



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Depto. Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular

“Monitoreo simultáneo de la dinámica de la reacción acrosomal y movilización de Ca^{2+}_i en espermatozoides capacitados en diferentes pH_e s”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Esperanza Mata Martínez

TUTOR PRINCIPAL

Claudia L. Treviño Santa Cruz
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

COMITE TUTURAL

Dr. Christopher Wood (Instituto de Biotecnología-UNAM)

Dra. Mayel Chirinos Espín (INNSZ)



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio número catorce del Departamento de Biología del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México), bajo la asesoría de la Dra. Claudia L. Treviño Santa Cruz.

Investigación realizada gracias al apoyo de:

Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN203116), Fronteras-CONACyT No. 71, CONACyT-México (253952).

Además, Esperanza Mata Martínez fue estudiante de doctorado del programa de Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas contando con una beca Conacyt (362007).

También se recibió apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para la asistencia a congresos nacionales e internacionales y para realizar una estancia de investigación en la Universidad de Birmingham, Inglaterra.

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. La fecundación	10
1.2. Eventos indispensables para la fecundación en espermatozoides de mamífero	10
1.2.1. Hiperactivación.....	10
1.2.2. Capacitación.....	11
1.2.3. Reacción acrosomal.....	11
2. ANTECEDENTES.....	12
2.1. Inductores fisiológicos de la reacción acrosomal	12
2.1.1. Ácido γ -aminobutírico (GABA).....	12
2.1.2. Progesterona.....	12
2.1.3. Prostaglandina	13
2.1.4. Cumulus oophorus	13
2.2. Evaluación de la reacción acrosomal	14
2.3. Importancia del pH en la fecundación	15
2.3.1. Mecanismos de regulación del pH_i	15
2.3.2. Papel del pH en la fisiología del espermatozoide	16
2.4. Oscilaciones de Ca^{2+}	17
2.4.1. Mecanismos de aumento de Ca^{2+}	17
2.4.2. Mecanismos de disminución de Ca^{2+}	18
2.4.3. Decodificación de las oscilaciones de Ca^{2+}	19
2.4.4. Procesos biológicos regulados por oscilaciones de Ca^{2+}	19
2.4.5. Papel de las oscilaciones de Ca^{2+} en la fisiología de los espermatozoides de humano.....	20
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVO GENERAL.....	20
4.1. Objetivos particulares.....	20
5. METODOLOGÍA.....	21
5.1. Nado hacia arriba (swim-up) y capacitación.....	21
5.2. Análisis de los parámetros marcadores de capacitación.....	21
5.2.1. Medición del Ca^{2+}_i mediante citometría de flujo	21
5.2.2. Análisis de la movilidad	22
5.2.3. Análisis del patrón de fosforilación de proteínas en tirosinas	22

5.3. Medición simultánea de RA y $[Ca^{2+}]_i$ en célula única	22
5.4. Análisis estadístico.....	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1. El pH_e afecta el estado de capacitación de los espermatozoides	24
6.1.1. El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ de los espermatozoides es mayor cuando la capacitación se lleva a cabo a pH_e 8.0.	24
6.1.2. El porcentaje de espermatozoides hiperactivados aumenta cuando se exponen a pH_e s alcalinos	25
6.1.3. Los niveles de fosforilación de proteínas en tirosinas son mayores a pH_e s alcalinos	27
6.2. El pH_e mantenido durante la capacitación influencia la eficiencia de la RA.....	28
6.3. Las oscilaciones de Ca^{2+} son más frecuentes a pH_e 6.5 y correlacionan con la ausencia de RA.....	33
6.3.1. Los flujos externos de Ca^{2+} y los reservorios internos de Ca^{2+} están involucrados en la generación de las oscilaciones de Ca^{2+}	37
6.3.2. La inhibición farmacológica de las oscilaciones de Ca^{2+} a pH_e 6.5 restaura la habilidad de los espermatozoides de experimentar la RA cuando se exponen a progesterona.	48
7. CONCLUSIONES	50
8. PERSPECTIVAS	51
9. REFERENCIAS	52

RESUMEN

La fecundación es un evento esencial para los organismos que dependen de la reproducción sexual para dar origen a un nuevo organismo. Este proceso está altamente sincronizado e involucra una compleja serie de interacciones entre el espermatozoide y el óvulo, culminando en la fusión de estos gametos. El gameto masculino debe residir en el tracto femenino durante un período de tiempo para adquirir la capacidad de fecundar, este proceso se conoce como capacitación. Durante la capacitación, en los espermatozoides ocurren varios cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que les brindan la capacidad de fecundar. Entre estos cambios se encuentran: aumentos en: la concentración de monofosfato de adenosina cíclico ([cAMP]), pH intracelular (pH_i), la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), fosforilación de proteínas en tirosinas e hiperpolarización del potencial de membrana.

Respecto a la alcalinización intracelular asociada a la capacitación, se sabe que este cambio en el pH_i ocurre en los espermatozoides de muchos mamíferos sin embargo, la forma en que este cambio se relaciona con otros procesos asociados a la capacitación no está clara. Dos de los canales iónicos específicos del espermatozoide mejor estudiados, CatSper y SLO3, contienen secuencias de poli-histidina y se activan por alcalinización. Con respecto a CatSper, resultados de nuestro laboratorio muestran que la actividad de este canal, cuando se estimula por dos de sus activadores fisiológicos (progesterona y prostaglandina E), es diferencial dependiendo del pH al que se realizan los experimentos, mostrando mayor actividad cuando el pH extracelular es más alcalino (7.6-8.0).

Estas observaciones son relevantes desde un punto de vista fisiológico ya que se sabe que el pH del lumen del oviducto, en varias especies de mamíferos, aumenta de 7.1 a 8, estos cambios están asociados con la ovulación y, curiosamente, el pH más alcalino corresponde al sitio donde ocurre la fertilización (el ámpula). Por otra parte, se sabe que el pH del fluido cervical es ~6.5, mientras que el pH de la vagina es el sitio donde se depositan los espermatozoides varía entre 4 y 5.

Con esto en mente, investigamos el efecto de capacitar espermatozoides de humano utilizando medios de diferentes pHs sobre diferentes cambios fisiológicos conocidos como marcadores de capacitación ($[Ca^{2+}]_i$, hiperactivación y fosforilación de proteínas en tirosinas). Con base en las mediciones realizadas de estos marcadores de capacitación, encontramos que un medio capacitante con pH 7.4 y 8.0 promueve la capacitación de manera más eficiente comparado con el medio pH 6.5.

Los espermatozoides capacitados son capaces de experimentar la reacción acrosomal (RA), la cual consiste en la exocitosis del gránulo acrosomal, y se caracteriza por la formación de múltiples puntos de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa en la región anterior de la cabeza del espermatozoide, constituye un proceso necesario para que los espermatozoides atraviesen la envoltura del óvulo y les permite exponer una membrana fusogénica que permite la fusión óvulo-esperma.

Aunque una de las glicoproteínas de la matriz externa que recubre al óvulo, ZP3, se ha considerado como el inductor natural de la RA, otros estudios han demostrado que varios compuestos son capaces de inducir esta reacción con la consiguiente movilización de Ca^{2+} . La relevancia fisiológica de estos inductores se ha visto reforzada por los resultados obtenidos recientemente que muestran que, al menos en el ratón, los espermatozoides que logran fertilizar un óvulo son aquellos que experimentaron la RA antes de llegar al óvulo. Por lo tanto, es importante caracterizar esos otros ligandos encontrados por los espermatozoides durante su tránsito a través del tracto reproductivo femenino que se sabe inducen RA.

La prueba clásica para determinar el estado acrosomal se realiza en espermatozoides fijados utilizando lectinas acopladas a fluoróforos, que reconocen proteínas glicosiladas presentes en el acrosoma. Sin embargo, para caracterizar la dinámica en tiempo real de este proceso y para correlacionarlo con la movilización de Ca^{2+} , se requieren ensayos en células vivas que permitan el monitoreo simultáneo de RA y cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Los colorantes fluorescentes de la familia FM tienen propiedades adecuadas para rastrear la dinámica de la membrana plasmática durante la exocitosis y la endocitosis en células somáticas. Un trabajo previo de nuestro laboratorio demostró que FM4-64 informa con éxito la aparición de la RA en tiempo real y que los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ asociados pueden seguirse con un colorante sensible a Ca^{2+} al mismo tiempo.

En experimentos en células individuales monitoreamos la RA y los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ asociados a este proceso, mediados por GABA, progesterona y PGE1 en espermatozoides humanos capacitados a diferentes pH_e s. Encontramos que la capacitación a pH_e 7.4 y 8.0 promueve la RA de manera más eficiente. Por otro lado observamos oscilaciones de Ca^{2+} , las cuales fueron más frecuentes a pH_e 6.5, y se correlacionan con la ausencia de RA. En cuanto al mecanismo responsable de generar estas oscilaciones, mostramos que están involucrados el influjo externo de Ca^{2+} y la movilización de este ion de reservorios internos de Ca^{2+} . Además, la inhibición farmacológica de las oscilaciones de Ca^{2+} observadas a pH_e 6.5 restablece la capacidad de los espermatozoides de experimentar la RA cuando se exponen a la progesterona. Sugiriendo a las oscilaciones de Ca^{2+} como un mecanismo para prevenir la RA prematura

ABSTRACT

Fertilization is an essential event for organisms that depend on sexual reproduction. This process is highly synchronized and involves a complex series of interactions between sperm and egg, culminating in the fusion of these gametes. The male gamete must reside in the female tract for a period of time to acquire its fertilizing capacity; this process is known as capacitation. Capacitation combines several physiological changes, such as increases in cyclic adenosine monophosphate (cAMP), intracellular pH (pH_i), intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), tyrosine phosphorylation and membrane potential (V_m) hyperpolarization. All of them are necessary to render the sperm fertilization competent. Capacitation-associated intracellular alkalization is reported to occur in sperm of many mammalian species however, how this change is coupled to other capacitation-associated processes is not well established. Two of the best-studied sperm ion channels, CatSper and SLO3, contain poly-histidine regions and are readily activated by alkalization. Regarding CatSper, data from our laboratory show that the activity of this channel, when stimulated by two of its physiological activators (progesterone and prostaglandin E), is differentially regulated depending on the pH at which the experiments are performed, harnessing its activity when the extracellular pH is more alkaline (7.6-8.0).

This potentiation is relevant from a physiological point of view since it is known that the pH of the lumen of the oviduct, in several mammalian species, increases from 7.1 to 8, these changes are associated with ovulation and interestingly the more alkaline pH corresponds to the site where fertilization occurs (the ampulla). In other side it is know that the vagina pH, the place where are the sperm arrived, is around 6 and 6.5.

With this in mind, we investigated the effect of capacitating human sperm using media at different pHs on different physiological changes known as capacitation markers (pH_i , $[Ca^{2+}]_i$, V_m , tyrosine phosphorylation and hyperactivation). We found that a capacitation medium with pH 7.4 and 8.0 promotes capacitation more efficiently comparing with medium pH 6.5.

Capacitated sperm are able to undergo the acrosome reaction (AR), which consists on the acrosomal granule exocytosis characterized by the formation of multiple fusion points between 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 succeed to fertilize an egg are those that underwent the AR before reaching the egg. Therefore, it is important to further characterize other ligands encountered by sperm during its transit through the female reproductive tract known to induce AR. The classical test to determine the acrosomal status is performed in fixed sperm using lectins coupled to fluorophores, which recognize glycosylated proteins present in the acrosome. However to characterize the real time dynamics of this process and to correlate it with Ca^{2+} mobilization, assays in living cells that allow simultaneous monitoring of AR and intracellular Ca^{2+} changes are required.

Fluorescent dyes from the FM family display properties suitable to track plasma membrane dynamics during exocytosis and endocytosis in somatic cells. A previous work from our laboratory showed that FM4-64 successfully reports the occurrence of the AR in real time and that the associated intracellular Ca^{2+} changes can be followed with a Ca^{2+} sensitive dye (Fluo 3-AM) at the same time.

We monitor in single cell experiments the AR and the associated intracellular Ca^{2+} changes mediated by GABA, progesterone and PGE1 in human sperm capacitated at different pH_e s. We found that Capacitation at pH_e 7.4 and 8.0 promotes AR more efficiently. In other hand we observed spontaneous Ca^{2+} oscillations, these were more frequent at pH_e 6.5, and they correlate with a lack of AR. Regarding the mechanism responsible to generate this oscillations, we show that external Ca^{2+} influx and internal Ca^{2+} stores are involved. Additionally, pharmacological inhibition of Ca^{2+} oscillations at pH_e 6.5 restores the ability of spermatozoa to undergo the AR when exposed to progesterone. Suggesting the Ca^{2+} oscillations as a mechanism to prevent untimely AR in human sperm.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La fecundación

La fecundación es un evento esencial en el ciclo de vida de 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 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. 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 la fusión y transferencia del genoma. Por otro lado, a lo largo del flagelo, dividido en pieza media, principal y terminal, se encuentra el axonema que provee de movimiento al espermatozoide (1).

En los organismos de fecundación interna, como los mamíferos, los espermatozoides se depositan en el tracto genital femenino. Es a partir de aquí que los espermatozoides continúan experimentando un proceso de maduración y preparación, que incluye cambios morfológicos y fisiológicos, los cuales les confieren la capacidad de llegar hasta el óvulo y fecundarlo (2).

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 como son la hiperactivación, capacitación y reacción acrosomal y se sugiere que 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 (3).

En otros tipos celulares se ha demostrado que los canales iónicos son fundamentales para desencadenar en milisegundos cambios eléctricos y de concentración de iones, cuya actividad se puede regular por factores como ligandos, nucleótidos cíclicos, presión, cambios en el voltaje o agotamiento del Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (4).

1.2. Eventos indispensables para la fecundación en espermatozoides de mamífero

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 caracterizada por un batido flagelar simétrico y de corta amplitud con un nado progresivo y en una dirección casi recta. Por otra parte se ha demostrado que los espermatozoides recuperados del oviducto, una región cercana al sitio de la fecundación presentan una movilidad hiperactivada. Este tipo de movilidad se caracteriza por un batido flagelar vigoroso, asimétrico, con una amplitud y curvatura mayor (5).

Un elemento importante que repercute en la regulación de la movilidad en mamíferos, lo constituye el óvulo que, incluyendo el de humano, se encuentran rodeados por una densa capa de células llamada *cumulus oophorus*, que entre otras sustancias, secreta 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 (6).

El gradiente de progesterona es capaz de atraer *in vitro* mediante quimiotaxis a los espermatozoides capacitados de humano a partir de concentraciones de 10-100 pM, lo que sugiere que este evento podría contribuir a dirigir a los espermatozoides en el último tramo de su trayecto hacia el óvulo (7). Sin embargo, no está comprobado que esto ocurra *in vivo*.

1.2.2. Capacitación

Los espermatozoides eyaculados deben permanecer en el tracto genital femenino para adquirir la capacidad de fecundar al óvulo. El conjunto de cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos que se llevan a cabo en el espermatozoide durante su estancia dentro del tracto que le permiten adquirir la habilidad de fecundar al ovulo se denomina capacitación. Descubrimientos recientes indican que los cambios involucrados en la capacitación resultan de una combinación de procesos secuenciales y en algunos casos paralelos (8 y 9). Dentro de los cambios que suceden durante la capacitación, se encuentra una hiperpolarización del potencial de membrana que se ha observado en espermatozoides bovinos y murinos (esta última especie de mamífero es en la que se han hecho los estudios clásicos sobre la fisiología del espermatozoide), la remoción de colesterol de la membrana plasmática, e incrementos del pH intracelular (pH_i) y la concentración intracelular de $[Ca^{2+}]_i$, $[HCO_3^-]_i$ y $[Cl^-]_i$ (10 y 11). Por otra parte aumenta la $[AMPc]_i$ que se asocia con la activación de la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPc y esto, a través de una cascada de señalización cuya secuencia de pasos se desconoce culmina con la fosforilación de proteínas en tirosinas. Esta fosforilación de proteínas en tirosinas se ha considerado marcador del estado capacitado de los espermatozoides (10).

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) (12) para mimetizar el ambiente del oviducto. Aunque se sabe que estos componentes son suficientes para promover la capacitación, el ambiente al que se enfrentan los espermatozoides *in vivo* adicionalmente, contiene aminoácidos, carbohidratos, hormonas, factores de crecimiento, agentes purinérgicos, glicoproteínas y neurotransmisores, los cuales están ausentes en la mayoría de los medios capacitantes debido a que se desconoce la concentración exacta de cada uno de estos componentes en el oviducto (13).

1.2.3. Reacción acrosomal

Este proceso consiste en la exocitosis del granulo acrosomal, 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 (12). La RA es necesaria para que el espermatozoide atraviese la envoltura del óvulo y presente una nueva membrana que le permita fusionarse con él.

La vía de señalización intracelular que culmina en la RA aún no se comprende por completo, sin embargo, los resultados de varios estudios indican que la participación del Ca^{2+} es fundamental en este proceso. El cual involucra la participación de canales iónicos permeables a este catión, ya que la RA se inhibe al utilizar antagonistas de canales iónicos que bloquean el flujo de Ca^{2+} (2).

2. ANTECEDENTES

2.1. Inductores fisiológicos de la reacción acrosomal

A pesar de que la ZP3 se ha considerado como el inductor natural de la RA, otros estudios han demostrado que diversos compuestos son capaces de inducir esta reacción. Muchos de los cuales se encuentran a lo largo del tracto genital femenino por lo que podrían tener relevancia fisiológica. Esta idea se ha fortalecido con resultados recientes que muestran, que al menos en ratón, los espermatozoides que logran fecundar a un óvulo son aquellos que sufrieron la RA antes de llegar al ovocito (ver sección del cumulus), cuestionando fuertemente el modelo tradicional que propone a la ZP3 como el inductor fisiológico. 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 ($GABA_A$ R) en las neuronas postsinápticas del sistema nervioso central y periférico (14). El receptor de GABA ($GABA_A$ R) se encuentra en la membrana plasmática como un receptor complejo multi-subunidad unido a un canal de Cl^- . Su activación conduce a la apertura del canal, provocando un flujo de iones Cl^- y consecuentemente la hiperpolarización o depolarización de la membrana, dependiendo del tipo celular y el gradiente electroquímico para este ión (15 y 16).

Interesantemente, existen altos niveles de GABA en la mucosa del oviducto, los cuales son mayores a los encontrados en el cerebro (1-10 mM) (17), hasta 10 veces más. Estas evidencias 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 (18).

Las subunidades del receptor de $GABA_A$ se han identificado en el segmento ecuatorial de la cabeza de espermatozoides de humano (19) y en la superficie ventral del acrosoma de espermatozoides de rata (20). También se ha demostrado que GABA induce la RA en espermatozoides de humano, ratón y rata. Estos resultados sugieren que el canal de Cl^- /receptor de $GABA_A$ y un receptor quizás unido a un canal de Ca^{2+} o a un receptor de progesterona participan en este proceso. 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 y la integridad funcional del canal de Cl^- es vital para este efecto (21).

2.1.2. Progesterona

La progesterona es capaz de estimular, entre otros eventos fisiológicos, la RA. Esta hormona provoca un incremento rápido y bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$, dicho incremento depende de la $[Ca^{2+}]$ extracelular, y se piensa que la liberación de Ca^{2+} de pozas intracelulares podría estar involucrada en la segunda fase de aumento (22). Sin embargo, existen otros trabajos que sugieren que el canal CatSper, un canal de calcio cuya actividad es dependiente de la alcalinización del pH_i 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 con concentraciones nanomolares de esta hormona se potencia la actividad del CatSper. Se postula que dicho canal se activa sinérgicamente por la elevación del pH_i y extracelularmente por progesterona (23 y 24).

Con respecto al mecanismo de activación de CatSper mediado por esta hormona, recientemente se reportó que dicha activación no se debe a una interacción directa sino más bien a través de la interacción de la progesterona con una hidrolasa de lípidos. Dicha hidrolasa es la proteína 2 con dominio hidrolasa alfa/beta hidrolasa (ABHD2) que al unirse a progesterona se activa e hidroliza al 2-araquidonil glicerol (2AG) de la membrana plasmática. El 2AG inhibe al CatSper, por lo cual la remoción de este lípido de la membrana plasmática conduce a la activación del CatSper, con la consecuente entrada de Ca^{2+} a través de este canal iónico (25).

2.1.3. Prostaglandina

Las prostaglandinas son compuestos derivados del ácido araquidónico. Son sustancias biológicamente muy potentes, que tienen una amplia variedad de acciones en muchos sistemas biológicos. Las prostaglandinas se descubrieron originalmente en el tracto reproductor masculino, pero ahora se sabe que la mayoría de los tipos celulares poseen las enzimas necesarias para su biosíntesis. Debido a sus diversos efectos biológicos, se sabe que participan en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Por ejemplo, en el tracto reproductor femenino están involucradas en eventos como: el embarazo, el parto, la dismenorrea y la luteolisis (26). Inicialmente, las prostaglandinas, se aislaron de la vesícula seminal y se clasificaron en prostaglandina E (PGE) y prostaglandina F (PGF). Esta nomenclatura se derivó de la solubilidad de estas en éter: (PGE) o en fosfato: (PGF) (27).

Existen reportes que sugieren que PGE y $PGF2\alpha$ tienen un papel en la RA en espermatozoides de hámster y cuyo (28 y 29). Además, se observó un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ de los espermatozoides subsecuente a la exposición a PGE1 y PGE2 (30). En el caso de espermatozoides de humano se ha mostrado que las prostaglandinas E son capaces de inducir RA y mediar la entrada de Ca^{2+} (31 y 32). Además, se demostró que PGE1, en espermatozoides de humano también activa directamente a CatSper (23 y 24), aunque el mecanismo de activación es distinto al propuesto por la progesterona.

Se sabe que las prostaglandinas producidas por las células foliculares y por las células del oviducto están involucradas en el proceso de ovulación. Además en tanto que los espermatozoides se acercan al óvulo, estos se exponen a concentraciones crecientes de PGE producidas localmente dentro de la trompa de falopio y por células de la granulosa que rodean al ovocito (33). De esta manera, en la cercanía del ovocito, la PGE1, de manera similar a como se propone para la progesterona, serviría para estimular la RA antes de unirse a la zona pelúcida (ZP).

2.1.4. Cumulus oophorus

Recientemente se han ido acumulando evidencias que sugieren que la interacción entre el *cumulus oophorus* y el espermatozoide tiene un papel mucho más importante en la fecundación del que se le había atribuido. Se postula que las células del cumulus pueden promover la fecundación: 1) causando un atrapamiento mecánico de los espermatozoides y guiando solo a los espermatozoides hiperactivados hacia

el óvulo, 2) previniendo que los espermatozoides anormales entren a la matriz del cumulus, 3) secretando sustancias que creen un microambiente que favorezca la capacitación y penetración del óvulo y 4) protegiendo al ovocito para favorecer una fecundación normal (34).

Trabajos recientes proponen nuevas funciones para estas células, por ejemplo, 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, investigaron la presencia o ausencia del acrosoma en espermatozoides expuestos a óvulos rodeados de células del cumulus. Este trabajo demostró que muchos espermatozoides reaccionan en su trayecto a través del cumulus y de manera importante, la mayoría de los espermatozoides que se fusionan con el ovulo ya no presentan el acrosoma. Además la presencia de las células del cumulus constituye un factor indispensable para favorecer el éxito de la fecundación (35), proponiendo así que la RA se induce por las células del cumulus o por algún compuesto que estas secreten. Esto último cuestiona la participación de la ZP como inductor natural de la RA. Con respecto a esta idea, un trabajo posterior 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 (36). Aunque estos datos contradicen fuertemente el paradigma de que el inductor fisiológico de la RA es la ZP3, estos provienen de un par de trabajos realizados en una sola especie, por lo cual no son suficientes para generalizar que esto ocurra en todas las especies de mamíferos. Sin embargo, con base en estos hallazgos se han generado preguntas muy interesantes y el planteamiento de nuevas hipótesis que nos permitirán entender la importancia fisiológica de los diferentes inductores y así poder descifrar cual es el inductor de la RA y el sitio en donde ocurre este proceso.

