytoma cells. *Endocrinol.* 133:166–170.
- Kumar, P. and Meizel, S. 2005. Nicotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm. *J. Biol. Chem.* 280, 25928–25935.
- Jungnickel, M. K., Marrero, H., Bimbaumer, L., Lemos, J. R., and Florman, H. M. 2001. Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat. Cell. Biol.* 3: 499-502.
- Kuligowski J, Ferrand M, and Chenou E. 1991. Stored mRNA in early embryos of a fern *Marsilea vestita*: a paternal and maternal origin. *Mol. Reprod. Dev.* 30: 27-33.
- Lefievre, L., Conner, S. J., Salpekar, A., Olofuwobi O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Aftan, M., Brewis, I. A., Monk, M., Hughes, D. C., and Barrat, C. L. 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.* 19:1580-1586.
- Lee M. A., Trucco G. S., Bechtol K. B., Wummer N., Kopf G. S., Blasco L., Storey B. T. 1987. Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline assay. *Fertil. Steril.* 48:649–658.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature.* 471(7338), 387-391.
- Luria, A., Rubinstein, S., Lax, Y., & Breitbart, H. 2002. Extracellular Adenosine Triphosphate Stimulates Acrosomal Exocytosis in Bovine Spermatozoa via P 2 Purinoceptor. *Biol. Reprod.* 66(2) 437, 429-437.
- Lynch J. W. 2004. Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel. *Physiol. Rev.* 84: 1051–1095.
- Mayerhofer, A., Dimitrijevic, N. and Kunz, L. 2003. The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. *Life Sci* 72, 2039–2045.

Mortimer D., Curtis E. F., Miller R. G. 1987. Specific labeling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J. Reprod. Fertil.* 81:127–135.

Melendrez C. S., Meizel, S. 1995. Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl⁻² channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 53:676–683.

Mena J. A., Ramírez O. T., and Palomares L. A. 2003. Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques.* 34, 260-262, 264.

Murashima, Y. L. and Kato, T. 1986. Distribution of gamma-aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in the layers of rat oviduct. *J. Neurochem.* 46:166–172.

Nagy S., Jansen J., Topper E. K., Gadella B. M. A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma- and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles. 2003. *Biol. Reprod.* 68, 1828–1835.

Nishigaki T., Wood C. D., Shiba K., Baba S. A. and Darszon A. 2006 Stroboscopic illumination using light-emitting diodes reduces phototoxicity in fluorescence cell imaging. *Biotechniques*, 41:191–197.

Okabe M., Nagira M., Kawai Y., Matzno S., Mimura T., Mayumi T. 1990. A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona free hamster eggs. *Fertil. Steril.* 54:1121–1126.

Ong H. L., Ambudkar I. S. 2011. The dynamic complexity of the TRPC1 channelosome. *Channels.* 5(5):424–431.

O'Toole, C. M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, and Florman, H. M. 2000. Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell.* 11: 1572-1584.

Purvis K., Rui H., Scholberg A., Hesta S., Clausen O. P. 1990. Application of flow cytometry to studies on the human acrosome. *J. Androl.* 11:361–366.

Rathouz M.M., Berg D.K. 1994. Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms. *J Neurosci.* 14: 6935–45.

Sato, Y., Son, J.-ho, & Meizel, Stanley. 2009. The Mouse Sperm Glycine Receptor / Chloride Channel : Cellular Localization and Involvement in the Acrosome Reaction Initiated by Glycine. *Cell.* 21(1), 2005-2009.

Sato M., Suzuki K., Yamazaki H., Nakanishi S. 2005. A pivotal role of calcineurine signaling in development and maturation of postnatal cerebellar granule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:5874–5879.

Sato Y., Son J. and Meizel S. 2000. The Mouse Sperm Glycine Receptor/Chloride Channel: Cellular Localization and Involvement in the Acrosome Reaction Initiated by Glycine. *J. Androl.* 21(1):99-106.

Sánchez R., Töpfer-Petersen E., Aitken R. J., Schill W. B. 1991. A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable human spermatozoa. *Andrologia.* 23:197–203.

Servin-Vences M. R., Tatsu Y., Ando H., Guerrero A., Yumoto N., Darszon A., Nishigaki T. 2012. A caged progesterone analog alters intracellular Ca^{2+} and flagellar bending in human sperm. *Reproduction.* 144(1):101-9.

Sharma G., Vijayaraghavan S. 2001. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 4148–53.

Sharma R. K., Padron O. F., Agrawal A. 1997. Usefulness of the acrobead test in evaluating human acrosome function in fresh and cryopreserved sperm. *J. Urol.* 157:1692–1696.

Sieghart, W. 2006. Structure, pharmacology and function of GABA A receptor subtypes. *Adv. Pharmacol* 54:231–263.