2.2. Evaluación de la reacción acrosomal

La cuantificación de los porcentajes de espermatozoides reaccionados se realiza empleando una variedad de métodos. Los ensayos clásicos se llevan a cabo mediante microscopía de fluorescencia utilizando lectinas acopladas a fluoróforos, una de las más utilizadas es la lectina de *Pisum sativum* acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), lectina dimérica con alta afinidad por α -D-manosa y α -D-glucosa, reconociendo así varias proteínas glicosiladas presentes en el acrosoma. La desventaja de esta metodología es que se realiza en espermatozoides fijados después de exponerlos al agonista de interés, lo cual impide el seguimiento dinámico de este proceso (37).

Para el estudio de la RA en tiempo real, el empleo de estrategias transgénicas es una gran ventaja, pero esto no es posible en humanos. Sin embargo, existen dos trabajos donde siguieron exitosamente la RA en tiempo real en espermatozoides de humano, en uno de ellos usaron marcadores específicos para dos componentes diferentes del acrosoma (38), y en el otro monitorearon en tiempo real la fluorescencia de FITC-PSA (39).

La RA se considera como un evento excitotico que comparte algunos mecanismos moleculares con la exocitosis observada en células somáticas (40). La familia de los colorantes FM tiene propiedades para rastrear la dinámica de la membrana plasmática durante la exocitosis y endocitosis en células somáticas (41-44). En un trabajo de nuestro laboratorio se demostró que FM4-64 marca exitosamente la membrana

plasmática de los espermatozoides y que su fluorescencia aumenta en la región del acrosoma una vez que se induce la RA (45), este aumento en la fluorescencia se debe posiblemente a que este indicador fluorescente se une a la membrana acrosomal interna, que se expone y mantiene durante la RA, pudiendo considerarla como equivalente a una vesícula de secreción en células somáticas. Además, este aumento en la fluorescencia correlaciona con el inicio de la tinción de FITC-PSA del acrosoma, sugiriendo que FM4-64 es capaz de detectar el comienzo de la RA. Adicionalmente, FM4-64 reveló la presencia de estructuras similares a apéndices emergiendo de diferentes áreas de la cabeza del espermatozoide las cuales se observaron después del inicio de la RA, y la presencia de estas estructuras se corroboró mediante microscopia electrónica de barrido (45). En relación a esto, existe un trabajo donde reportan la presencia de filamentos muy parecidos a estos apéndices, los cuales emergen de la cabeza de espermatozoides de cerdo y los observan embebidos en la ZP (46), lo cual sugiere que estas estructuras podrían tener un papel fisiológico durante la interacción óvulo-espermatozoide que sería importante investigar.

Todos los inductores fisiológicos de la RA que se han estudiado comparten el requerimiento de un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Por lo cual, para conocer exactamente el papel fisiológico de cada uno de los inductores de la RA, es importante conocer si la dinámica de movilización de Ca^{2+} , así como también si las vías de entrada de Ca^{2+} son compartidas o participan canales y/o transportadores distintos. Con respecto a esto, el desarrollo de estrategias que permitan la determinación de la dinámica del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la evolución de la RA de manera simultánea constituyen una herramienta muy importante, sobre todo ahora que es importante reevaluar la importancia de otros inductores diferentes a la ZP3. En este sentido, se han realizado algunas aproximaciones en espermatozoides bovinos y humanos, estos se fijan al final de los registros de $[Ca^{2+}]_i$ para determinar los porcentajes de RA utilizando FITC-PSA (47-49). Con lo que fue posible determinar únicamente la dinámica de los flujos de Ca^{2+} pero no la dinámica de la RA.

Existe solo un estudio donde registran simultáneamente los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y la RA en espermatozoides de humano utilizando al Fluo 3 como indicador de ambos parámetros (50) sin embargo no lograron encontrar una relación entre estos dos parámetros. Por lo cual sería muy interesante retomar la idea y estudiar la dinámica de estos dos eventos con indicadores distintos para cada proceso, haciendo los registros en células vivas y en las condiciones más parecidas a como sucede este proceso fisiológicamente y de esta manera poder determinar si existe alguna relación entre estos dos procesos.

2.3. Importancia del pH en la fecundación

El éxito de la fecundación depende de varios procesos biológicos que se llevan a cabo en el oviducto algunas horas antes de que se encuentren el óvulo y el espermatozoide en el ámpula, dichos procesos afectan el estado fisiológico de ambos gametos. La mayoría de lo que se sabe acerca de los eventos de señalización que controlan la capacitación se ha obtenido de experimentos *in vitro*, donde se intenta mimetizar el ambiente oviductal. Sin embargo, el pH y la composición del medio utilizado para promover este proceso es diferente dependiendo del laboratorio que realice el estudio (51-54).

2.3.1. Mecanismos de regulación del pH_i

La regulación del pH_i y pH_e es muy importante, debido a que se sabe que durante los procesos metabólicos de las células de mamífero se produce acidificación intracelular y además el pH_i debe estar finamente regulado, ya que los procesos bioquímicos se llevan a cabo dentro de un rango óptimo de pH; de hecho,

muchas funciones celulares (actividad de enzimas, expresión de genes, la actividad de canales y transportadores de membrana) dependen de este parámetro (55).

Además de los transportadores de H^+ que participan en la regulación del pH_i , este también se regula a través del sistema CO_2/HCO_3^- : el CO_2 difunde libremente a través de la membrana plasmática pero HCO_3^- es un anión impermeable, requiriendo proteínas transportadoras para su movimiento a través de la membrana. Las proteínas que transportan HCO_3^- a través de la membrana están agrupadas en tres familias de genes distintas: los transportadores clásicos Cl^-/HCO_3^- (familia AE), cotransportadores Na^+/HCO_3^- (familia NBC) y los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- (familia SLC26) (56). La familia SLC26 lleva a cabo el intercambio Cl^-/HCO_3^- , en algunos casos a través de un mecanismo electrogénico. Existen cinco diferentes intercambiadores en esta familia (57). Adicionalmente se sabe que HCO_3^- puede ser transportado a través de los canales de Cl^- CFTR (58).

2.3.2. Papel del pH en la fisiología del espermatozoide

En el caso particular de los espermatozoides se sabe que su actividad está fuertemente relacionada con los niveles de HCO_3^- y los valores de pH_i . En este sentido, se sabe que la regulación del pH_i participa de manera muy importante en la movilidad, la capacitación y la RA (59-62). Sin embargo, se desconocen los mecanismos exactos por los que, cambios en el pH_i regulan estas funciones.

Se han propuesto varios mecanismos involucrados en la regulación del pH_i en espermatozoides, estos podrían diferir dependiendo de la especie. Por ejemplo, se ha reportado la presencia de un cotransportador Na^+/HCO_3^- electrogénico en espermatozoides de ratón (63). Adicionalmente, los espermatozoides de ratón poseen un intercambiador Na^+/H^+ (sNHE) regulado por AMPc cuya ausencia produce defectos en la movilidad y como consecuencia infertilidad masculina, de manera interesante este fenotipo se puede rescatar parcialmente al agregar análogos de AMPc (64). El papel de sNHE en la regulación del pH se cuestiona porque espermatozoides del ratón nulo para sNHE y del ratón silvestre exhiben un pH_i similar en condiciones basales y después de la alcalinización artificial (64). Este intercambiador está presente en espermatozoides de humano, pero la comparación de secuencia, a nivel de proteína, reveló ciertas diferencias en los aminoácidos que forman el motivo de unión a AMPc, lo cual podría resultar en diferencias en la regulación entre especies.

Por otro lado, los espermatozoides de humano expresan un canal de H^+ cuya actividad aumenta en espermatozoides capacitados (65), sugiriendo que la actividad de este canal se relaciona con la regulación del pH_i en estas células. Sin embargo, experimentos de patch clamp con espermatozoides epididimales de ratón revelaron corrientes de H^+ muy pequeñas comparadas con las de humano (65), y por tanto es concebible que diferentes mecanismos de regulación del pH_i se hayan desarrollado entre las diferentes especies.

De manera interesante existen dos canales iónicos esenciales, cuya ausencia provoca esterilidad masculina, que se regulan positivamente por alcalinización del pH_i : el Slo3 que permea K^+ y el CatSper que permea Ca^{2+} , los cuales se han registrado electrofisiológicamente en espermatozoides (66). Con respecto a CatSper, datos de nuestro laboratorio muestran que la actividad de este canal, al ser estimulado por dos de sus activadores fisiológicos (progesterona y PGE), se regula de manera diferencial dependiendo del pH al cual se realicen los experimentos, potenciándose su actividad cuando el pH extracelular es más alcalino

(7.6-8). Esto debido posiblemente a la concomitante alcalinización del pH_i . Dicha potenciación es relevante desde el punto de vista fisiológico ya que se sabe que el pH del lumen del oviducto, en varias especies de mamífero, aumenta desde 7.1 hasta 8, estos cambios están asociados con la ovulación y de manera interesante el pH más alcalino corresponde al sitio donde ocurre la fecundación (el ámpula). Mientras que el pH del fluido cervical, correspondiente a las primeras regiones con las que entran en contacto los espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino es de alrededor de 6 y 6.5 (67, 68).

2.4. Oscilaciones de Ca^{2+}

El Ca^{2+} es el catión mayormente involucrado en la transducción de señales (69, 70). Este catión se encuentra a una concentración citosólica en reposo de $\sim 10^{-7}$ M, y a una concentración extracelular de $\sim 10^{-3}$ M. Dada esta concentración diferencial se pueden generar flujos de Ca^{2+} que pueden detectarse de manera precisa, incluso si son pequeños aumentos en el Ca^{2+} citoplasmático. Estos flujos se producen a través de proteínas de la membrana plasmática o a través de la liberación mediada por canales localizados en compartimentos intracelulares. Niveles elevados y sostenidos de Ca^{2+} en el citoplasma son tóxicos para la célula y pueden resultar en muerte celular a través de necrosis o apoptosis. Por lo cual las células han desarrollado mecanismos de transporte que rápidamente restablecen la concentración de Ca^{2+} citosólico a niveles basales (revisado en 71).

La baja concentración basal citosólica de Ca^{2+} se mantiene en equilibrio a través de un delicado balance entre la entrada y salida de Ca^{2+} . Sin embargo, este equilibrio puede perturbarse de muchas maneras causando que entren más iones Ca^{2+} a la célula con respecto a los que son eliminados. Diferentes mecanismos tratan de restaurar rápidamente la baja concentración citosólica de Ca^{2+} . Si esta función se realiza con éxito, se genera una señal transitoria de Ca^{2+} , pero si no, la alta concentración de Ca^{2+} conducirá a la célula a apoptosis o necrosis (revisado en 71).

Bajo ciertas condiciones, cuando los sistemas regulatorios se perturban, la célula solo restaura parcialmente los niveles basales de Ca^{2+} . La incapacidad de las células para regular y mantener la concentración baja de Ca^{2+} en estado basal dará como resultado trenes periódicos de transitorios de Ca^{2+} . Esta señal oscilatoria se genera mediante la acción concertada de distintos transportadores de Ca^{2+} y puede tener grandes variaciones espaciales y temporales dependiendo del tipo de estímulo y del contexto celular. Si la concentración intracelular de Ca^{2+} permanece perturbada, diferentes programas de transcripción se activan para ajustar la maquinaria regulatoria de Ca^{2+} y controlar así los niveles de Ca^{2+} citosólico (revisado en 71).

A pesar de todos los reportes referentes a las oscilaciones de Ca^{2+} no se ha elucidado un mecanismo unificado generador de la respuesta oscilatoria. Tampoco está claro cómo se establece la frecuencia de la señal oscilatoria. Sin embargo hay demostraciones de mecanismos celulares que alteran la frecuencia de la señal oscilatoria (72-75).

2.4.1. Mecanismos de aumento de Ca^{2+}

La señal oscilatoria se inicia cuando el equilibrio en los niveles basales citosólicos de Ca^{2+} se perturban de alguna manera. Esto puede ocurrir cuando la célula percibe un estímulo extracelular que resulta en la activación de canales que transportan Ca^{2+} hacia el citoplasma. Tales canales están localizados ya sea en la membrana plasmática o en la membrana de reservorios intracelulares, retículo endoplásmico/retículo sarcoplásmico (RE/RS). La naturaleza del estímulo perturbador es diverso, incluyendo alteraciones del potencial de membrana, interacciones célula-célula, y sustancias extracelulares que se unen a receptores

específicos. Entre los mecanismos generadores de las oscilaciones de Ca^{2+} se incluyen la activación de: los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (76), de los receptores purinérgicos ionotrópicos (P2XR) y metabotrópicos (P2YR) (77), de los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) (78) y de la activación de los receptores de tirosina cinasa (RTKs) (75).

El Ca^{2+} citosólico también puede aumentar con la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares RE/RS, cuya liberación ocurre principalmente a través de receptores de inositol trifosfato (IP_3Rs) y receptores de rianodina (RyR) (Revisado en 71).

El IP_3R es un canal liberador de Ca^{2+} ubicuo de reservorios intracelulares que desempeña un papel importante en la señalización de Ca^{2+} citosólica, tanto en células excitables como no excitables. La unión de un ligando a receptores metabotrópicos, tales como P2YR, mAChR o RTKs conduce a la activación de la fosfolipasa C (PLC) la cual cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) para producir IP_3 y diacilglicerol (Revisado en 71). Cuando el IP_3 se une a su receptor causa un cambio conformacional que abre el canal permitiendo el flujo de Ca^{2+} hacia el citoplasma. Existen 3 subtipos de IP_3R con patrones de expresión dependiente del tipo celular y con diferente afinidad por IP_3 , Ca^{2+} y nucleótidos (79, 80). Se requiere tanto IP_3 como Ca^{2+} para abrir los IP_3R . Dependiendo del contexto celular, los IP_3R pueden responder a Ca^{2+} en forma de campana (81, 82), una propiedad crucial para la activación de una onda regenerativa. El IP_3R también puede fosforilarse por múltiples cinasas (80), modulando sus propiedades y además seguir ajustando las señales oscilatorias. Por otro lado se sabe que la unión del IP_3 a su receptor es dependiente de pH, presentando mayor afinidad cuando el pH se alcaliniza (83).

Los RyR constituyen un canal de liberación de Ca^{2+} intracelular crítico en todas las células excitables (84). En células musculares conduce el proceso esencial del acoplamiento excitación-contracción. La principal activación de los RyR es por el mismo Ca^{2+} , con una K_d en el rango 10^{-9} M. Aunque también el exceso de Ca^{2+} tiene un efecto inhibitorio (71). La ADPribosa cíclica es un segundo mensajero, que activa los RyR, mientras que la unión de cafeína y rianodina modula la liberación de Ca^{2+} a través de un mecanismo molecular diferente (69, 84).

Un mecanismo generalmente aceptado en la generación de oscilaciones de Ca^{2+} es la retroalimentación positiva de Ca^{2+} en un proceso llamado liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (CICR) (69, 70, 85). Este mecanismo de retroalimentación amplifica la señal y actúa tanto en IP_3R como en RyR.

Sin embargo, cuando los niveles citosólicos de Ca^{2+} aumenta arriba de 10^{-5} M a 10^{-6} M, la unión de iones de Ca^{2+} a sitios inhibitorios bloquea la liberación de Ca^{2+} a través de IP_3R y RyR.

Cuando los reservorios de Ca^{2+} se vacían, se activa un mecanismo llamado entrada de Ca^{2+} operada por reservorios intracelulares (SOC) (86). La entrada SOC se encuentra principalmente en células no excitables y está regulada por las proteínas STIM1 y Orai1. Las proteínas STIM1, localizadas en la membrana de ER, detectan el vaciamiento de ER y con esto se activa la entrada SOC a través del canal Orai1 localizado en la membrana plasmática (71).

2.4.2. Mecanismos de disminución de Ca^{2+}

El exceso de Ca^{2+} se bombea hacia los reservorios RE/RS vía la SERCA (Ca^{2+} -ATPasa) o se remueve de la célula a través de la Ca^{2+} -ATPasas (PMCA). El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), dependiendo del gradiente iónico, también puede transportar Ca^{2+} al exterior de la célula. Adicionalmente a estos mecanismos, el uniportador mitocondrial actúa disminuyendo rápidamente el exceso de Ca^{2+} citosólico (71). Los mecanismos de bombeo se activan a diferentes concentraciones de Ca^{2+} citosólico y tienen diferentes tasas de transporte. La SERCA y la PMCA tienen alta afinidad y bajas tasas de transporte mientras que el

uniportador mitocondrial y el NCX tiene baja afinidad y altas tasas de transporte (69). De esta manera las células son capaces de expresar varias combinaciones de estas bombas de Ca^{2+} que se adaptan a sus necesidades específicas de señalización de Ca^{2+} .

Existen varias proteínas dentro de las células que regulan temporal y espacialmente las señales oscilatorias de Ca^{2+} . El genoma humano codifica ~200 proteínas de unión a Ca^{2+} diferentes (70). Tales proteínas, como la paralbumina, calbindina y calreticulina tienen diferentes capacidades amortiguadoras como también patrones de expresión celular, con lo cual contribuyen en la regulación de la concentración citosólica de Ca^{2+} (69). Los sitios de unión de estas proteínas empiezan a ocuparse durante la fase de aumento citosólico del transitorio de Ca^{2+} .

2.4.3. Decodificación de las oscilaciones de Ca^{2+}

Cuando una señal de Ca^{2+} se propaga a través del citoplasma, varios sensores de Ca^{2+} pueden traducir la señal en respuestas celulares. La modulación de la frecuencia y la amplitud se utilizan para codificar la señal que contiene la información (87). Se han propuesto una serie de proteínas como codificadores de las oscilaciones de Ca^{2+} , de las cuales la calmodulina (CaM) ha sido la más estudiada (88). La CaM es una proteína de 17 kDa con forma de mancuerna expresada ubicuamente. Cada uno de sus extremos globulares contiene dos manos EF conectadas por una α hélice flexible (88). El Ca^{2+} se une a la CaM con una K_d de alrededor de 10^{-6} M, haciéndola un sensor ideal de Ca^{2+} . Al unirse el Ca^{2+} , la CaM experimenta un cambio conformacional, exponiendo residuos hidrofóbicos que facilitan la interacción del complejo Ca^{2+} /CaM con numerosas proteínas blanco, de este modo regula su funcionamiento (89). Los blancos de Ca^{2+} /CaM incluyen varios canales iónicos (en particular IP_3R y RyR) bombas, factores de transcripción, y varias enzimas. Entre las proteínas de señalización blanco reguladas por Ca^{2+} /CaM se encuentran una familia de proteínas cinasa Ser/Thr conocidas como CaM-cinasas (CaMKs), de las cuales la CaMKII se ha propuesto como un decodificador de las oscilaciones de Ca^{2+} (90). Las bases bioquímicas detrás de los mecanismos de decodificación aún no se entienden por completo. Sin embargo, la autofosforilación de CaMKII tiene lugar solo si la magnitud de la duración del aumento en la señal de Ca^{2+} es el adecuado. La autofosforilación ocurre si dos moléculas Ca^{2+} /CaM se unen a dos subunidades de la misma enzima, primero una se une a una subunidad dada y la activa, mientras que la segunda se une a una subunidad vecina, causando un cambio conformacional que hace disponible al residuo Thr286 para su fosforilación. Cuando la CaMKII se fosforila permanece activa por varios minutos incluso después de que la concentración de Ca^{2+} citosólico regresa a su nivel basal. Si el siguiente aumento en la señal oscilatoria se activa antes de que todas las CaMKII se defosforilen, se consigue un efecto acumulativo dependiente de frecuencia. De esta manera, la CaMKII puede integrar los transitorios de Ca^{2+} a través del tiempo en una señal de Ca^{2+} oscilatoria, siempre que ellas caigan dentro de la ventana de tiempo para la defosforilación de las cinasa. Estas propiedades le brindan a la CaMKII la capacidad de decodificar las frecuencias de las oscilaciones de Ca^{2+} (71).

2.4.4. Procesos biológicos regulados por oscilaciones de Ca^{2+}

Existen muchos reportes que demuestran que las oscilaciones de Ca^{2+} citosólicas activan distintos procesos biológicos. Entre los que se encuentran la secreción de insulina (72, 91), el crecimiento celular (92), la expresión de genes (75), la producción de interleucinas (93), la hipertrofia (94), la filtración glomerular (95),

el crecimiento de dendritas (96) y la fecundación, (97). Este último proceso es el más espectacular y el más estudiado en extenso, dicho proceso inicia cuando el espermatozoide interactúa con el ovulo, disparando oscilaciones de Ca^{2+} que continúan por varias horas (97). Los espermatozoides le proporcionan la PLC_ζ al ovulo, con lo que se estimula la producción de IP_3 que activara a los IP_3R (98). Las oscilaciones de Ca^{2+} resultantes disparan el programa del desarrollo al activar la maquinaria enzimática involucrada en la división celular. Después de eso una señal transitoria de Ca^{2+} dispara la división de una célula para formar las dos células hijas.

2.4.5. Papel de las oscilaciones de Ca^{2+} en la fisiología de los espermatozoides de humano

En el caso de espermatozoides de humano se han observado oscilaciones de Ca^{2+} en respuesta a progesterona (99) en el 10% de las células analizadas, de manera interesante al aplicar gradientes de progesterona (0-3 μM) el porcentaje de células que presentan este comportamiento aumenta a 40%, siendo dosis dependiente. Al analizar la repercusión de estas oscilaciones sobre la movilidad se mostró que este comportamiento modulaba el batido flagelar del espermatozoide, un efecto que podría tener gran importancia para la penetración de las capas que recubren al ovulo, previo a la fecundación (100).

Por otro lado, estudios en los que fue posible el monitoreo simultáneo de la RA y la movilización de Ca^{2+} , revelaron que ~30% de los espermatozoides mostraban oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas y que interesantemente este comportamiento correlacionaba con la ausencia de RA, sugiriéndolas como un mecanismo para prevenir la RA en un momento inadecuado (45). Sin embargo, en este último trabajo no se caracterizaron con detalle las oscilaciones de Ca^{2+} , dejando abierto un campo interesante a investigar. Además, el realizar estudios simultáneos de movilización de Ca^{2+} y RA en las condiciones de pH semejantes a las que se enfrentan los espermatozoides de manera fisiológica desde que ingresan al tracto genital femenino hasta que llegan al sitio de fecundación contribuirá significativamente al entendimiento de la RA.

3. HIPÓTESIS

El pH_e mantenido durante la capacitación regula la reacción acrosomal mediante la modulación de las oscilaciones de Ca^{2+} en los espermatozoides.

4. OBJETIVO GENERAL

- Investigar el efecto de capacitar a los espermatozoides de humano en distintos pH_e s sobre la reacción acrosomal y la movilización de Ca^{2+} mediados por Progesterona, Prostaglandina E1 y GABA.

4.1. Objetivos particulares

- Determinar la repercusión que tiene el pH_e mantenido durante la capacitación sobre distintos parámetros marcadores de capacitación.

- ✎ Estudiar el efecto del pH_e mantenido durante la capacitación sobre los porcentajes de RA y la movilización de Ca^{2+} mediados por Progesterona, Prostaglandina E1 y GABA.
- ✎ Analizar detalladamente las oscilaciones de Ca^{2+} y estudiar su farmacología así como también su repercusión en la RA.

5. METODOLOGÍA

5.1. Nado hacia arriba (swim-up) y capacitación

Las muestras de semen se obtuvieron de donadores sanos, que cumplen con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud para un individuo fértil (101), mediante masturbación después de 48 horas de abstinencia sexual. Cada muestra se colecta dentro de un frasco estéril de plástico, y se incuba en una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO_2 durante ~30 minutos, promoviendo así la licuefacción de la muestra.

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 de registro (MR: en mM: NaCl 94, KCl 4, $NaHCO_3$ 25, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 2, HEPES 30, D-Glucosa 5, piruvato de sodio 1, ácido láctico 10; el pH se ajusta a 6.5, 7.4 u 8), 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 CO_2 . Posteriormente las células móviles se recuperan tomando los 750 μ l superiores de la fase de MR. Finalmente se cuentan las células con una cámara de Makler y se ajusta la concentración de espermatozoides requerida (10×10^6 /ml).

Los espermatozoides móviles recuperados se incuban en medio no capacitante (MR sin $NaHCO_3$) o en medio capacitante (MR más 5 mg/ml de BSA) durante 6 horas en una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO_2 . El pH de cada medio varió de acuerdo a las condiciones del experimento: 6.5, 7.4 u 8). Al finalizar el tiempo de capacitación se toma el número de espermatozoides requeridos para cada experimento.

5.2. Análisis de los parámetros marcadores de capacitación

5.2.1. Medición del Ca^{2+}_i mediante citometría de flujo

Los cambios en el Ca^{2+}_i se monitorearon usando Fluo-3 AM. Al terminar el swim up o después de 6 horas (T6) de incubar a los espermatozoides en medio capacitante o no capacitante a diferentes pHs (6.5, 7.4 y 8.0) se centrifugaron a 750 g por 5 minutos. Los espermatozoides se resuspenden en MR del pH respectivo y se ajusta a una concentración de 4×10^6 cells/mL. Posteriormente los espermatozoides se cargan con el indicador fluorescente al incubarlos con 1 μ M de Fluo-3 AM durante 30 minutos a 37°C. Para cada condición experimental, se colocaron 500 μ L de una suspensión de células en un tubo para citómetro y se agregó 50 nM de ioduro de propidio (IP, indicador de viabilidad) previo a la colección de los datos. Los datos de Forward scatter (FSC) y side scatter (SSC) se adquirieron de 20 000 eventos por muestra usando un citómetro FACSCanto II™ (Becton Dickinson). Se seleccionaron los filtros apropiados para Fluo 3 e IP. Los niveles del umbral para FSC y SSC se ajustaron para excluir señales de restos celulares.

5.2.2. Análisis de la movilidad

La medición de la movilidad de los espermatozoides se realizó en el equipo *Sperm Class Analyzer*. Los parámetros de movilidad: Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad lineal (VSL), Velocidad media (VAP), Índice de linealidad (LIN): VSL/VCL, Índice de rectitud (STR): VSL/VAP, Índice de oscilación: WOB, wobble: bamboleo: VAP/VCL, Amplitud lateral de la cabeza (ALH) y Frecuencia de batido (BCF) de por lo menos 200 células por condición se calcularon por el software *SCA motility* de un conjunto de imágenes adquiridas a 50 Hz y con un objetivo 10X.

Del conjunto de parámetros de movilidad obtenidos se consideraron hiperactivados aquellos que cuya VCL fuera ≥ 150 m/s, LIN $\leq 50\%$ y ALH ≥ 7 μm (102).

5.2.3. Análisis del patrón de fosforilación de proteínas en tirosinas

Extracción de proteínas. Al término del swim up (T1) o después de 6 horas (T6) de incubación en medio capacitante a diferentes pH_{es} (6.5, 7.4 y 8.0) se lavan 3×10^6 espermatozoides con MR, centrifugando dos veces a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las proteínas totales se solubilizan con buffer Laemmli (Tris-HCl 0.0125 M pH 6.5, SDS 2%, glicerol 10%) hirviendo durante 5 minutos. Enseguida se centrifuga a 13000 g durante 2 minutos, después de esto se recupera el sobrenadante y se agrega 5% p/v β -mercaptoetanol y 0.0005% de azul de bromofenol. Finalmente se hierven las muestras durante 5 minutos para después separarlas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE 10%.

Posterior a la electroforesis, las proteínas se transfieren a membranas de PVDF, esta se bloquea con leche al 5% en TBS con 0.05% de Tween-20 (TBS-T: Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Tritón X-100 0.05%). La membrana se mantuvo en agitación constante a 4 °C durante toda la noche, con una dilución 1:1000 del anticuerpo primario anti-residuos de tirosina fosforilados en leche al 5% o anti-tubulina 1:1000. Posteriormente se utiliza una dilución 1:5000 del anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) en TBS-T y finalmente la señal del anticuerpo secundario se detecta mediante quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico, Pierce No. 34080; siguiendo las indicaciones del proveedor) al exponer la membrana a una placa fotográfica.

Los resultados se analizaron mediante densitometría utilizando el software Image J (National Institutes of Health, <http://rsbweb.nih.gov>).

5.3. Medición simultánea de RA y $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en célula única

Para el registro simultáneo de la RA y $[\text{Ca}^{2+}]_i$, las células previamente capacitadas se incuban con el colorante sensible a Ca^{2+} Fluo-3 AM 2 μM durante 30 minutos, después de esto, los espermatozoides se centrifugan, lavan e incuban en MR (pH: 6.5, 7.4 y 8) conteniendo 10 μM de FM4-64 (durante 5 min), este último colorante estará presente en el medio extracelular a lo largo de todo el registro. Para estos experimentos, los espermatozoides se adhieren de la cabeza a cubreobjetos cubiertos con poly-L-lysine 0.03 % (w/v). 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 Olympus IX71 (Olympus Corporation, Tokyo, Japón). El suministro de la iluminación está mediado por Luxeon V Star

Lambertian Blue 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). El intercambio entre los filtros de emisión se realizó con una rueda de filtros (LAMBDA 10-2, Sutter instrument CO, USA). Cada par de imágenes se colecta cada 10 segundos (con un retraso de 400 milisegundos entre cada una) usando el programa IQ (Andor Bioimaging, Morrisville, NC, USA) y utilizando un objetivo Olympus 60X/1.42 AN (apertura numérica) (aceite) durante 40 minutos. Los compuestos se agregaron manualmente con una pipeta a los tiempos indicados en cada experimento. En los casos indicados se agregó ionomicina y $MnCl_2$ al final de cada registro para normalizar las respuestas.

El análisis de las imágenes se realiza utilizando los programas Microsoft Excel e Image J (National Institutes of Health, <http://rsbweb.nih.gov>). Los valores de intensidad promedio de fluorescencia obtenidos de la cabeza de los espermatozoides se normalizaron utilizando la ecuación $(F-F_{Mn})/(F_{max}-F_{Mn})$, donde F= intensidad de fluorescencia medida en un tiempo dado, F_{max} = intensidad máxima de fluorescencia obtenida después de agregar 10 μM de ionomicina, y F_{Mn} = intensidad mínima de fluorescencia obtenida después de agregar 5 mM de $MnCl_2$, estos valores se graficaron contra el tiempo. En los casos donde no se agregan estos compuestos o no se observó respuesta a ellos se utilizó la siguiente ecuación para normalizar las respuestas: $(F/F_0)-1$, donde F es la intensidad de fluorescencia al tiempo t y F_0 es la intensidad de fluorescencia inicial antes de cualquier adición y los valores se grafican contra el tiempo.

5.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm SEM de al menos cinco experimentos independientes. Las comparaciones entre el porcentaje de espermatozoides que experimentan la RA, el porcentaje de espermatozoides que presentan oscilaciones de Ca^{2+} , así como las características de estas oscilaciones (frecuencia-amplitud-altura), se analizaron mediante una prueba de comparación múltiple, seguida de la prueba posterior Tukey- Kramer. Para el análisis intraensayo de los efectos del inhibidor sobre las oscilaciones de Ca^{2+} , se empleó una prueba t de student pareada. Los valores se consideraron significativamente diferentes con valores de $P \leq 0.05$ (*), $P \leq 0.01$ (**) y $P \leq 0.001$ (***).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. El pH_e afecta el estado de capacitación de los espermatozoides

Debido a que el estado de capacitación está directamente relacionado con el desencadenamiento de la RA decidimos evaluar que tan capacitados se encontraban los espermatozoides en las distintas condiciones de capacitación (diferentes pH_e s), las cuales asemejan aquellas encontradas por los espermatozoides desde su ingreso al tracto reproductor femenino (pH 6.5) hasta el sitio donde ocurre la fecundación (8.0). Esto es muy importante ya que aunque están bien definidos los cambios que ocurren durante la capacitación en distintos parámetros marcadores de este proceso, se desconoce si estos se alteran al modificar el pH del medio capacitante ya que todos los estudios se han realizado en un medio con pH 7.4. Además esto cobra relevancia al no estar del todo claro si este proceso ocurre en una región en particular del tracto reproductor femenino o si es un proceso gradual que se va adquiriendo a lo largo del trayecto que recorren los espermatozoides para encontrar al ovulo.

Dado que la capacitación es un proceso complejo que involucra una gran variedad de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos no existe un método único y certero que permita la determinación del estado de capacitación de los espermatozoides, por lo cual decidimos evaluar diferentes procesos que se han utilizado como marcadores de capacitación, estos son: aumento en la $[\text{Ca}^{+2}]_i$, hiperactivación y fosforilación de proteínas en tirosinas en espermatozoides incubados en medios con pH_e 6.5, 7.4 u 8.0.

6.1.1. El aumento en la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ de los espermatozoides es mayor cuando la capacitación se lleva a cabo a pH_e 8.0.

Se sabe que la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ aumenta con la capacitación (10). Para que la capacitación se lleve a cabo, además de requerir de los tres elementos indispensables (Ca^{2+} , HCO_3^- y BSA) para mimetizar el ambiente del oviducto (12) se requiere cierto tiempo de incubación en estas condiciones. En el caso de los espermatozoides de humanos se ha determinado que se requieren al menos 6 horas de incubación en un medio con estos tres componentes (103).

Con base en esto realizamos las mediciones de la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ mediante citometría de flujo utilizando el colorante fluorescente sensible a Ca^{2+} Fluo-3 AM. Además de realizar las mediciones en condiciones capacitantes (CAP) incluimos una condición no capacitante (NC), en donde los espermatozoides se incuban en un medio sin BSA ni bicarbonato. La $[\text{Ca}^{+2}]_i$ se evaluó a dos tiempos, saliendo del swim up (NC1 y CAP1) y después de 6 horas de incubación en medio no capacitante o capacitante (NC6 y CAP 6). Los resultados se muestran en la figura 1.

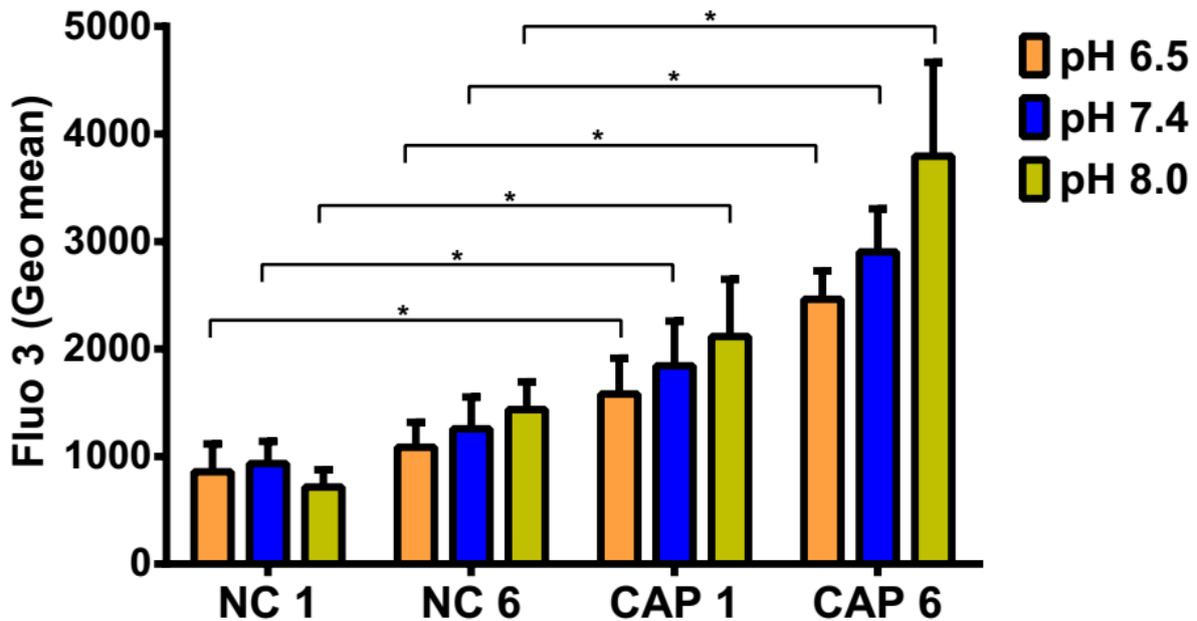


Figura 1. La $[Ca^{+2}]_i$ de los espermatozoides es mayor cuando se capacitan a pH_e 8.0. En las gráficas se muestra la intensidad promedio de fluorescencia de Fluo 3 (Geo mean) para cada condición (no capacitados saliendo del swim up (NC1), después de 6 horas de incubación en medio no capacitante (NC6); espermatozoides capacitados saliendo del swim up (CAP1) y después de 6 horas de incubación en capacitante (CAP6)) a los tres diferentes pH_es 6.5, 7.4 y 8.0. Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). (n=5). Se realizaron pruebas de t-student pareadas para comparar el cambio en la fluorescencia de Fluo 3, indicador de Ca^{+2} al T1 con respecto al T6. Se indican las diferencias que resultaron significativas con valores de $p \leq 0.05$ (*).

Al graficar las intensidades medias de fluorescencia, aunque las diferencias no resultaron significativas, es claro que hay una tendencia a que la $[Ca^{+2}]_i$ sea mayor conforme aumenta el pH_e al que se exponen los espermatozoides, observándose los mayores aumentos cuando los espermatozoides se capacitan en pH_e 8.0, lo cual sugeriría que a este pH_e los espermatozoides están más capacitados. Los altos niveles en la $[Ca^{+2}]_i$ observados en espermatozoides capacitados a pH_e 8 concuerdan perfectamente con el hecho de que CatSper se activa con pHs alcalinos, sugiriendo que dicho aumento podría estar mediado por la actividad de este canal.

Por otro lado, es importante mencionar que observamos que conforme se capacitan los espermatozoides aumenta la $[Ca^{+2}]_i$, tal como se ha reportado previamente y de manera interesante este fenómeno lo observamos en cualquiera de los 3 pH_es de capacitación evaluados. Con esto confirmamos que en los tres pH_es los espermatozoides se capacitan, solo que el grado de capacitación es mayor conforme aumenta el pH del medio capacitante.

6.1.2. El porcentaje de espermatozoides hiperactivados aumenta cuando se exponen a pH_es alcalinos

La hiperactivación es un tipo de movilidad que les permite a los espermatozoides migrar a través del fluido viscoelástico del oviducto, despegarse del istmo, una región del oviducto considerada como un reservorio donde los espermatozoides pasan cierto tiempo adheridos hasta que adquieren este tipo de movilidad

indispensable para continuar su recorrido hacia el ovulo y atravesar la gruesa capa de células y la matriz glicoproteica que recubren al ovulo (5).

La movilidad hiperactivada es muy importante ya que los espermatozoides que son incapaces de desarrollar este tipo de movilidad son infértiles (104).

Evaluamos los distintos parámetros de movilidad en condiciones no capacitantes y capacitantes, empleando medios con pHs 6.5, 7.4 y 8.0. Además incluimos un inductor de hiperactivación 4-Aminopiridina (4-AP 2 mM) como control positivo (105). Se estudiaron dos condiciones no capacitantes, una sin BSA ni bicarbonato (NC1) y otra solo sin bicarbonato (NC2) y las mediciones se realizaron a dos tiempos, saliendo del swim up (T1) y después de 6 horas de incubación en el respectivo medio (T6).

Del conjunto de parámetros de movilidad obtenidos cuantificamos el porcentaje de espermatozoides hiperactivados (figura 2).

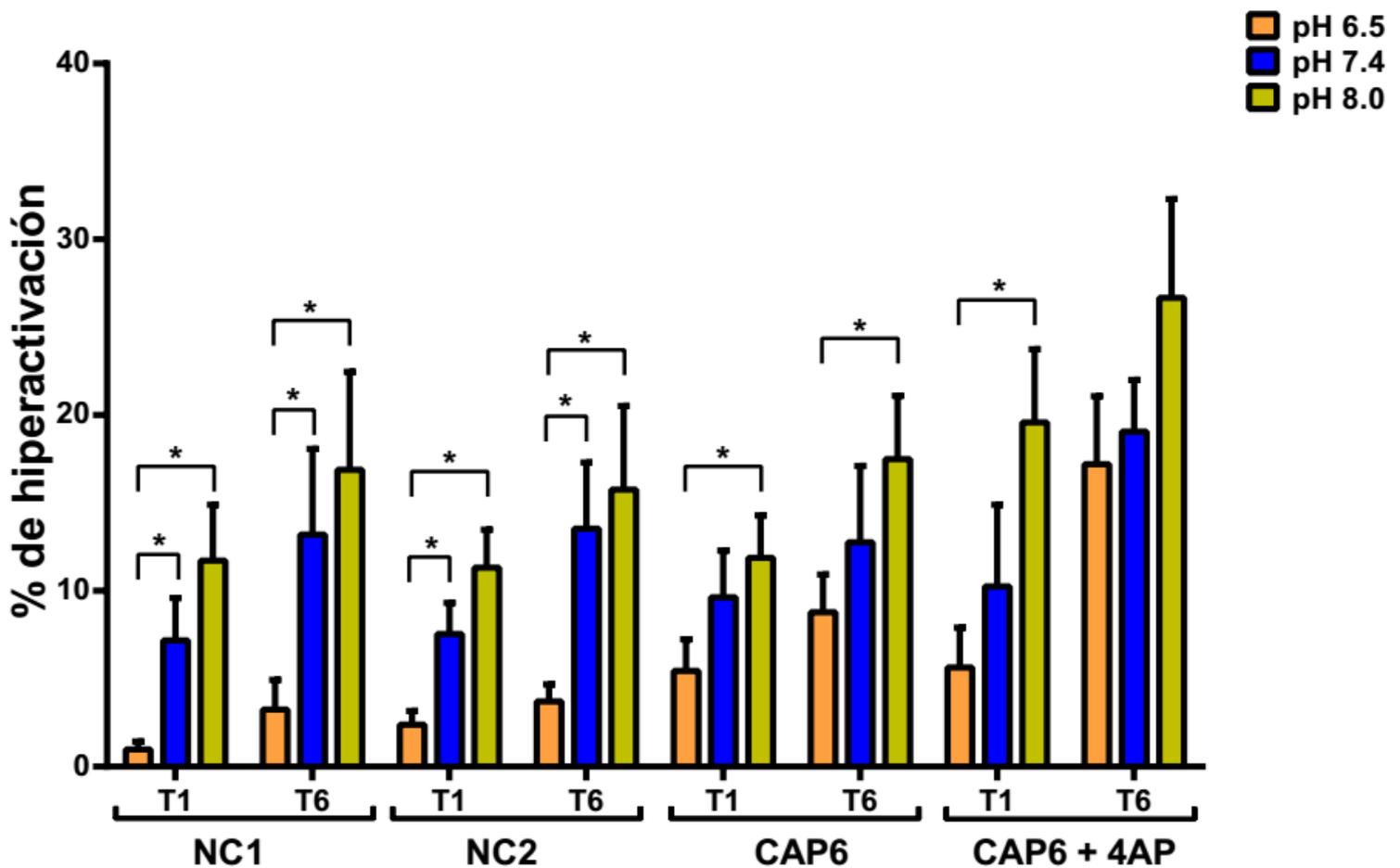


Figura 2. Los espermatozoides se hiperactivan mas en pH 8. En la gráfica se muestran los porcentajes de hiperactivación de espermatozoides capacitados (CAP) y no capacitados (NC1: medio sin BSA ni bicarbonato y NC2: medio sin BSA) a pHs: 6.5, 7.4 y 8.0 a diferentes tiempos: tiempo 1 (T1) saliendo del swim up y después de 6 horas de incubación en el respectivo medio (T6). Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.) n=5. La comparación entre los porcentajes de hiperactivación en los tres rangos de pH evaluados se realizó mediante una prueba de comparación múltiple y una post-prueba de Tukey-Kramer. Se indican las diferencias que resultaron significativas con valores de $p \leq 0.05$ (*).

Estos resultados muestran claramente que el mayor porcentaje de hiperactivación se presenta cuando los espermatozoides se incuban en medios con pH 7.4 u 8. Esto sucede en todas las condiciones tanto no capacitantes como capacitantes. Estos resultados nos sugieren que contrario a lo reportado, en nuestras condiciones experimentales, la adquisición de la movilidad hiperactivada no depende del proceso de capacitación, más bien parece completamente dependiente del pH_e del medio, al observarse porcentajes similares de hiperactivación tanto en condiciones capacitantes como no capacitantes y que dichos porcentajes únicamente se modifican conforme aumenta el pH_e .

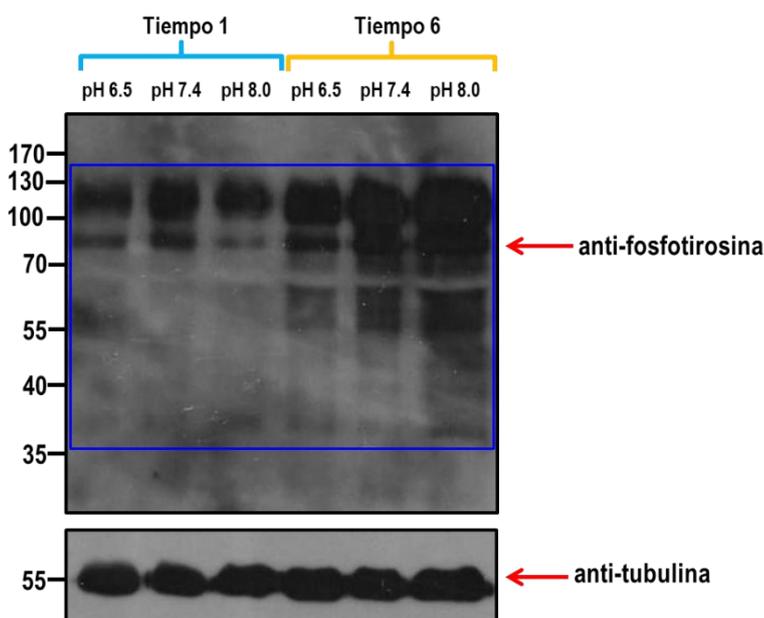
Por otro lado, el hecho de observarse los más altos porcentajes de hiperactivación al incubarse a los espermatozoides en medios con pH_e superiores a 7.4 concuerda con que la activación de CatSper es dependiente de alcalinización y que además este canal está implicado directamente en la regulación de la movilidad hiperactivada (104).