Son, J. H. and Meizel, S., 2003. Evidence suggesting that mouse sperm acrosome reaction initiated by the zona pellucida involves an alpha 7 nicotinic receptor. *Biol. Reprod.* 68, 1348–1353.

Suhaiman, L., Blas, G. A. D., Obeid, L. M., Darszon, A., Mayorga, L. S., Belmonte, S. A. 2010. Sphingosine 1-Phosphate and Sphingosine Kinase Are Involved in a Novel Signaling Pathway Leading to Acrosomal. *Journal of Biol. Chemistry*, 285(21), 16302-16314.

Sliwa, L. 1993. Heparin as a chemoattractant for mouse spermatozoa. *Arch. Androl.* 31,149–152.

Sliwa, L. 1994. Chemotactic of hormones in mouse spermatozoa. *Arch. Androl.* 32, 83–88.

Sliwa, L. 1995. Chemotaction of mouse spermatozoa induced by certain hormones. *Arch. Androl.* 35,105–110.

- Soom, A. V., Tanghe, S., Pauw, I. D. Kruif, A. 2002. Function of the Cumulus Oophorus Before and During Mammalian Fertilization. *Hum. Reprod.* 151(C), 144-151.
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., et al. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature.* 471(7338), 382-386.
- Suarez, S. S. 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J. Dev. Biol.* 52: 455-462.
- Sun, T. T., Chung, C. M., & Chan, H. C. 2011. Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: involvement of a novel sperm-released factor NYD-SP8. *Protein & cell.* 2(2), 92-8.
- Sutovsky, P. Sperm capacitation, the acrosome reaction and fertilization. 2010. In: *Reproductive Endocrinology and Infertility: Integrating Modern Clinical and Laboratory Practice.* Carrell, D. T. and Peterson, C. M. New York: Springer Science Business Media. 389–421.
- Sutton, K. A., Jungnickel, M. K., Wang, Y., Cullen, K., Lambert, S., and Florman, H. M. 2004. Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. *Dev. Biol.* 274: 496-435.
- Szabo S.I., Zelles T., Lendvai B. 2008. Intracellular Ca²⁺ dynamics of hippocampal interneurons following nicotinic acetylcholine receptor activation. *Neurochem. Int.* 52: 135–41.
- Talbot P., Chacon R. S. 1980. A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. *Gamete Res.* 3:211-216.
- Talbot P., Chacon R. S. 1981. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.* 215:201–208.
- Tao J., Du J. Y., Critser E. S., Critser J. K. 1993. Assessment of the acrosomal status and viability of human spermatozoa simultaneously using flow cytometry. *Hum. Reprod.* 8:1879–1885.
- Teves, M. E., Barbano, F., Guidobaldi, H. A., Sánchez, R., Miska, W., and Giojalas L. C. 2006. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil. Steril.* 86: 745-749.

Teves, M. E., Guidobaldi, H.A., Uñates, D.R., Sánchez, R., Miska, W., Publicover, S. J., Morales-García, A. A., Giojalas, L.C. 2009. Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One*. 8; 4(12): e8211.

Tsuneki H., Klink R., Lena C., Korn H., Changeux JP. 2000. Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur. J. Neurosci*. 12: 2475–85.

Villanueva-Díaz, C., Arias-Martínez, J., Bermejo-Martínez, L., and Vadillo-Ortega, F. 1995. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil. Steril*. 64, 1183–1188.

Visconti, P. E. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106: 667-668.

Walenski, L. D., and Snyder, S. H. 1995. Inositol 1,4,5 trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell. Biol*. 130: 857-869.

Wistrom, C.A. and Meizel, S. 1993. Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev. Biol* 159:679–690.

Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization, in the physiology of reproduction. In Press, R. New York. 189-317.

Yin, L., Chung, C. M., Huo, R., Liu, H., Zhou, C., Xu, W., Zhu, H., Zhang, J., Shi, Q., Wong, H. Y., et al. 2009. A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction. *Cell. Mol. Life Sci*. 66, 900–908.

Yoshida, K., Ito, C., Yamatoya, K., Maekawa, M., Toyama, Y., Suzuki-Toyota F. and Toshimori, K. A model of the acrosome reaction progression via the acrosomal membrane-anchored protein equatorin. 2010. *Reprod*. 139: 533–544.

Zoppino F. C., Halón N. D., Bustos M. A., Pavarotti M. A., Mayorga L. S. 2012 Recording and sorting live human sperm undergoing acrosome reaction. *Fertil Steril*. 97(6):1309-15

Zeng, Y., Clark, E. N. y Florman, H. M. 1995. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol*. 171: 554-563.

Wolf D. P., Boldt J., Byrd W., Bechtol D. B. 1985. Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 32:1157–1162.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (Fifth Edit.). Switzerland: World Health Organization.