6.1.3. Los niveles de fosforilación de proteínas en tirosinas son mayores a pH_e s alcalinos

Se ha reportado que durante la capacitación se lleva a cabo la fosforilación de un conjunto de proteínas en tirosina (pTyr) de entre 40 y 120 kDa. Se propone que estas modificaciones en las proteínas son el producto de que los aumentos en la $[Ca^{+2}]_i$ y HCO_3^- estimulan una cascada de señalización que promueve un aumento en la actividad de la proteína cinasa A (PKA) con la consecuente fosforilación de proteínas en serina y treonina y posteriormente mediante un mecanismo no definido por completo se produce la pTyr (106). Con lo cual se sugiere que la pTyr tiene un papel importante ya sea, en controlar eventos que conducen a los espermatozoides al estado capacitado o a eventos que ocurren como una consecuencia final del proceso de maduración.

Nosotros analizamos el patrón de fosforilación de proteínas en tirosinas de espermatozoides que estuvieron expuestos a medio capacitante pH_e 6.5, 7.4 y 8.0, los resultados se muestran en la figura 3.

a)



b)

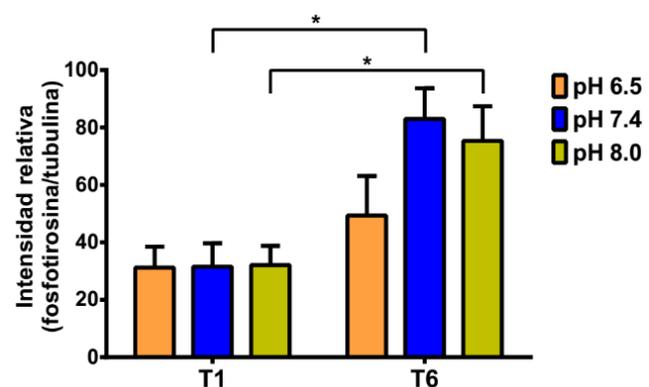


Figura 3. El pH_e afecta los niveles de fosforilación de proteínas en tirosinas y estos aumentan con el tiempo de capacitación. a) En cada carril se cargaron las proteínas solubilizadas de 3X10⁶ espermatozoides capacitados a pH_es: 6.5, 7.4, 8.0. Se muestra la fosforilación de proteínas en tirosinas a diferentes tiempos: tiempo 1 (T1) saliendo del swim up y después de 6 horas de incubar los espermatozoides en medio capacitante (T6). b) En la gráfica se muestra el análisis de la densitometría de las bandas observadas, se divide la intensidad de las bandas observadas (señaladas en el recuadro azul) entre la intensidad de la banda de tubulina utilizada como control de carga. Se muestra un experimento representativo. Los valores se presentan como promedio ± error estándar del promedio (S.E.M.). (n=6). Se realizaron pruebas de t-student pareadas para comparar el cambio en la intensidad de las bandas al T1 con respecto al T6. Se indican las diferencias que resultaron significativas con valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**).

Como se puede observar en esta figura, los niveles de fosforilación de proteínas en tirosinas aumentan conforme aumenta el pH del medio capacitante y también conforme aumenta el tiempo en que los espermatozoides están en contacto con dicho medio.

Con estos resultados mostramos que al ser más alcalino el pH del medio capacitante se provoca un aumento en los niveles de fosforilación de proteínas en tirosinas, siendo mayor el aumento a pH_es 7.4 y 8.0 después de 6 horas de capacitación. Con lo que se demuestra que un medio capacitante con pH 7.4 u 8.0 promueve de manera más eficiente la capacitación, esto solo si consideramos la fosforilación de proteínas en tirosinas como único marcador de capacitación.

Analizando los resultados obtenidos es claro que el pH_e mantenido durante el tiempo de capacitación es clave en la determinación del estado de madurez de los espermatozoides, ya que aunque en las tres condiciones de capacitación (medios con diferente pH_e) se observaron los marcadores de este proceso: aumento en la [Ca²⁺]_i, hiperactivación y fosforilación de proteínas en tirosinas, el aumento en estos parámetros fue mayor en condiciones de capacitación con pH_e superior a 7.4, lo cual sugiere que este proceso de maduración se lleva a cabo más eficientemente cuando los espermatozoides se capacitan en pH_es alcalinos, mientras que en pH_es ácidos el grado de capacitación es menor.

6.2. El pH_e mantenido durante la capacitación influencia la eficiencia de la RA

Con base en los resultados que nos indicaban que el grado de capacitación depende del pH_e mantenido durante la capacitación y que la RA es otro proceso que depende del estado de madurez en que se encuentren los espermatozoides, decidimos evaluar la repercusión de capacitar a los espermatozoides en pH_e 6.5, 7.4 u 8.0 sobre los porcentajes de RA mediados por progesterona, GABA o PGE1 (compuestos que los espermatozoides encuentran antes de hacer contacto con el ovulo) y la relación intrínseca de este proceso con los cambios en la [Ca²⁺]_i. Para este fin evaluamos simultáneamente cambios en la [Ca²⁺]_i y la RA en espermatozoides capacitados utilizando como marcadores de estos procesos Fluo 3 AM y FM4-64 respectivamente.

En la figura 4 se muestran trazos representativos de un espermatozoide llevando a cabo la RA (trazo rojo) en respuesta a progesterona y el concomitante cambio en la [Ca²⁺]_i (trazo verde). El inicio de la RA se identifica cuando aumenta la fluorescencia de FM4-64 y al mismo tiempo disminuye la de fluo 3. Estos cambios en la fluorescencia indican que durante el proceso de RA el FM4-64 se incorpora a la nueva membrana que se expone y mantiene durante este proceso exocitótico y, por otra parte, con respecto a la

disminución observada en la fluorescencia de fluo 3 puede deberse a que la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye y/o que parte del colorante fluo 3 es expulsado de la célula.

En promedio es necesario que los espermatozoides estén en contacto con el inductor 15 minutos para que ocurra la RA. Otra observación interesante es que la RA se induce cuando hay un segundo pico en la $[Ca^{2+}]_i$ posterior al producido en respuesta al inductor, tal como ya se ha reportado (45).

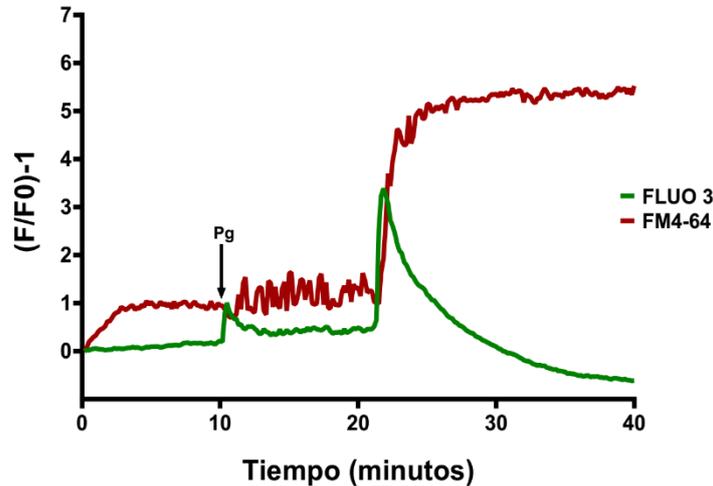
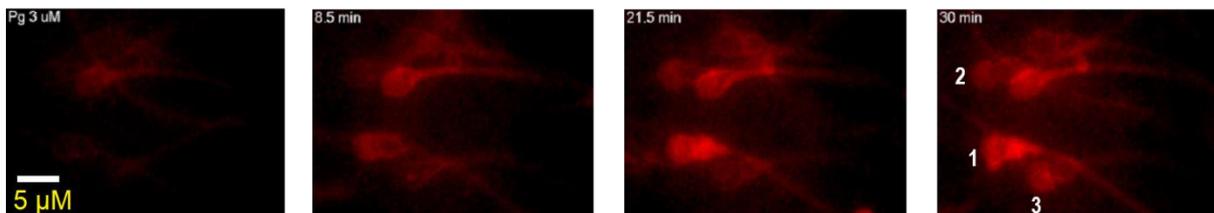


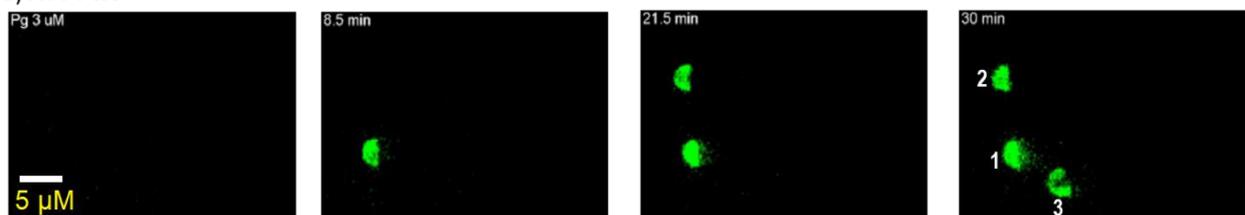
Figura 4. Dinámica del Ca^{2+}_i y RA en respuesta a progesterona. Se muestran las cinéticas representativas de los cambios en la intensidad de fluorescencia de FM4-64 y Fluo 3 de un espermatozoide que experimenta la RA inducida por progesterona 3 μ M. El inductor se agregó a los 10 minutos después del registro. La gráfica muestra los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos). n=5.

Aunque ya se había reportado que el colorante FM4-64 es un indicador de RA (45) realizamos experimentos que nos permitieron confirmarlo. Para esto empleamos en conjunto con FM4-64 con otro indicador de RA ampliamente utilizado: FITC-PSA, esta lectina reconoce proteínas glicosiladas presentes en el acrosoma. En la figura 5 se muestran imágenes representativas en pseudocolor de espermatozoides cargados con estos dos colorantes para monitorear la RA en respuesta a progesterona.

a) FM4-64



b) FITC-PSA



c)

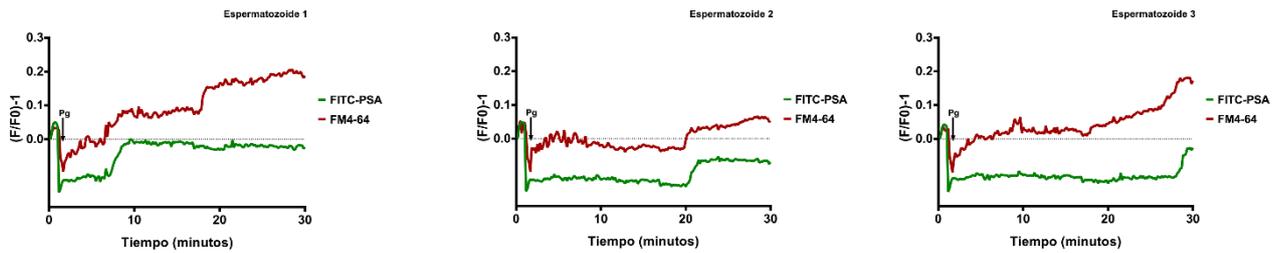


Figura 5. Monitoreo simultáneo (FM4-64 y FITC-PSA) de la RA. Se muestran imágenes representativas de espermatozoides marcados con los colorantes fluorescente indicadores de RA: a) FM4-64 y b) FITC-PSA para ejemplificar la RA inducida con progesterona 3 μ M (agregada al minuto 1) en espermatozoides capacitados 6 horas en pH_e 8. Las cuatro imágenes son consecutivas en el tiempo. Las tres gráficas de abajo (c) muestran los cambios en la fluorescencia de FM4-64 y FITC-PSA de las tres células que llevaron a cabo el proceso de RA, se indica con un número a que célula corresponde cada trazo. Se grafican los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos). n=3.

Como muestran estos resultados el colorante FM4-64 es un reportero confiable de la RA, ya que se observa que el aumento en la intensidad de fluorescencia de este colorante, indicativo de que ocurrió la RA se presenta un par de minutos antes con respecto a la de FITC-PSA, un reportero clásico de este proceso.

Una vez realizado la estandarización de las condiciones de registro realizamos los experimentos donde monitoreamos los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y RA en espermatozoides capacitados en los diferentes pH_es (6.5, 7.4 y 8.0). En la figura 6 podemos observar claramente que la RA inducida con cualquiera de los inductores a pH_e 6.5 es menor que a pH_es 7.4 y 8. También observamos que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de RA producidos con PGE1 y GABA a estos dos últimos pH_es, sugiriendo que los pH_es a los cuales los espermatozoides estarían preparados para experimentar el proceso de exocitosis serían 7.4 y 8. Por otra parte, en el caso de la RA inducida con progesterona, es muy claro que cuando los espermatozoides se capacitan a pH 7.4 se observa un mayor %RA.

Estos resultados podrían sugerir que dependiendo de la molécula inductora que se trate existe un pH óptimo al cual cada molécula ejercerá su acción, es decir inducir la RA. Siendo a pH 7.4 para progesterona, mientras que para el caso de GABA y PGE1 es indistinto que sea 7.4 u 8, ya que a ambos pH_es los %RA son muy similares.

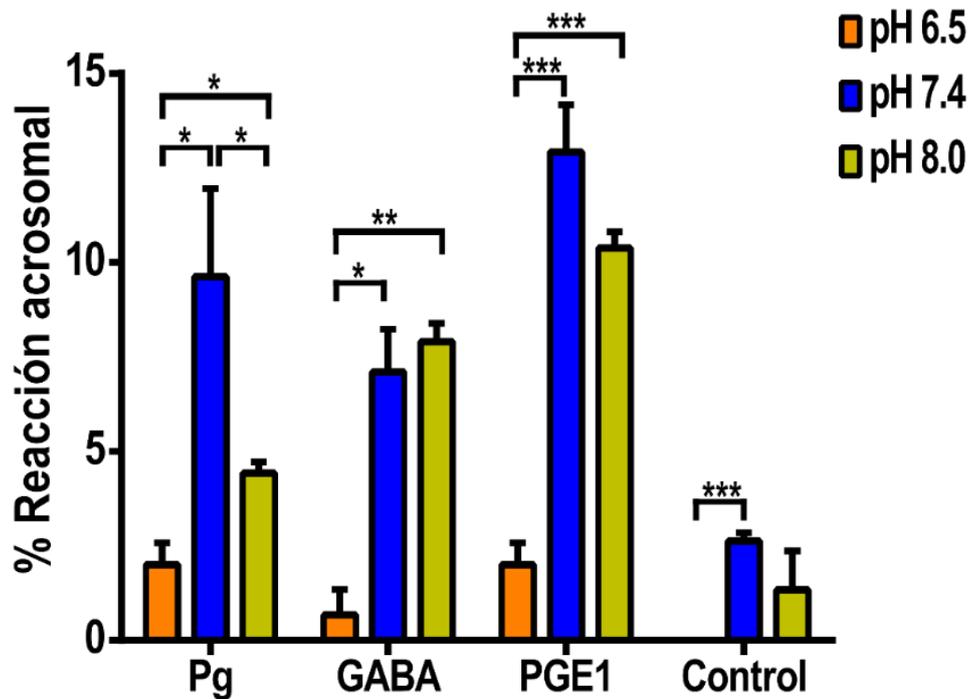


Figura 6. La reacción acrosomal se favorece cuando el pH_e mantenido durante la capacitación es alcalino. Se muestran los porcentajes de RA mediados por Progesterona, GABA y PGE1 en espermatozoides capacitados durante 6 horas a pH: 6.5, 7.4 y 8.0. Además se muestra la RA inducida por la simple adición de MR como control. Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). $n=5$. La comparación entre los porcentajes de RA producidos en respuesta a los inductores probados en espermatozoides capacitados en los tres rangos de pH evaluados se realizó mediante pruebas de t de student no pareadas. Se indican las diferencias que resultaron significativas con valores de $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) y $p \leq 0.001$ (***).

De manera interesante el uso del FM4-64 permitió detectar estructuras tipo apéndices que emergen de distintas regiones de la cabeza las cuales únicamente emergen de espermatozoides que experimentan la RA, aunque no de todos los espermatozoides que reaccionan presentan apéndices (45). Sin embargo la función o importancia de estas estructuras, si existe, aun es un misterio. En la figura 7 se muestran algunos ejemplos de dichas estructuras y además se cuantifica su frecuencia de aparición con respecto al pH_e de capacitación y al inductor empleado.

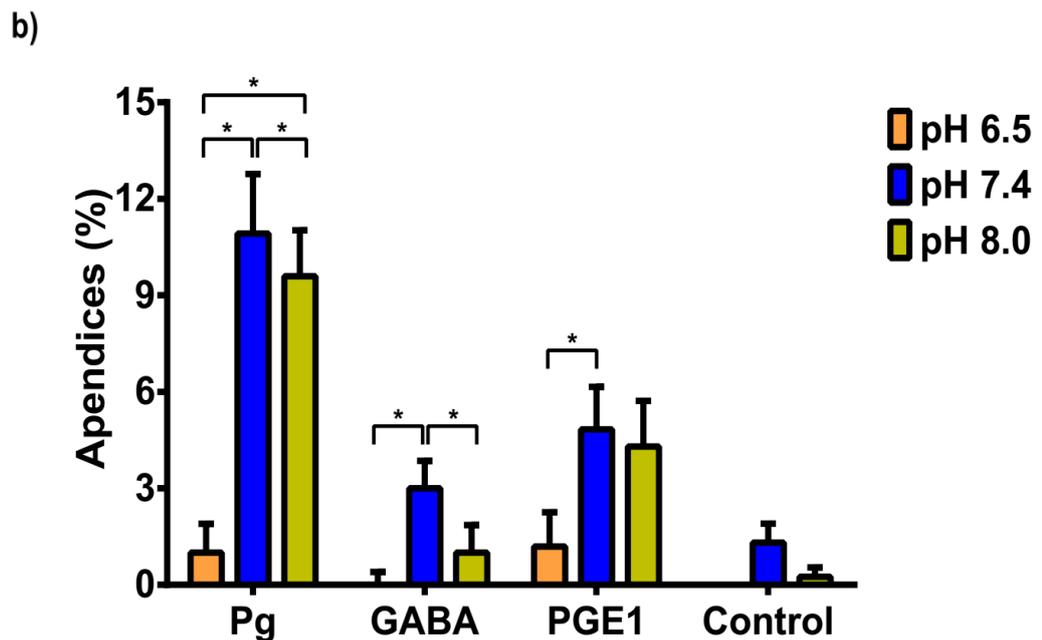
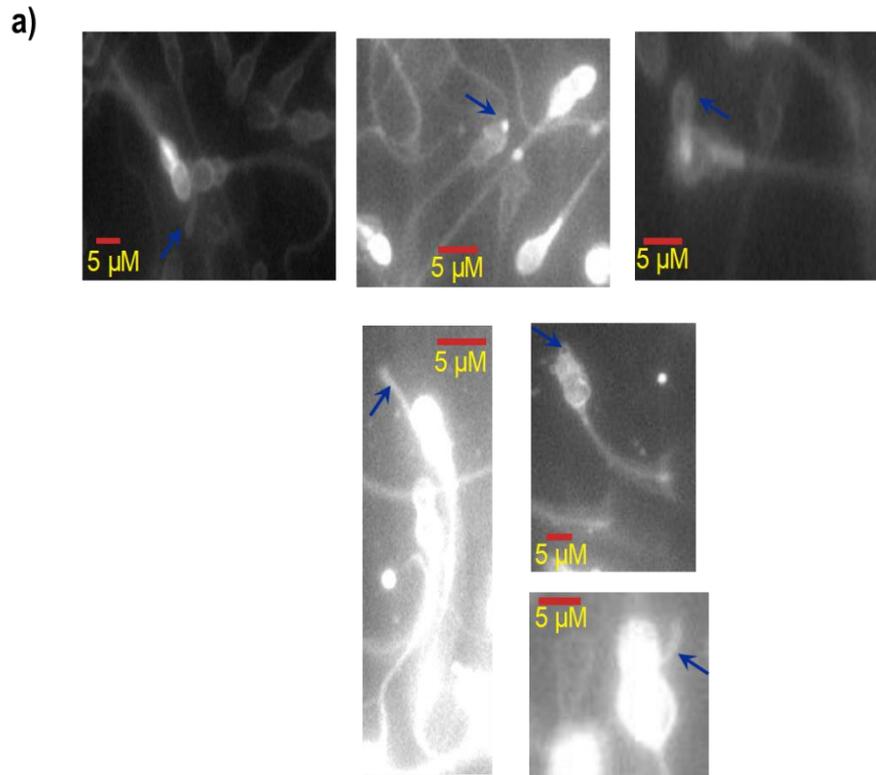


Figura 7. Emergen apéndices de la cabeza de espermatozoides que experimentan la RA. Se muestran algunos de los diferentes apéndices que emergen tanto de la cabeza como del flagelo (a) revelados con FM4-64 (se indican con una flecha). Las gráficas (b) muestran los porcentajes de aparición de apéndices en espermatozoides de humano capacitados 6 horas a pH: 6.5, 7.4 y 8.0 con respecto a los inductores: progesterona, GABA y PGE1 y el control (solo MR). Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). $n=5$. La comparación entre los porcentajes aparición de apéndices en respuesta a los inductores probados en espermatozoides capacitados en los tres rangos de pH evaluados se realizó mediante pruebas de t de student no pareadas. Se indican las diferencias que resultaron significativas con valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**).

Como se puede observar no existe preferencia en la aparición de estas estructuras con respecto al inductor y a la condición de capacitación. Lo que sí es consistente es que estas estructuras solo aparecen en espermatozoides que experimentan la RA, por lo cual los porcentajes de aparición coinciden en tendencia aunque no en número con los porcentajes de RA obtenidos en estas mismas condiciones. El hecho de que los porcentajes de RA y de aparición de apéndices no sean idénticos se debe a que no todos los espermatozoides que reaccionan presentan estas estructuras, por lo cual se vuelve importante caracterizar la composición y función de estas estructuras tanto durante la RA como en el proceso de fusión de gametos.

6.3. Las oscilaciones de Ca^{2+} son más frecuentes a pH_e 6.5 y correlacionan con la ausencia de RA.

Además de analizar los porcentajes de RA de los experimentos anteriores también analizamos la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ de estas células y observamos que un porcentaje de células presentaban oscilaciones de Ca^{2+} y que de manera interesante los espermatozoides con este comportamiento no experimentaban la RA. Estos resultados coinciden con una observación reportada en un trabajo realizado por nuestro laboratorio (45) empleando la misma estrategia experimental. Sugiriendo que el comportamiento oscilatorio de los niveles de Ca^{2+} podría ser un mecanismo de señalización clave para determinar que un espermatozoide lleve o no a cabo la RA. Por lo cual consideramos importante caracterizar en detalle dicho comportamiento y su repercusión sobre la RA.

Al analizar los experimentos donde determinamos los %RA, encontramos que cuando la capacitación se lleva a cabo en pH_e 6.5 se presentan los porcentajes más altos de células oscilantes, mientras que a pH_e s 7.4 y 8 el porcentaje de células oscilantes es menor (figura 8). Además confirmamos que los espermatozoides que presentan oscilaciones de Ca^{2+} no experimentan la RA y que estas oscilaciones pueden ser desencadenadas en cierta medida por progesterona, GABA o PGE1 o espontaneas, al agregar solo MR (figura 9).

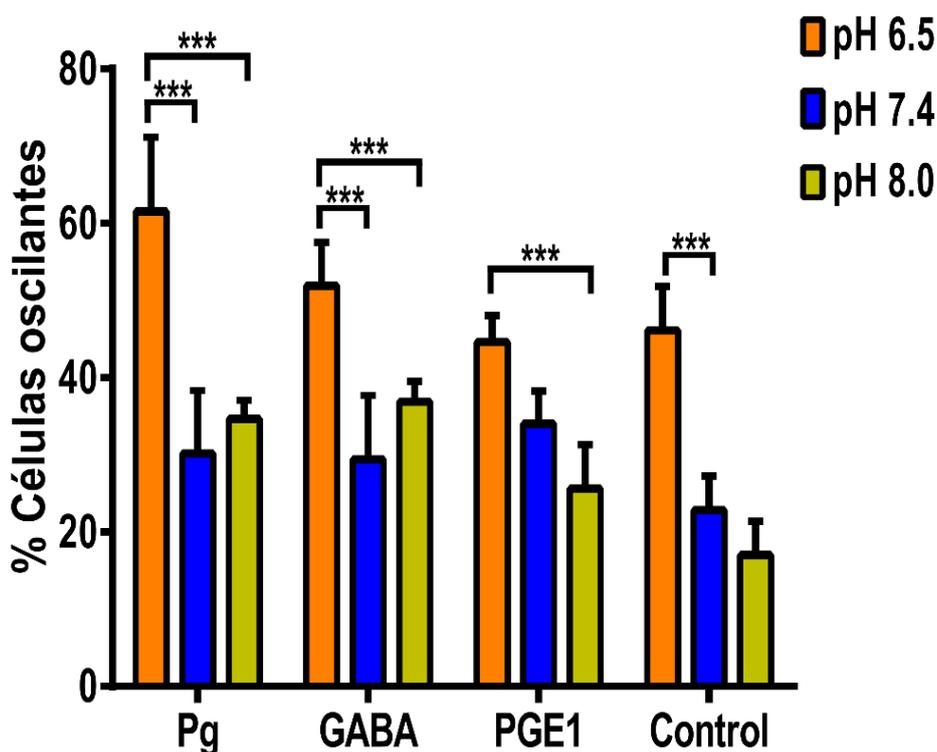


Figura 8. Las oscilaciones de Ca^{2+} son más frecuentes a pH_e 6.5. En la gráfica se muestran los porcentajes de espermatozoides oscilantes observadas en diferentes pH_e s mantenidos durante 6 horas de capacitación: 6.5, 7.4 u 8.0 con respecto a los inductores: progesterona, GABA y PGE1 y el control (solo MR). Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). $n=5$. La comparación entre los porcentajes de oscilaciones producidos en respuesta a los inductores probados en espermatozoides capacitados en los tres rangos de pH_e evaluados se realizó mediante pruebas de t de student no pareadas. Se indican las diferencias que resultaron significativas con valores de $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) y $p \leq 0.001$ (***).

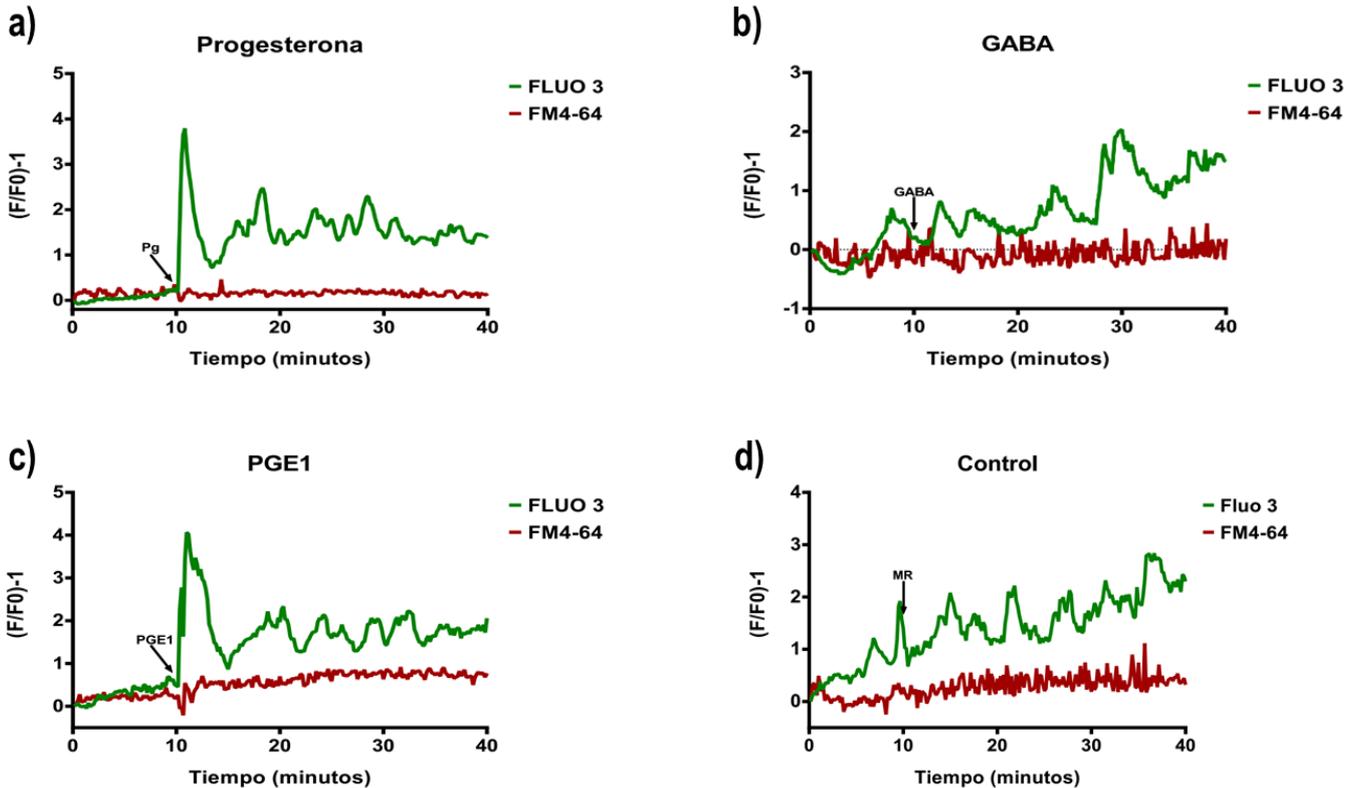


Figura 9. Las oscilaciones de Ca^{2+} impiden la RA. Trazos de fluorescencia representativos de espermatozoides desplegando oscilaciones de Ca^{2+} (Fluo 3) pero no RA (FM4-64) en respuesta a 3 μM de: Pg, GABA, PGE1 o medio (control), los cuales se agregaron a los 10 minutos del inicio del registro. Se grafican los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos). $n=5$.

Dado que este comportamiento oscilatorio claramente influye en la RA, sugerimos que dicho comportamiento podría ser un indicativo de que los espermatozoides no están preparados fisiológicamente para experimentar la RA.

Con la intención de determinar las características de las oscilaciones antes y después de agregar cualquiera de los inductores. Se analizó su frecuencia de aparición (oscilaciones por minuto) tanto durante los primeros 10 minutos del registro sin adición alguna y como después de agregar el inductor, por otros 30 minutos de registro. Observamos que cuando el pH_e del medio que promueve la capacitación es 6.5 la adición de progesterona, GABA y PGE1 provoca que la frecuencia de las oscilaciones aumente, mientras que cuando se agrega MR la frecuencia de estas no cambia. De manera interesante sucede lo contrario cuando el pH del medio capacitante es 7.4 y 8.0, en estas condiciones la frecuencia de dichas oscilaciones disminuye después de la adición, incluso en la condición control (MR) (figura 10).

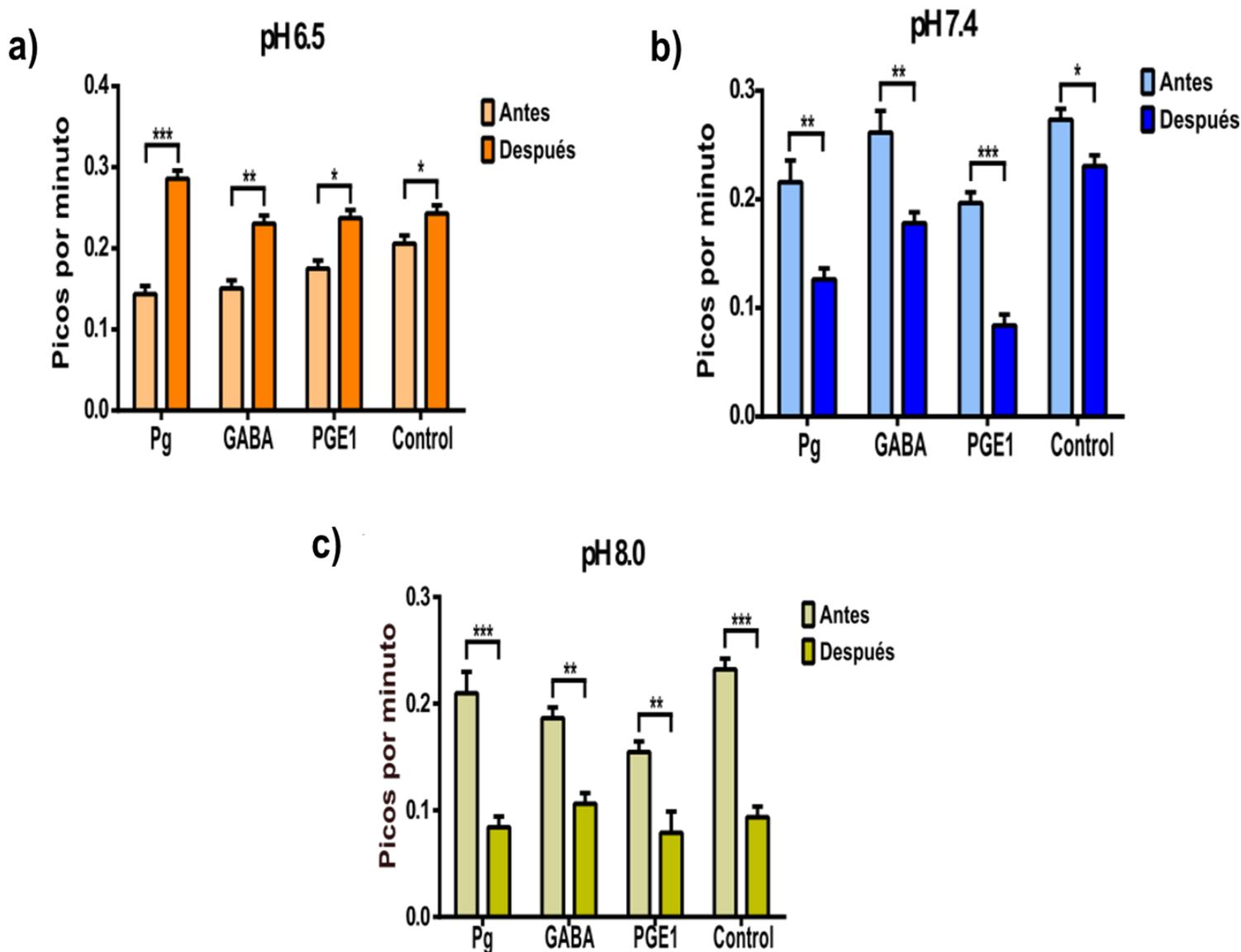


Figura 10. La frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} aumenta después de agregar el inductor a pH_e 6.5, mientras que a pH_e 7.4 y 8.0 la frecuencia disminuye. Frecuencia promedio de las oscilaciones de Ca^{2+} (picos por minuto) antes y después de agregar 3 μM de: Pg, GABA, PGE1, o medio (control) en espermatozoides capacitados a pH_e 6.5 (A), 7.4 (B) u 8.0 (C). Los valores representan el promedio \pm SEM de 5 donadores independientes (≥ 100 células se analizaron por experimento). Se emplearon pruebas t-student para comparar la frecuencia de las oscilaciones Ca^{2+} antes y después de agregar el inductor. Se indican las diferencias que resultaron significativas, $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) y $p \leq 0.001$ (***).

Estos resultados muestran que la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} observadas cuando los espermatozoides se capacitan en pH_e 6.5 aumenta al agregarse alguno de los inductores de la RA. Esto lo observamos independientemente del inductor empleado, con lo cual podemos sugerir que este aumento en la frecuencia de las oscilaciones se debe al pH_e mantenido durante la capacitación y es independiente del inductor de la RA al que se enfrenten los espermatozoides.

Por otro lado, en el caso de las oscilaciones observadas a pH_e 7.4 y 8 se observó una disminución en la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} posterior a la adición de alguno de los inductores.

Con estos resultados proponemos que la disminución en la frecuencia en las oscilaciones sería un indicativo de que la maquinaria requerida para llevar a cabo la RA se encuentra en las condiciones óptimas para realizar su función y/o los espermatozoides se encuentran en un ambiente adecuado para llevar a cabo este proceso que les permitirá culminar con la fusión con el óvulo. Lo cual tiene sentido con los reportes que indican que el pH del sitio donde se lleva a cabo la fecundación es alcalino y por tanto sería indicativo de que los espermatozoides se encuentran en el sitio adecuado para reaccionar y fusionarse con el óvulo.

No obstante, el hecho de que la frecuencia de las oscilaciones en pH 6.5 aumente y en pH 8 disminuya también en la respectiva condición control, sugiere que el efecto observado en la frecuencia de las oscilaciones se debe en mayor medida al pH del medio capacitante y no en respuesta al inductor.

Al analizar la frecuencia, altura y amplitud de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} encontramos que son claramente distintas dependiendo del pH_e mantenido durante la capacitación. Siendo más frecuentes y con mayor altura en los espermatozoides capacitados a pH_e 6.5 y de mayor amplitud en pH_e 8 (Figura 11). Estas diferencias podrían sugerir que las oscilaciones presentes en los distintos pH_e s codifican información diferente.

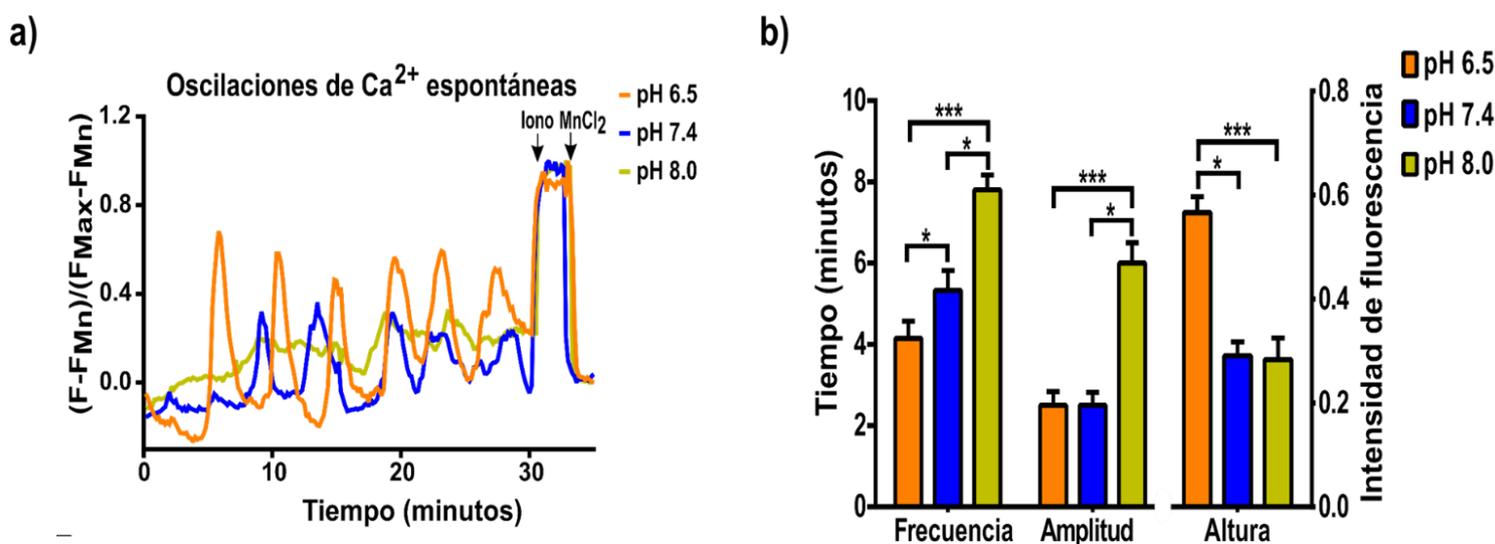


Figura 11. Las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas son diferentes dependiendo del pH_e mantenido durante la capacitación. Trazos representativos de espermatozoides capacitados a pH_e 6.5, 7.4 u 8 exhibiendo oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas. Las adiciones se realizaron a los 15 minutos: MR, a los 30 minutos: ionomicina 10 μ M y a los 32.5 minutos: $MnCl_2$ 5 mM. La gráfica muestra los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos). Se muestra la cuantificación de la frecuencia (minutos), altura (intensidad de fluorescencia) y amplitud (minutos) de las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas observadas. Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). $n=5$. Se indican las diferencias que resultaron significativas $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) y $p \leq 0.001$ (***).

Debido a nuestro interés en descifrar las implicaciones de las oscilaciones de Ca^{2+} en la RA, decidimos continuar su estudio y para simplificar el análisis nos enfocamos en las oscilaciones espontáneas (observadas en la condición control) observadas cuando los espermatozoides se capacitan en pH_e 6.5. La elección se basó en que a este pH de capacitación las oscilaciones son más frecuentes y a que nuestros

resultados sugieren que las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas se producen principalmente por el pH mantenido durante el tiempo de capacitación y no en respuesta a la naturaleza del compuesto utilizado.

6.3.1. Los flujos externos de Ca^{2+} y los reservorios internos de Ca^{2+} están involucrados en la generación de las oscilaciones de Ca^{2+}

Para investigar si en la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas observadas estaba involucrada la entrada de Ca^{2+} o la liberación de este ion de reservorios internos, realizamos registros simultáneos de RA y $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en condiciones normales de $[\text{Ca}^{2+}]_e$: 2 mM o baja $[\text{Ca}^{2+}]_e$: 100 nM en espermatozoides capacitados a pH_e 6.5. En la figura 12 se muestran trazos representativos de la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ presentada por diferentes espermatozoides en estas condiciones. Como se puede observar, es evidente que las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas se eliminan por completo cuando $[\text{Ca}^{2+}]_e$ es baja (Figura 12b). En estas condiciones el porcentaje de RA fue muy bajo o nulo, como se determinó previamente (Figura 6).

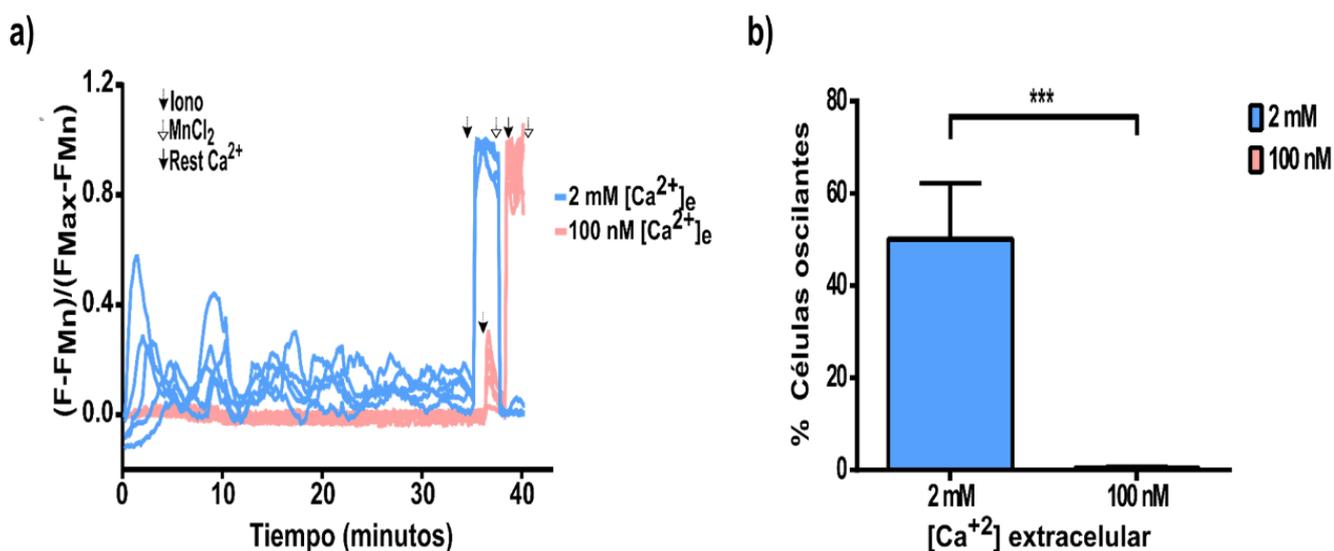


Figura 12. Las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas dependen de Ca^{2+} externo. Trazos representativos de fluorescencia de Ca^{2+} (Fluo-3) de diferentes espermatozoides (cada línea representa un espermatozoide) capacitados a pH_e 6.5 e incubados en condiciones de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ normal: (2mM azul) o bajo (100nM, rosa). Las adiciones se realizaron a los 10 minutos: MR, a los 30 minutos: ionomicina 10 μM y a los 32.5 minutos: MnCl_2 5 mM. La gráfica muestra los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos). En (b) se muestra el porcentaje de espermatozoides mostrando oscilaciones de Ca^{2+} en condiciones de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ normal o baja. Los valores en los representan el promedio \pm SEM de 5 donadores independientes (≥ 100 células se analizaron por experimento). Se indican las diferencias que resultaron significativas con valores de $p \leq 0.001$ (***).

Una vez que demostramos que las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas son dependientes de la entrada de Ca^{2+} externo, intentamos identificar las entidades moleculares involucradas en transportar este ion hacia el interior de la célula. En este sentido, CatSper que es el principal canal de Ca^{2+} presente en el espermatozoide, y del cual existen reportes que indican que se encuentra parcialmente activo incluso a bajos pH_e s tales como 6.0 (107, 108).

Decidimos probar el efecto de HC-056456 10 μM (HC), un compuesto considerado como uno de los bloqueadores de CatSper más efectivo (109, 110) sobre las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas. En la figura 13 observamos que el HC elimina las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas (Figura 13). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales la presencia de HC también provoco un aumento importante en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo cual en algunos casos, condujo a la RA. Estos resultados confirman que además de bloquear a CatSper, HC es capaz de provocar una movilización de Ca^{2+} , por sí mismo tal como lo reporto nuestro grupo recientemente (110).

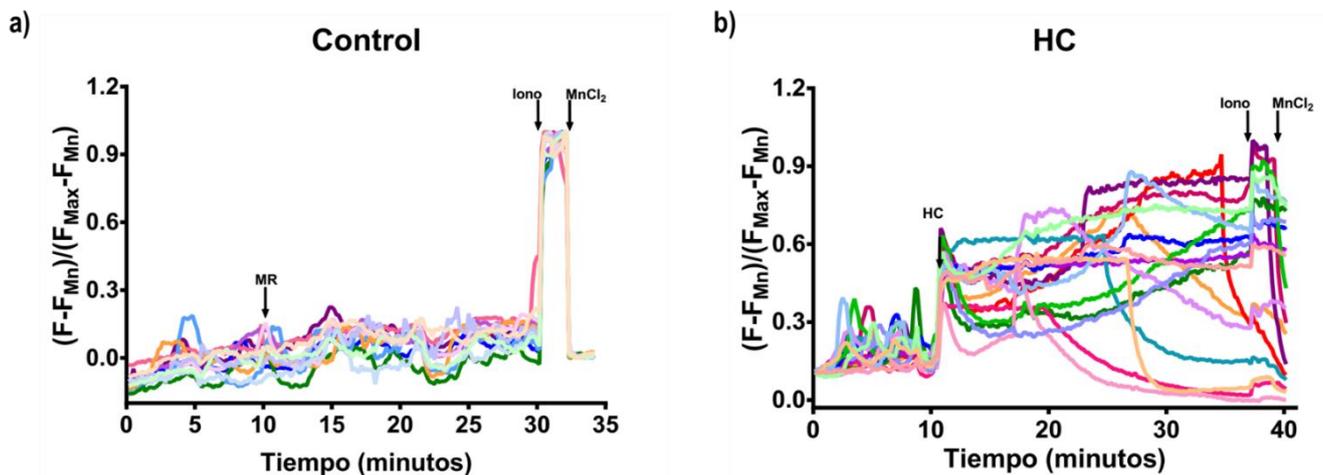


Figura 13. HC inhibe las oscilaciones de Ca^{2+} pero también aumenta los niveles de Ca^{2+} . Se muestran trazos representativos que ejemplifican la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fluo 3: indicador de Ca^{2+}) mediados por MR (control) (a), con 10 μM de HC (b). Las adiciones se realizaron a los 10 min: HC 10 μM o MR, a los 30 o 37 minutos: MR ionomocina 10 μM y a los 32 o 39 minutos: MnCl_2 5 mM. Las gráficas muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos), cada línea de representa un espermatozoide. (n=5).

Como se puede observar claramente en estos resultados efectivamente el HC inhibe las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas. Sin embargo también observamos que este inductor provoca que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumente, con lo cual se demuestra que el HC no es un inhibidor específico de CatSper (ya que activa otras vías de señalización que modifican la $[\text{Ca}^{2+}]_i$), y por consiguiente no constituye una herramienta farmacológica adecuada para tratar de descifrar el mecanismo por el cual se producen las oscilaciones de Ca^{2+}

Hasta el momento no existen reportes de algún otro inhibidor del CatSper con mayor especificidad y sin efectos secundarios. Sin embargo dada una colaboración con el Dr. Publicover en universidad de Birmingham, Inglaterra tuvimos acceso a un nuevo bloqueador de CatSper (X20) que está en desarrollo por lo que se desconoce su identidad química pero que de acuerdo a resultados de registro de corriente mediante electrofisiología y mediciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, este compuesto promete ser un inhibidor más específico de este canal, principalmente por no provocar un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por sí mismo. Los resultados usando este inhibidor sobre las oscilaciones de Ca^{2+} se muestran en la figura 14.

Los registros se realizaron mediante la estrategia de perfusión (recambio de medio constante) y los resultados muestran que las oscilaciones de Ca^{2+} se inhiben con el compuesto X20, además este inhibidor también fue capaz de inhibir la respuesta inducida por progesterona (aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$), indicando de manera más fidedigna la participación de CatSper en la mediación de este comportamiento oscilatorio.

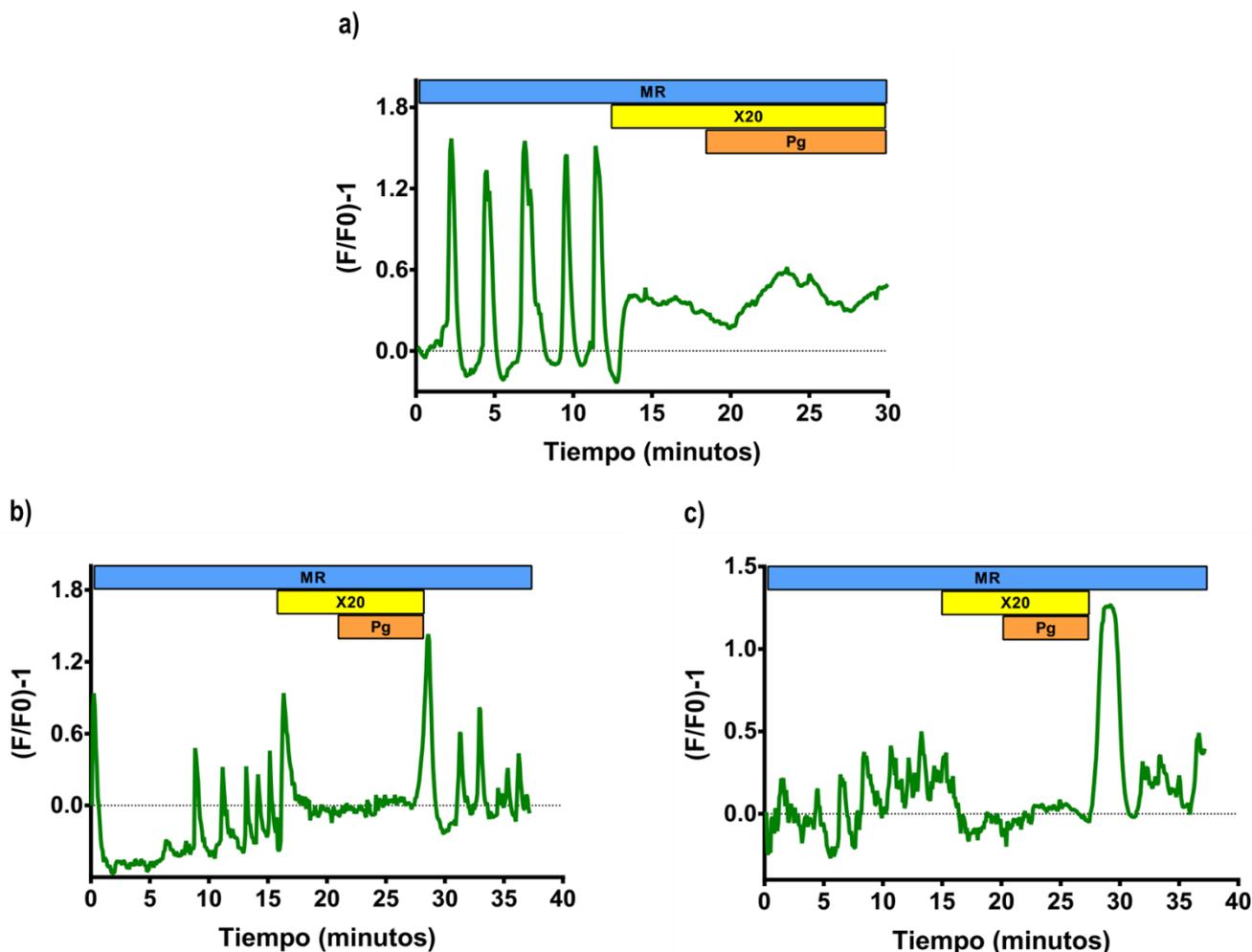


Figura 14. X20 inhibe las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas. Se muestran trazos representativos que ejemplifican la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ (Fluo 3: indicador de Ca^{2+}) observados en espermatozoides capacitados en pH_e 6.5 durante 6 horas al agregar X20 10 μM y después progesterona 3 μM (a); (b y c) X20 10 μM , después progesterona 3 μM y después regresar a las condiciones basales, eliminando AR y progesterona. El inhibidor X20 se agregó a los 15 minutos, a los 20 minutos se agregó progesterona: 3 μM y el regreso a las condiciones basales se realizó a los 27 minutos. Las gráficas muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos). Se muestra un experimento representativo ($n=3$).

Continuando con la búsqueda de las entidades moleculares involucradas en la generación y mantenimiento de las oscilaciones espontaneas de Ca^{2+} , investigamos si los receptores de IP_3 estaban participando. Para tal fin probamos Xestospongina C (XC), un inhibidor de dichos receptores (111), a diferentes concentraciones. Los resultados (figura 15) muestran que XC a las tres concentraciones probadas es capaz de disminuir el porcentaje de células oscilantes y también disminuye su frecuencia.

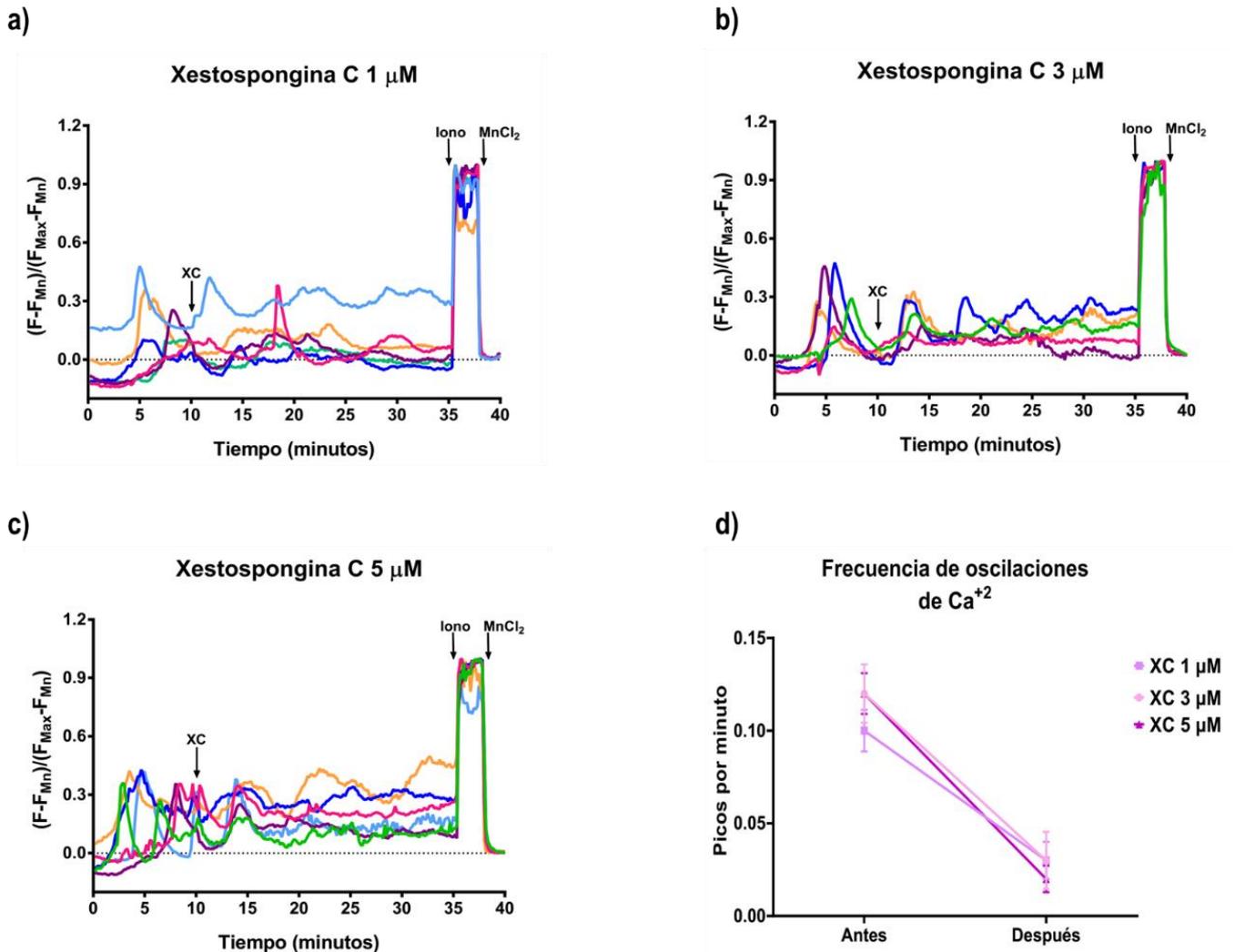


Figura 15. Xestospongina C inhibe las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas. Se muestran trazos representativos que ejemplifican la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ (Fluo 3: indicador de Ca^{2+}) observados en espermatozoides (cada línea de color representa un espermatozoide) capacitados a pH 6.5 durante 6 horas al agregar Xestospongina C (XC): 1 μM (a), 3 μM (b) y 5 μM (c). Las adiciones se realizaron a los 10 minutos: XC, a los 35 minutos: ionomicina 10 μM y a los 37.5 minutos: $MnCl_2$ 5 mM. Las gráficas muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos). Se muestra un experimento representativo (n=5). En (d) se muestra la frecuencia de las oscilaciones Ca^{2+} (como número de picos por minuto) observadas antes de la adición y después de la adición de XC en espermatozoides de humano capacitados 6 horas a pH: 6.5 con respecto las diferentes concentraciones de XC (1 μM , 3 μM y 5 μM). Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n=5. Se realizó una prueba de t-student no pareada para comparar la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} antes y después de agregar el inhibidor. Las diferencias entre el antes y después resultaron significativas con las 3 concentraciones probadas con valores de $p \leq 0.01$ (**).

Con estos últimos resultados demostramos que los receptores de IP_3 son componentes moleculares importantes en la mediación de las oscilaciones de Ca^{2+} ya que al tratar a los espermatozoides con este compuesto disminuye tanto el porcentaje de células con este comportamiento como su frecuencia de aparición. Además, es importante mencionar que las diferentes concentraciones de XC probadas provocaron el mismo efecto y que no se observaron diferencias significativas entre dichas concentraciones.

Posteriormente probamos el efecto de tetracaina, un inhibidor de la liberación de Ca^{2+} a través de RyR (112) sobre las oscilaciones de Ca^{2+} . Los resultados (figura 16) muestran que al agregar tetracaina 2 mM se eliminan por completo las oscilaciones de Ca^{2+} , disminuyendo claramente la frecuencia de estas oscilaciones posterior a la adición de este inhibidor.

Con estas evidencias podemos sugerir que los receptores de rianodina participan en la mediación de las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas, haciendo evidente la participación de los reservorios de Ca^{2+} en este proceso. Además estos resultados concuerdan con los de Publicover et al., 2004 (100) donde muestra que tetracaina inhibe las oscilaciones de Ca^{2+} mediadas por progesterona. Lo cual quiere decir que sin importar el mecanismo por el cual se desencadenen las oscilaciones, los receptores de rianodina son indispensables para este proceso.

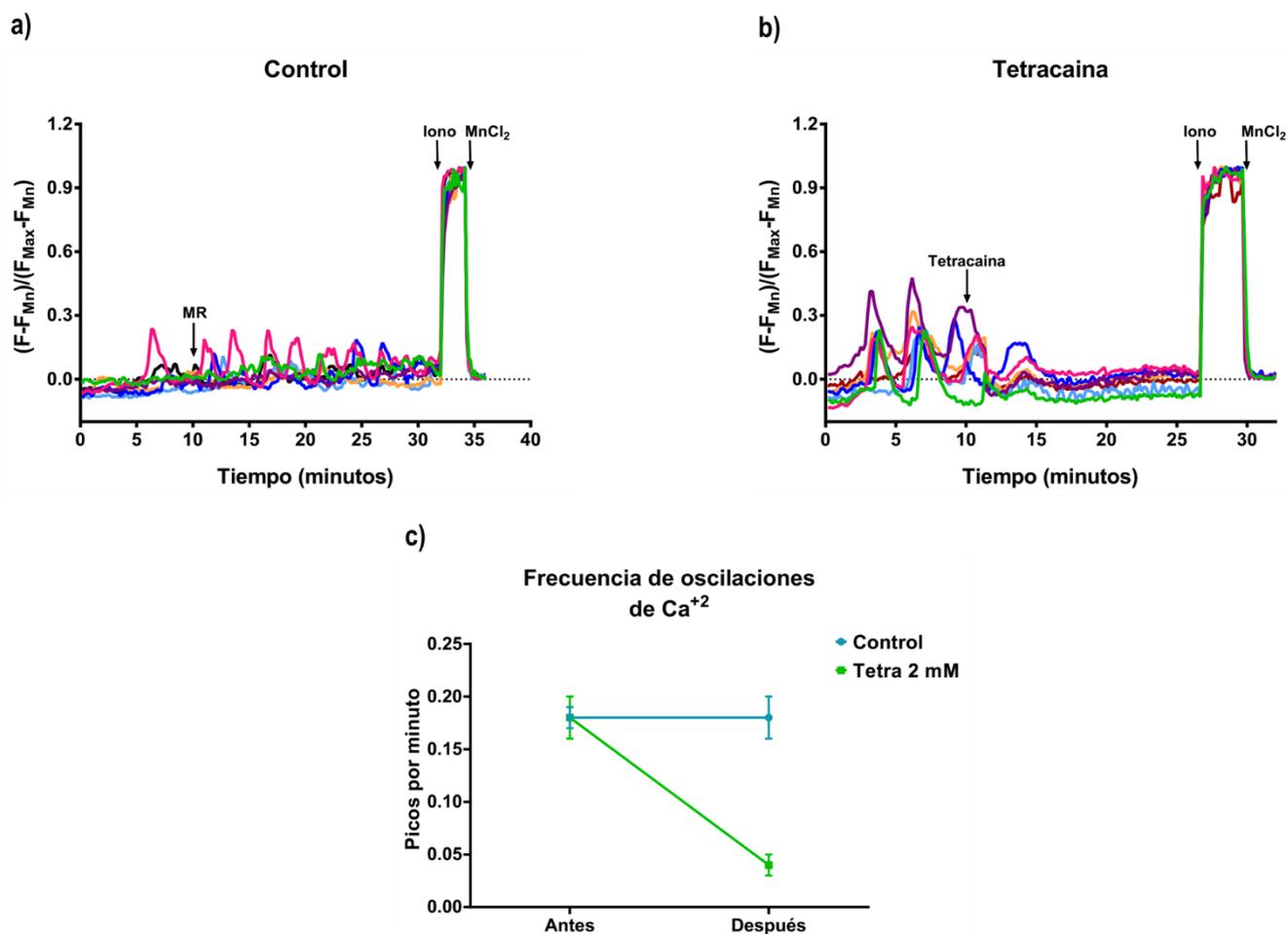


Figura 16. Tetracaina inhibe las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas. Se muestran trazos representativos que ejemplifican la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fluo 3: indicador de Ca^{2+}) observados en espermatozoides capacitados (cada línea de color representa un espermatozoide) en pH_e 6.5 durante 6 horas al agregar medio de registro (MR) (a) o Tetracaina 2 mM (b). Las adiciones se realizaron a los 10 minutos: MR o Tetracaina, a los 25.5 minutos: ionomicina $10 \mu\text{M}$ y a los 30 minutos: MnCl_2 5 mM. Las gráficas muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos). Se muestra un experimento representativo ($n=5$). En (c) se muestra la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} (como número de picos por minuto) observadas antes de la adición del inductor y después de la adición de este (a los 10 y 5 minutos, y 25 minutos) en espermatozoides de humano capacitados 6 horas a pH_e 6.5 con respecto MR o Tetracaina. Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). $n=5$. Se realizó una prueba de t-student no pareada para comparar la los porcentajes y la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} producidas en respuesta a MR o Tetracaina en espermatozoides capacitados antes y después de la adición. Solo con tetracaina las diferencias resultaron significativas con valores de $p \leq 0.001$ (***)

Debido a que hay reportes que sugieren que la tetracaina, además de inhibir a los RyR, también ejerce un efecto inhibitorio sobre la Ca^{2+} ATPasa y al intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (113, 114), decidimos probar el efecto de otros inhibidores de dichos receptores sobre las oscilaciones de Ca^{+2} espontaneas.

Empezamos probando el efecto de dantroleno, inhibidor de los RyR aplicado a diferentes concentraciones, sin embargo no observamos que este compuesto afectara la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} (figura 17). Esto podría deberse a que posiblemente dicho compuesto no está afectando a la isoforma del RyR presente en los espermatozoides de humano. Lo cual sugerimos con base en reportes que proponen que el dantroleno tiene un efecto diferencial dependiendo de la isoformas de los RyR en cuestión (115).

Por otro lado la disminución inmediata en la fluorecencia que observamos posterior a la adición de este compuesto podría sugerir que ocurre una inhibición transitoria de los RyR que se revierte a los pocos minutos.

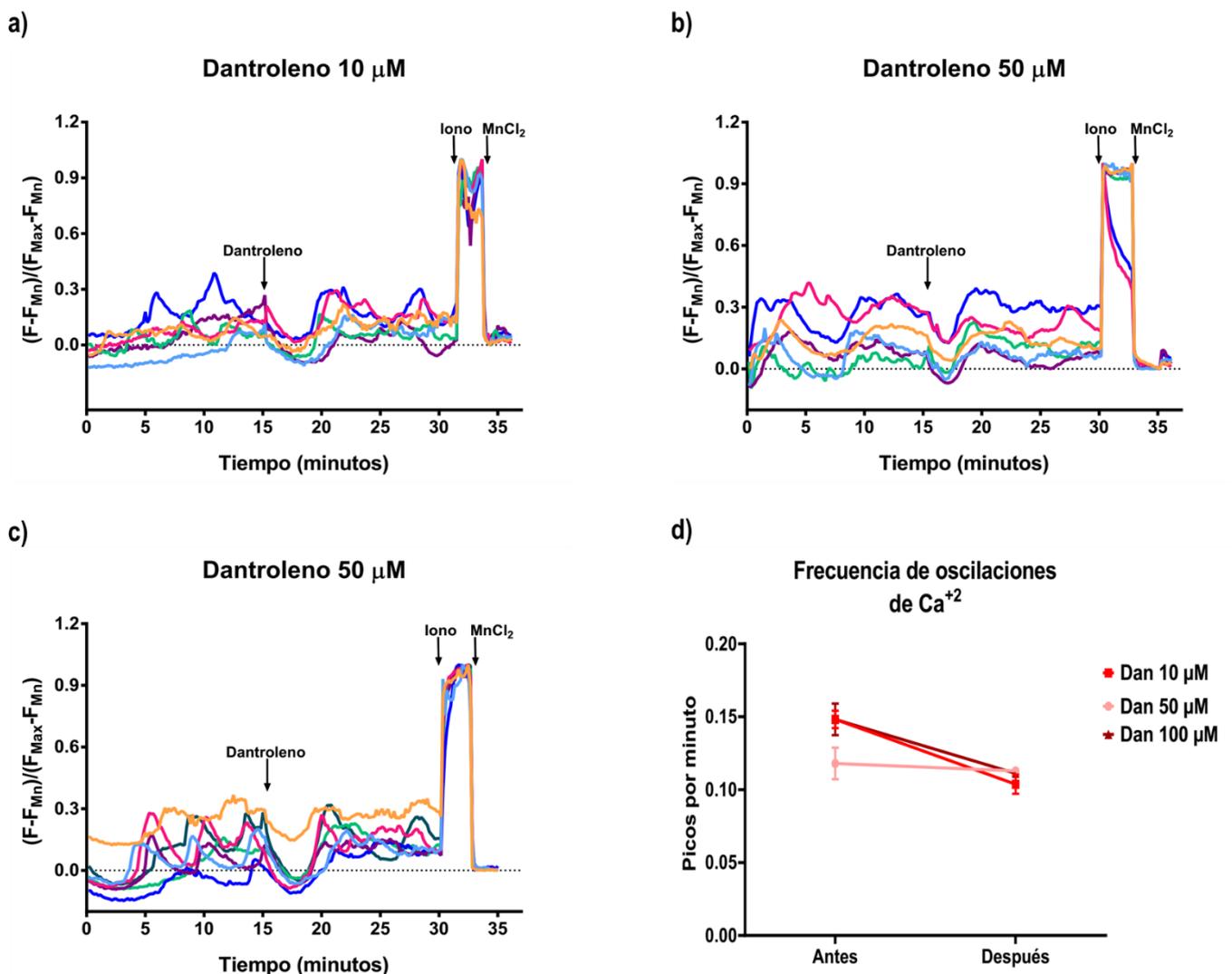


Figura 17. Dantroleno no afecta las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas. Se muestran trazos representativos que ejemplifican la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ (Fluo 3: indicador de Ca^{2+}) observados en espermatozoides (cada línea de color representa un espermatozoide) capacitados a pH 6.5 durante 6 horas al agregar Dantroleno 10 μM (a) 50 μM (b) y 100 μM (c). Las adiciones de Dantroleno se realizaron a los 15 minutos, a los 30 minutos: ionomicina 10 μM y a los 32.5 minutos: MnCl₂ 5 mM. Las gráficas muestran los cambios en la intensidad de fluorecencia contra el tiempo (minutos). Se muestra un experimento

representativo (n=3). En d se muestra la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} (como número de picos por minuto) observadas antes y después de la adición Dantroleno. Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n=3. Se realizó una prueba de t-student no pareada para comparar la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} antes y después de agregar el inhibidor. No hubo diferencias significativas.

Posteriormente probamos el efecto de rianodina, ya que se ha demostrado que a concentraciones mayores a 100 μM altera la conductancia del canal de rianodina manteniéndolo en un estado cerrado (116). El efecto de este compuesto sobre las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} se muestra en la figura 18.

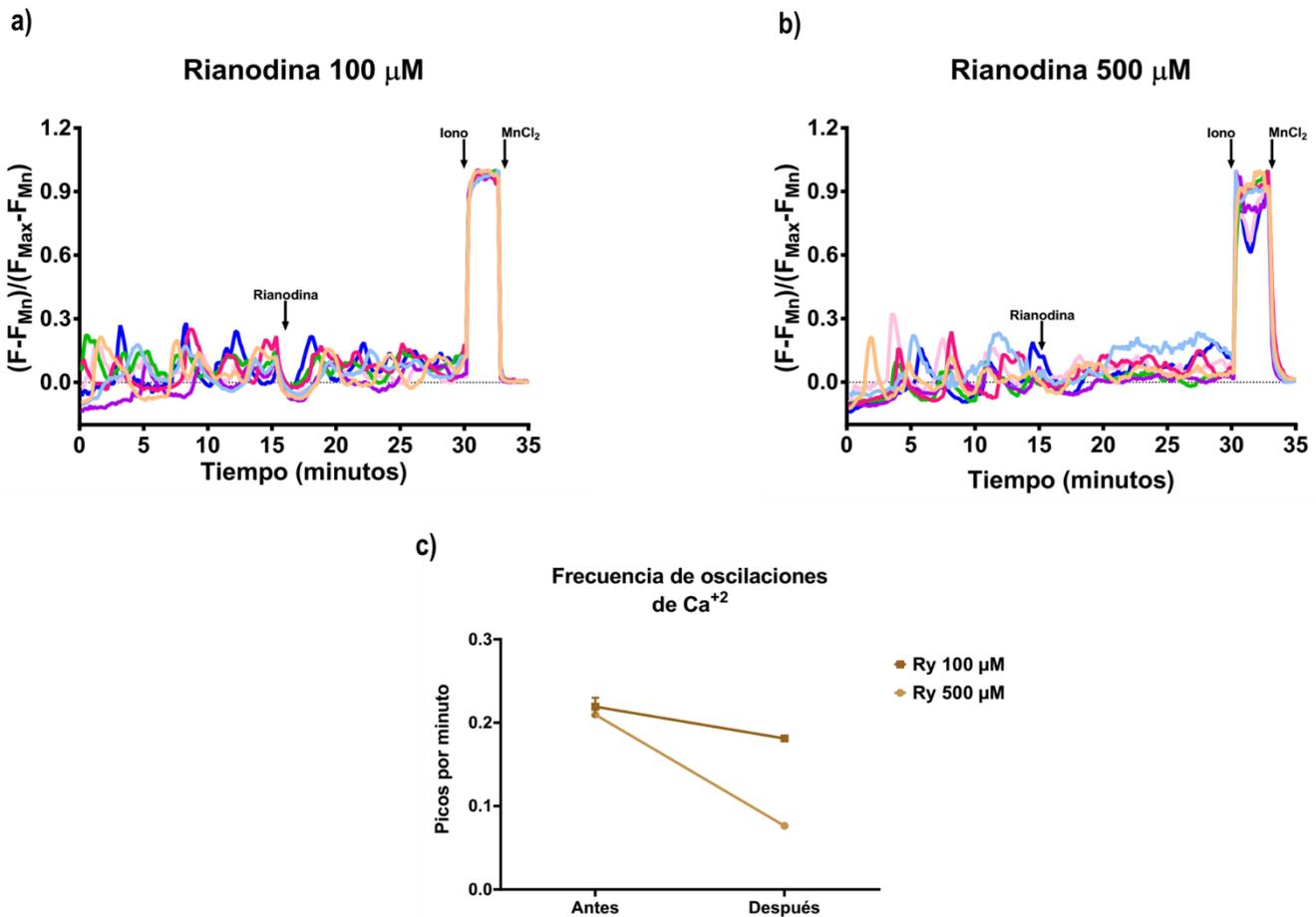


Figura 18. Rianodina disminuye la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas. Se muestran trazos representativos que ejemplifican la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fluo 3: indicador de Ca^{2+}) observados en espermatozoides (cada línea de color representa un espermatozoide) capacitados en pH_e 6.5 durante 6 horas al agregar rianodina 100 μM (a) y 500 μM (b). Las adiciones de rianodina se realizaron a los 15 minutos, a los 30 minutos: ionomicina 10 μM y a los 32.5 minutos: MnCl_2 10 μM . Las gráficas muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos). Se muestra un experimento representativo (n=5). En c se muestra la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} (como número de picos por minuto) observadas antes y después de la adición Rianodina 100 μM y 500 μM . Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n=5. Se realizó una prueba de t-student no pareada para comparar la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} antes y después de agregar el inhibidor. Solo resultaron significativas las diferencias en el tratamiento con 500 μM de Rianodina con valor de $p \leq 0.001$ (***)

Como muestran estos resultados, la frecuencia de las oscilaciones disminuyó al agregar 500 μM de rianodina, lo cual quiere decir que estos receptores efectivamente están implicados en la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas. Sin embargo, el hecho de que este compuesto no elimine las oscilaciones por completo, tal como lo hace la tetracaina, quiere decir que efectivamente la tetracaina podría estar afectando la función de otras entidades moleculares importantes en la generación de las oscilaciones.

Continuando con la identificación de los componentes moleculares que pudieran estar involucrados en la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} que hemos descrito, decidimos enfocarnos en estudiar la participación de las Ca^{2+} -ATPasas tanto de la membrana plasmática como también la presente en pozas internas de Ca^{2+} , ya que estas constituyen dos de los principales mecanismos de remoción de Ca^{2+} citosólico, ya sea expulsándolo de la célula o secuestrándolo en pozas internas de Ca^{2+} . Para este fin probamos el efecto de quercetina, inhibidor de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA4) (117 y 118) y tapsigargina, inhibidor de la Ca^{2+} -ATPasa encontrada en pozas internas de espermatozoides de humano (SPCA1) (119).

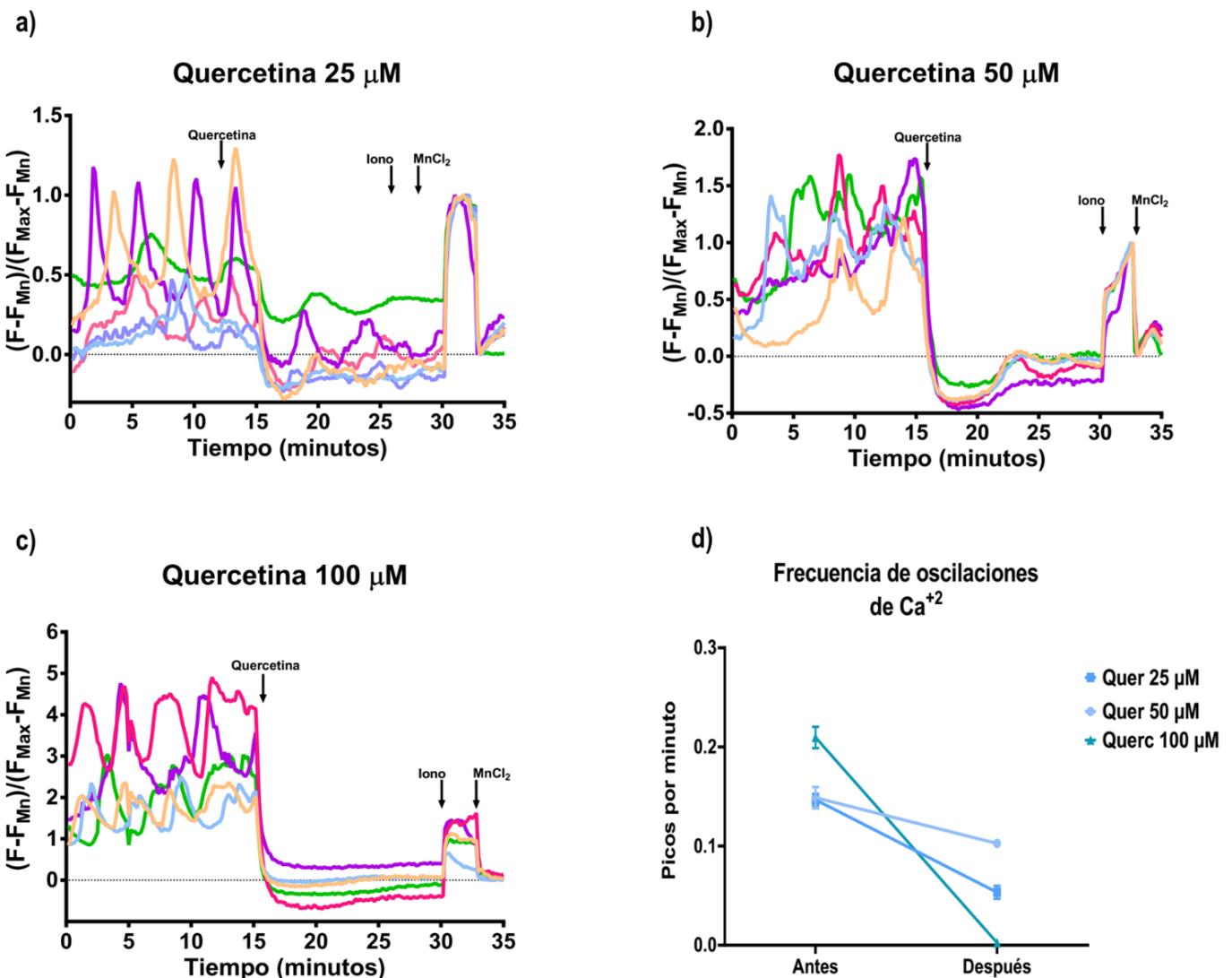


Figura 19. Quercetina disminuye la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas. Se muestran trazos representativos que ejemplifican la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ (Fluo 3: indicador de Ca^{2+}) observados en espermatozoides (cada línea de color representa un espermatozoide) capacitados a pH 6.5 durante 6 horas al agregar quercetina: 25 μ M (a), 50 μ M (b) y 100 μ M (c). Las adiciones del vehículo y quercetina se realizaron a los 15 minutos, a los 30 minutos: ionomicina 10 μ M y a los 32.5 minutos: $MnCl_2$ 10 μ M. Las gráficas muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos). Se muestra un experimento representativo (n=5). En d se muestra la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} (como número de picos por minuto) observadas antes y después de la adición quercetina 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M. Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n=5. Se realizó una prueba de t-student no pareada para comparar la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} antes y después de agregar el inhibidor. Solo resultaron significativas las diferencias en el tratamiento con 50 μ M y 100 μ M de quercetina con valores de $p \leq 0.01$ (***) y $p \leq 0.001$ (***) respectivamente.

Los resultados obtenidos utilizando quercetina (Figura 19) muestran claramente que la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} disminuye y que esta disminución es dependiente de la concentración empleada. Las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas disminuyen completamente al agregar 100 μ M de dicho compuesto. Tales resultados sugieren que PMCA4 es un componente clave en la mediación de las oscilaciones. Sin embargo, este compuesto indujo una disminución inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ y esto no puede explicarse de acuerdo a su efecto inhibitorio sobre esta bomba de Ca^{2+} , ya que como mencionamos previamente su función es expulsar Ca^{2+} de la célula. Por lo cual es más probable que este compuesto este inhibiendo la entrada de Ca^{2+} a la célula a través de un canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática. En este sentido, recientemente un trabajo mostro que quercetina inhibe las corrientes de los canales iónicos sensibles a acidificación (ASIC) (120), estos canales aunque principalmente conducen Na^+ también son capaces de permitir el flujo de Ca^{2+} , por lo cual podrían ser los candidatos para explicar el efecto que hemos observado, sin embargo la presencia de estos canales no se ha reportado en espermatozoides.

En cuanto a los resultados obtenidos con tapsigargina, encontramos que este compuesto inhibe las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas (figura 20). Probamos concentraciones ya reportadas de tapsigargina para inhibir a la SPCA1 (119), sin embargo encontramos que con concentraciones de 10-30 μ M aunque desaparecen las oscilaciones también se induce un alto porcentaje de RA. Mientras que bajas concentraciones (1 μ M) no afectan en lo más mínimo el comportamiento oscilatorio, con esta última concentración de tapsigargina se inhibe la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco endoplásmico (SERCA), lo cual sugiere que la SERCA no está involucrada en la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas que hemos registrado en espermatozoides.

En resumen, nuestros resultados muestran que la SPCA1 localizada particularmente en pozas internas de espermatozoides es un componente importante en la mediación de las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas, y que con 5 μ M de tapsigargina es posible inhibir dichas oscilaciones sin afectar considerablemente el proceso de RA.

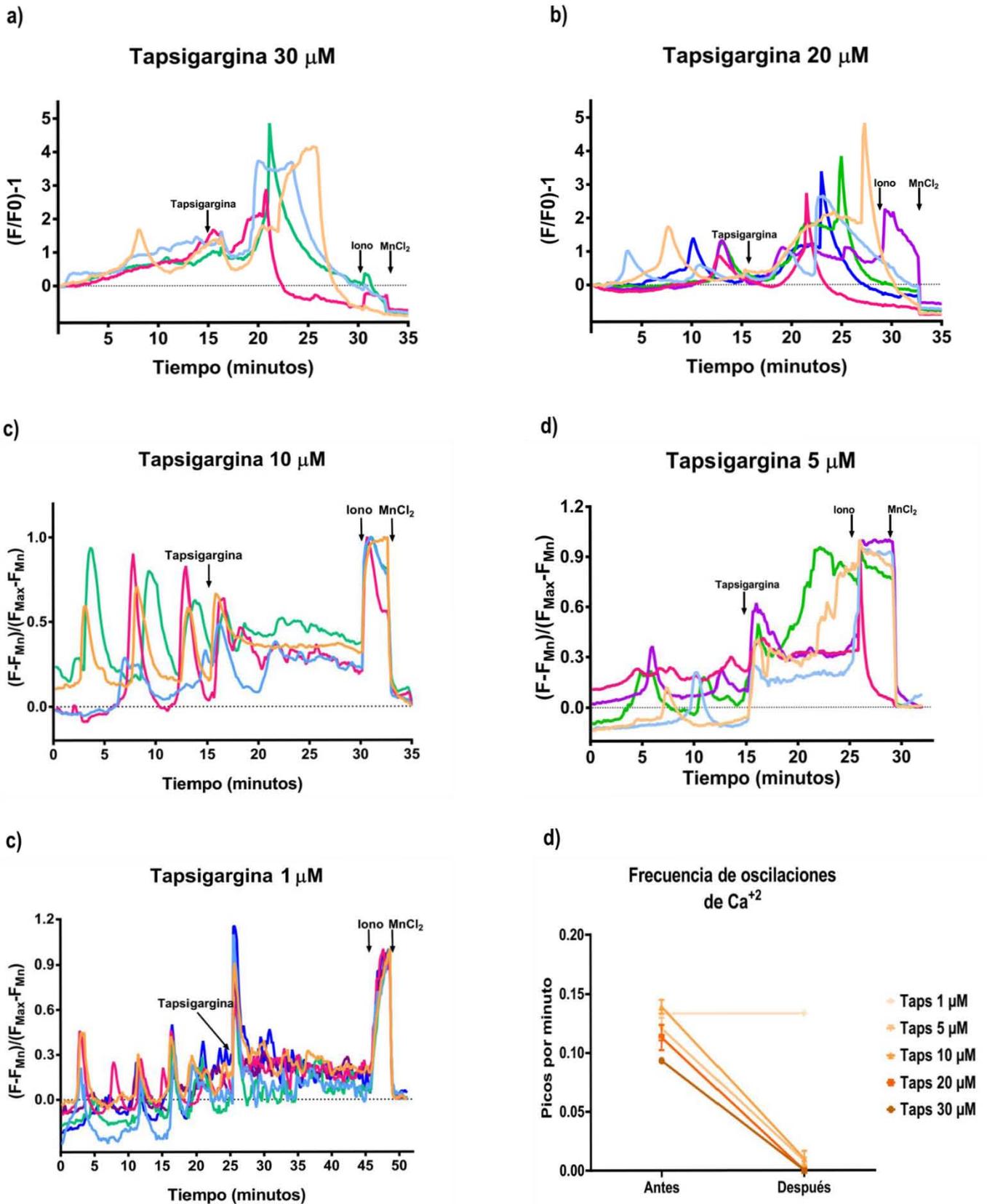


Figura 20. Tapsigargina inhibe las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas. Se muestran trazos representativos que ejemplifican la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ (Fluo 3: indicador de Ca^{2+}) observados en espermatozoides (cada línea de color representa un espermatozoide) capacitados a pH 6.5 durante 6 horas al agregar tapsigargina: 30 μM (a), 20 μM (b), 10 μM (c), 5 μM (d) y 1 μM (e). Las adiciones se realizaron a los 15 minutos: tapsigargina, a los 30 minutos: ionomicina 10 μM y a los 32.5 minutos: $MnCl_2$ 5 mM. Las gráficas

muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia contra el tiempo (minutos). Se muestra un experimento representativo (n=5). En f se muestra la frecuencia de las oscilaciones Ca^{2+} (como número de picos por minuto) observadas antes de la adición de taspigargina y después de su adición. Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n=5. Se realizó una prueba de t-student no pareada para comparar la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} antes y después de agregar el inhibidor. A excepción de taspigargina 1 μM , todas las diferencias resultaron significativas con valores de $p \leq 0.001$ (***).

Como hemos mostrado, distintas entidades moleculares están involucradas en mediar las oscilaciones de Ca^{2+} que hemos descrito, ya que los inhibidores que hemos probado afectan considerablemente la frecuencia de estas oscilaciones y en algunos casos las eliminan completamente (figura 21). Por lo cual, y debido a nuestra propuesta de que las oscilaciones previenen la RA, decidimos probar si al inhibirlas farmacológicamente podíamos ahora observar la RA inducida por progesterona.

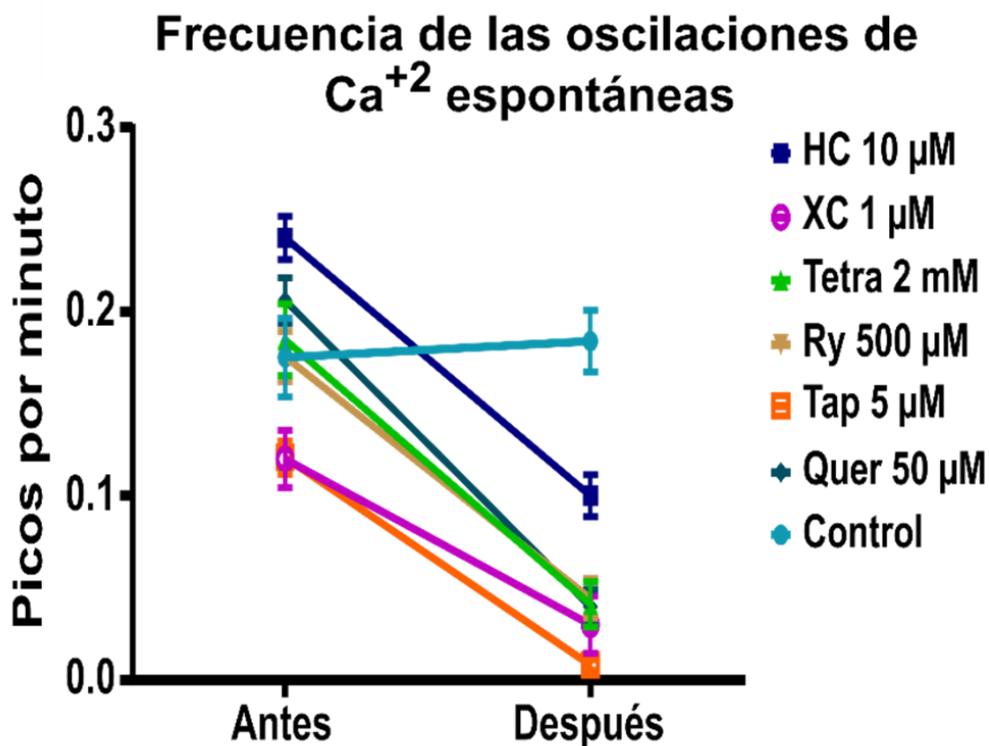


Figura 21. Canales de Ca^{2+} y Ca^{2+} -ATPasas están involucradas en la generación de oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas. Se muestra la frecuencia de las oscilaciones Ca^{2+} (como número de picos por minuto) observadas antes de la adición de MR, HC, Tetracaina, Rianodina, Quercetina, XC y Taspigargina y después de su adición. Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n=5. Se realizó una prueba de t-student no pareada para comparar la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} antes y después de agregar el inhibidor. A excepción de MR, todas las diferencias resultaron significativas con valores de $p \leq 0.001$ (***).

6.3.2. La inhibición farmacológica de las oscilaciones de Ca^{2+} a pH_e 6.5 restaura la habilidad de los espermatozoides de experimentar la RA cuando se exponen a progesterona.

Inhibimos las oscilaciones de Ca^{2+} espontaneas artificialmente con tetracaina 2 mM, rianodina 500 μ M y quercetina 50 μ M y posteriormente les agregamos progesterona 3 μ M a los espermatozoides y, dado que en las mismas células se monitoreo tanto la $[Ca^{2+}]_i$ como la RA (con el colorante FM4-64) fue posible encontrar que hay un porcentaje significativo de espermatozoides en los cuales, una vez que se bloquean las oscilaciones de Ca^{2+} y posteriormente se estimulan con progesterona, estos son capaces de experimentar la RA, incluso alcanzando porcentajes similares a los encontrados cuando los espermatozoides capacitados a pH_e 7.4 se exponen a la misma concentración de progesterona (figura 22).

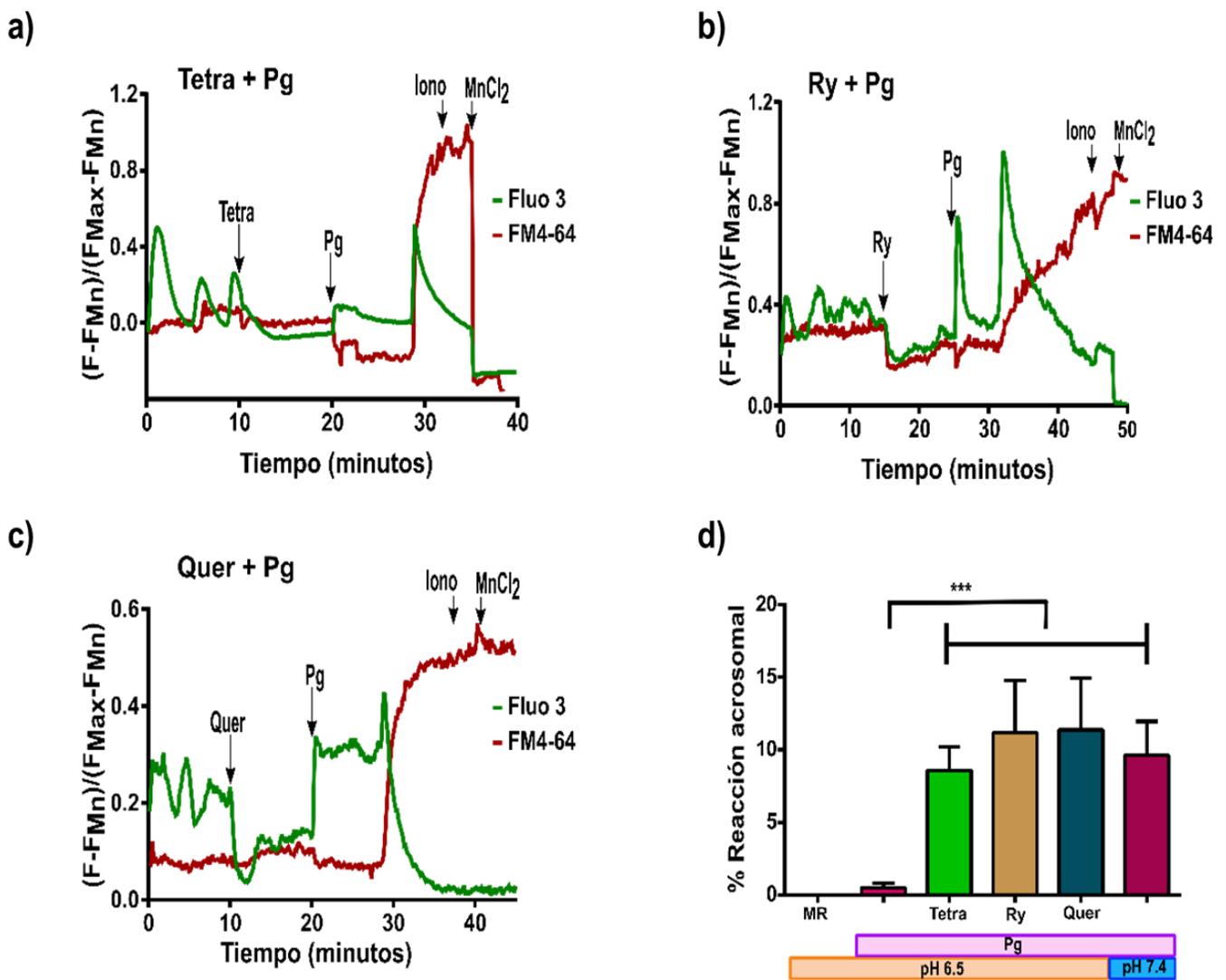


Figura 22. La inhibición farmacológica de las oscilaciones de Ca^{2+} observadas en espermatozoides capacitados a pH_e 6.5 restaura la habilidad de los espermatozoides de experimentar la RA en respuesta a progesterona. Trazos representativos de Ca^{2+} (Fluo-3) y RA (FM4-64) de espermatozoides antes y después de agregar tetracaina 2 mM: Tetra (a), rianodina 500 μ M: Ry (b) o 50 μ M quercetina: Quer (c), seguidos por 3 μ M de progesterona: Pg. d) Porcentaje de células experimentando la RA, en respuesta a: medio, 3 μ M Pg, 2 mM tetracaine+3 μ M Pg, 500 μ M ryanodine+3 μ M Pg, 50 μ M querctin+3 μ M Pg. El porcentaje de células que experimentan la RA inducida por 3 μ M Pg en espermatozoides capacitados en pH_e 7.4 se muestra para comparación. Los valores representan el promedio \pm SEM de 5 donadores independientes

(≥ 100 células se analizaron por experimento). Se indican las diferencias que resultaron significativas, $p \leq 0.001$ (***).

Estos resultados cobran relevancia desde el punto de vista fisiológico ya que se ha reportado que el pH del mucus cervical es un factor determinante en la interacción espermatozoide-mucus y que pHs ≤ 6.5 de este fluido están relacionados con problemas de infertilidad (121).

Respecto a las oscilaciones de Ca^{2+} , este tipo de comportamiento ya se ha reportado previamente en el espermatozoide de humano, solo que dicho comportamiento fue desencadenado por progesterona y se propuso estaba relacionado con cambios en los patrones de movilidad del espermatozoide (100). Mientras que en nuestro caso las oscilaciones de Ca^{2+} caracterizadas son espontáneas y es la primera vez que se ha estudiado en detalle la repercusión de estas sobre la RA.

Del conjunto de resultados obtenidos con las herramientas farmacológicas que utilizamos proponemos que el mecanismo responsable para la generación y mantenimiento de las oscilaciones de Ca^{2+} podría ser desencadenado por una entrada de Ca^{2+} externo y luego mantenido por un vaciamiento y llenado cíclico de pozas internas de Ca^{2+} , estos reservorios podrían ser la envoltura nuclear redundante, el acrosoma o las mitocondrias. La primera entrada de Ca^{2+} podría ser a través de CatSper (debido a su actividad basal) (107), posteriormente este ligero aumento en el Ca^{2+} citosólico podría activar a los RyR (122) y a la PLC δ (123), la activación de esta enzima generaría el IP $_3$ que a su vez activaría a los IP $_3$ R (124). La activación de estos dos canales provocaría un aumento en el Ca^{2+} citosólico, estos niveles altos de Ca^{2+} posteriormente serían removidos por las Ca^{2+} -ATPasas, PMCA4 y SPCA1 (Figura 23).

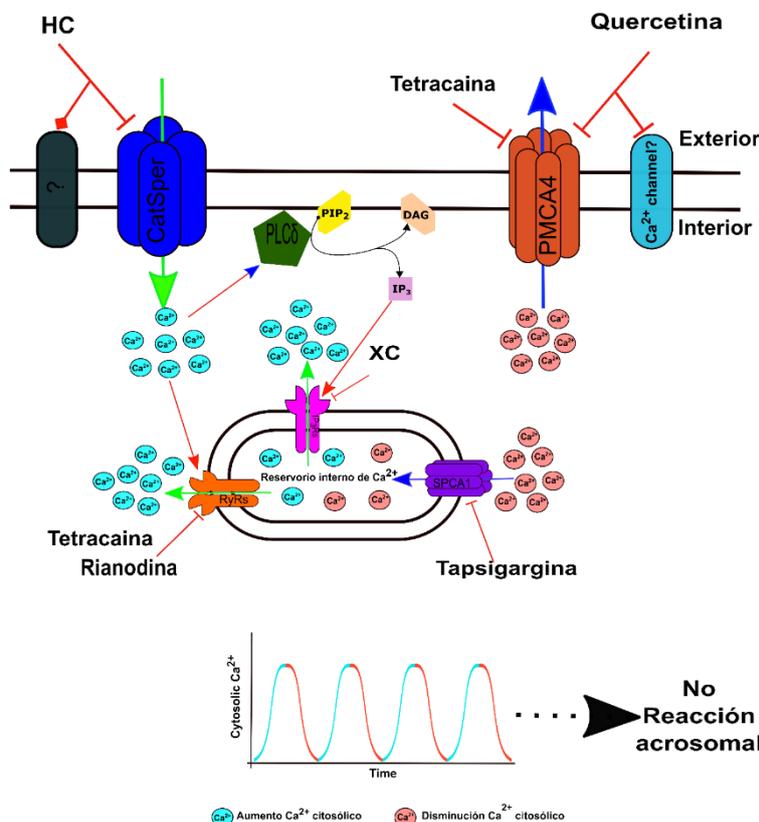


Figura 23. Mecanismo propuesto para la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas. Entrada de Ca^{2+} a través de CatSper (actividad basal) induce un ligero aumento en el Ca^{2+} citosólico, el cual activa al RyR y a la PLC δ , la activación de esta enzima genera IP $_3$, el cual es el activador de los IP $_3$ R. La activación de estos dos canales induce un aumento en el Ca^{2+} citosólico. Dicho aumento se disminuye a través de la acción de las Ca^{2+} -ATPasas, PMCA4 and SPCA1. Se muestran los inhibidores y se señalan sus blancos.

7. CONCLUSIONES

Mostramos que un medio capacitante con pH de 7.4 o superior (pH 8) promueve de manera más eficiente la capacitación ya que al incubar a los espermatozoides en dichos medios capacitantes durante 6 horas, observamos: mayor aumento en los niveles de Ca^{2+}_i , mayor porcentaje de hiperactivación y niveles mayores de fosforilación de proteínas en tirosinas. Con lo cual podemos sugerir que conforme los espermatozoides van avanzando en el tracto genital femenino hacia regiones donde el pH es más alcalino van adquiriendo las diferentes características que les proporcionan la habilidad de poder fecundar al ovulo, y que además al acercarse al ampulla, el sitio donde ocurre la fecundación y donde el pH es 8 la capacidad de los espermatozoides para fusionarse con el ovulo es un poco mejor que en pH 7.4. Esto es evidente aunque no es realmente significativo, lo cual sugiere que aunque a pH 7.4 los espermatozoides tienen la habilidad de fecundar y el estar en pH 8 se asegura el éxito en la fecundación.

En cuanto a los resultados de RA, encontramos que los pH_e s de capacitación que permiten que los espermatozoides sean capaces de experimentar este proceso de manera más eficiente son 7.4 y 8.0. Sin embargo, al no haber diferencias significativas entre los porcentajes de RA cuantificados en estas dos condiciones de capacitación podemos concluir que con capacitar a los espermatozoides a $pH \geq 7.4$ asegura que los espermatozoides están completamente preparados para llevar a cabo la RA.

Por otro lado, adicional al comportamiento oscilatorio de los niveles de Ca^{2+}_i inducidos por progesterona reportados previamente, observamos que GABA y PGE1 también son capaces de inducir oscilaciones de Ca^{2+}_i . De manera interesante este comportamiento oscilatorio es más frecuente cuando los espermatozoides se capacitan en pH_e 6.5. Esto lo observamos incluso en condiciones control (MR): oscilaciones espontáneas.

Los espermatozoides que presentan oscilaciones de Ca^{2+}_i no son capaces de experimentar RA, y esto concuerda perfectamente con el hecho de que cuando los espermatozoides se capacitan en pH_e 6.5 observamos los porcentajes más bajos de RA.

Al investigar que componentes moleculares podrían estar involucrados en la generación y mantenimiento de las oscilaciones de Ca^{2+}_i espontáneas, mediante herramientas farmacológicas encontramos que las oscilaciones de Ca^{2+}_i dependen de Ca^{2+}_e externo y se inhiben con HC (inhibidor de CatSper). Además también los receptores de rianodina y los IP_3R mostraron estar involucrados en este comportamiento oscilatorio. Por otra parte las Ca^{2+} ATPasas tanto de la membrana plasmática (PMCA4) como la encontrada en pozas internas (SPCA1) juegan un papel importante.

Demostramos el papel tan importante que juegan las oscilaciones de Ca^{2+}_i en el desencadenamiento de la RA, al mostrar que una vez que bloqueamos las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+}_i con tetracaina, rianodina y quercetina se logra que los espermatozoides capacitados en pH_e 6.5 sean capaces de experimentar la RA al exponerse a progesterona, alcanzando porcentajes similares a los producidos cuando la capacitación se lleva a cabo en pH_e 7.4 en respuesta a la misma concentración de progesterona.

Nuestros resultados demuestran que las características de las oscilaciones de Ca^{2+}_i en espermatozoides de humano están relacionadas con las condiciones del medio mantenidas durante capacitación. Sin embargo, los espermatozoides se enfrentan a varias condiciones dentro del tracto reproductor femenino, incluyendo una variedad de moduladores moleculares y cambios en el pH_e . En este trabajo, fijamos el pH_e a lo largo de todo el experimento; por lo cual valdría la pena estudiar como cambios graduales en el pH_e afectan la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ y la RA.

8. PERSPECTIVAS

Dado que las evidencias en las que mostramos que CatSper es una entidad molecular importante para la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} no son del todo contundentes debido a los efectos secundarios que provoca el inhibidor utilizado y por otra parte al hecho de que este canal es activo a pHs alcalinos, lo cual significaría que a pH 6.5 su actividad no podría ser la óptima, sería necesario utilizar algún otro inhibidor que más específico para comprobar la participación de este canal.

Además también sería importante investigar si algún otro canal es capaz de mediar el influjo de Ca^{2+} , por ejemplo el TRPV1, ya que se sabe que a pHs ácidos este canal podría activarse por temperaturas similares a las utilizadas en los registros. En este sentido valdría la pena probar si un inhibidor de este canal es capaz de inhibir las oscilaciones.

En lo referente al efecto contradictorio provocado por quercetina sobre los niveles de Ca^{2+} , sería importante probar algún otro inhibidor de la PMCA4 para corroborar la participación de esta Ca^{2+} ATPasa en la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} .

Por otro lado también sería importante estudiar como cambios graduales en el pH_e afectan la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la RA.

9. REFERENCIAS

1. 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.
2. Darszon, A., Acevedo, J.J., Galindo, B.E., Hernandez-Gonzalez, E.O., Nishigaki, T., Trevino, C.L., Wood, C., y Beltran, C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 131: 977-988.
3. 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.
4. 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. *Reproduction* 128: 425-437.
5. Suarez, S. S. 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 52: 455-462.
6. 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
7. 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 [Ca²⁺]_i oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem* 279: 46315-46325.
8. 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.
9. Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A., and Brewis I. A. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol.* 52: 473-480.
10. Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Treviño, C. L., Felix, R. Y Beltrán, C. 2005. Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *Int. Rev. Cytol.* 243:79-172.
11. 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.
12. Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization, in the physiology of reproduction. In Press, R., (Ed), New York. pp 189-317.
13. Leese HJ, Hugentobler SA, Gray SM, Morris DG, Sturmey RG, Whitear SL, Sreenan JM. 2008. Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod Fertil Dev.* 20:1-8.
14. Kaila, K. 1994. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 42:489-537.
15. 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.
16. Sieghart, W. 2006. Structure, pharmacology and function of GABA A receptor subtypes. *Adv. Pharmacol* 54:231-263.
17. Young, A. B. and Chu, D. 1990. Distribution of GABAA and GABAB receptors in mammalian brain: Potential targets for drug development. *Drug Dev. Res.*, 21: 161-167.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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 Biology*, 97-108.
22. 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.
23. Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387-391.
24. 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.
25. Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, Hill RZ, Bautista DM, Kirichok Y, Lishko PV. 2016. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sexhormone progesterone. *Science.* 29; 352 (6285): 555-9.
26. Miller SB. 2006. Prostaglandins in health and disease: an overview. *Semin Arthritis Rheum.* 36(1):37-49.
27. Bergstrom S, Sjoval J. The isolation of prostaglandin. *Acta Chem Scand* 1657;11:1086.

28. Meizel, S. & Turner, K. O. 1984. The effects of products and inhibitors of arachidonic acid metabolism on the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 231,283–288.
29. Joyce, C. L., Nuzzo, N. A., Wilson Jr., L. & Zaneveld, L. J. D. 1987. Evidence for a role of cyclooxygenase (prostaglandin synthetase) and prostaglandins in the sperm acrosome reaction and fertilization. *J. Androl.* 8,74–82.
30. Aitken, R. J., Irvine, S. & Kelly, R. W. 1986. Significance of intracellular calcium and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in the mechanisms by which prostaglandins influence human sperm function. *J. Reprod. Fertil.* 77,451–462.
31. Shimizu Y, Yorimitsu A, Maruyama Y, Kubota T, Aso T, Bronson RA. 1998. Prostaglandins induce calcium influx in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* Jun;4(6):555-61.
32. Schaefer M, Hofmann T, Schultz G, Gudermaun T. 1998. A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17;95(6):3008-13.
33. Espey, L. L. & Lipner, H. (1994) *The Physiology of Reproduction* eds. Knobil, E. & Neill, J. D. (Raven, New York), pp. 725–780.
34. Soom, A. V., Tanghe, S., Pauw, I. D. Kruif, A. 2002. Function of the Cumulus Oophorus Before and During Mammalian Fertilization. *Human Reproduction*, 151(C), 144-151.
35. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 4892-6.
36. Inouea N., Satouhb Y., Ikawa M., Okabea M., and Ryuzo Yanagimachi. 2011. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *PNAS.* 108(50):20008-11.
37. 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.
38. Harper CV, Cummerson JA, White MR, Publicover SJ, Johnson PM. Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J Cell Sci.* 2008. 121 (Pt 13): 2130-5.
39. Zoppino FC, Halón ND, Bustos MA, Pavarotti MA, Mayorga LS. 2012. Recording and sorting live human sperm undergoing acrosome reaction. *Fertil Steril.* 97(6):1309-15.
40. De Blas GA, Roggero CM, Tomes CN, Mayorga LS. 2005. Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol.* 3: e323.
41. Gaffield MA, Betz WJ. 2006. Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. *Nat Protoc.* 1: 2916-21.
42. Smith CB, Betz WJ. 1996. Simultaneous independent measurement of endocytosis and exocytosis. *Nature*, 380 (6574): 531-4.
43. Murthy VN, Stevens CF. 1998. Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle. *Nature.* 392:497-501.
44. Harata N., Pyle JL, Aravanis AM, Mozhayeva M, Kavalali ET, Tsien RW. 2001. Limited numbers of recycling vesicles in small CNS nerve terminals: implications for neural signaling and vesicular cycling. *Trends Neurosci.* 24(11):6.
45. Sánchez-Cárdenas, C. Servín-Vences, M.R. José, O. Treviño, C.L. Hernández-Cruz, A. Darszon, A. 2014. Acrosome Reaction and Ca²⁺ Imaging in Single Human Spermatozoa: New Regulatory Roles of [Ca²⁺]_i *Biology of Reproduction*, 91, 67.
46. Dickmann Z, Dziuk PJ. 1964. Sperm penetration of the zona pellucida of the pig egg. *J Exp Biol.* 41: 603-8.
47. Florman HM. 1994. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 165, 152-164.
48. Meizel S, Turner KO, Nuccitelli R. 1997. Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev Biol.* 187(1): 67-75.
49. Harper CV, Barrat CRL, Publicover SJ Kirkman-Brownm JC. 2006. Kinetics of the progesterone- induced acrosome reaction and its relation to intracellular calcium responses in individual human spermatozoa. *Biol Reprod.* 75, 933-939. 2006.
50. Tesarik J, Carreras A, Mendoza C. 1996. Single cell analysis of tyrosine kinase dependent and independent Ca²⁺ fluxes in progesterone induced acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* 2 (4): 225-232.
51. Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krahling M, Muller A, Kaupp UB, Strunker T. 2012. The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J.*;31:1654– 1665.
52. Li K, Ni Y, He Y, Chen WY, Lu JX, Cheng CY, Ge RS, Shi QX. 2013. Inhibition of sperm capacitation and fertilizing capacity by adjuvin is mediated by chloride and its channels in humans. *Hum Reprod.* 28:47-59.
53. O'Flaherty C, De Lamirande E, Gagnon C. 2004. Phosphorylation of the Arginine-X-X-(Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency. *Mol Hum. Reprod.* 10:355-363.
54. Orta G, Ferreira G, Jose O, Treviño CL, Beltrán C, Darszon A. 2012. Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that may participate in the acrosomal reaction. *J Physiol.* 590:2659-2675.

55. Malo, M. E. & Fliegel, L. 2006. Physiological role and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84, 1081-1095.
56. Casey, J. R. 2006. Why bicarbonate? *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 84, 930-939.
57. Bonar, P. T. & Casey, J. R. 2008. Plasma membrane Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers: structure, mechanism and physiology. *Channels (Austin, Tex)* 2, 337-345.
58. ang, X. F. et al. 2003. Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Nat Cell Biol* 5, 902-906.
59. Owen, D. H. & Katz, D. F. 2005. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J Androl.* 26, 459-469.
60. Cross, N. L. & Razy-Faulkner, P. 1997. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod.* 56, 1169-1174.
61. Fraire-Zamora, J. J. & Gonzalez-Martinez, M. T. 2004. Effect of intracellular pH on depolarization-evoked calcium influx in human sperm. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287, C1688-1696.
62. Florman, H. M., Tombes, R. M., First, N. L. & Babcock, D. F. 1989. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol.* 135, 133-146.
63. Demarco, I. A. Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE. 2003. Involvement of a Na⁺/HCO₃ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 278, 7001-7009.
64. Wang, D., King, S. M., Quill, T. A., Doolittle, L. K. & Garbers, D. L. 2003. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol* 5, 1117-1122.
65. Lishko, P. V., Botchkina, I. L., Fedorenko, A. & Kirichok, Y. 2010. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 140, 327-337.
66. Navarro B, Kirichok Y, Chung JJ, Clapham DE. 2008. Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int J Dev Biol.* 52:607–613.
67. Maas DH, Storey BT, Mastroianni L Jr. 1977. Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril.* 28(9):981-5
68. Rodriguez-Martinez H. 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenolog.* 1; 68 Suppl 1:S138-46.
69. M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 517–529.
70. E. Carafoli, L. Santella, D. Branca, M. Brini, Generation, control, and processing of cellular calcium signals, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36 (2001) 107–260.
71. Uhlén P. and Fritz N. 2010. Biochemistry of calcium oscillations. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 396: 28–32
72. P.O. Berggren, S.N. Yang, M. Murakami, A.M. Efanov, S. Uhles, M. Kohler, T. Moede, A. Fernstrom, I.B. Appelskog, C.A. Aspinwall, S.V. Zaitsev, O. Larsson, L.M. de Vargas, C. Fecher-Trost, P. Weissgerber, A. Ludwig, B. Leibiger, L. JunttiBerggren, C.J. Barker, J. Gromada, M. Freichel, I.B. Leibiger, V. Flockerzi, Removal of Ca²⁺ channel beta3 subunit enhances Ca²⁺ oscillation frequency and insulin exocytosis, *Cell* 119 (2004) 273–284.
73. J. Ferreira-Martins, C. Rondon-Clavo, D. Tugal, J.A. Korn, R. Rizzi, M.E. Padinlruegas, S. Ottolenghi, A. De Angelis, K. Urbanek, N. Ide-Iwata, D. D'Amario, T. Hosoda, A. Leri, J. Kajstura, P. Anversa, M. Rota, Spontaneous calcium oscillations regulate human cardiac progenitor cell growth, *Circ. Res.* 105 (2009) 764–774.
74. Y.V. Gorbunova, N.C. Spitzer, Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca²⁺ spikes, *Nature* 418 (2002) 93–96.
75. P. Uhlen, P.M. Burch, C.I. Zito, M. Estrada, B.E. Ehrlich, A.M. Bennett, Gain-of-function/Noonan syndrome SHP-2/Ptpn11 mutants enhance calcium oscillations and impair NFAT signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 2160–2165.
76. M. Chevalier, P. Lory, C. Mironneau, N. Macrez, J.F. Quignard, T-type Ca_v3.3 calcium channels produce spontaneous low-threshold action potentials and intracellular calcium oscillations, *Eur. J. Neurosci.* 23 (2006) 2321–2329.
77. P.J. Hanley, B. Musset, V. Renigunta, S.H. Limberg, A.H. Dalpke, R. Sus, K.M. Heeg, R. Preisig-Muller, J. Daut, Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 9479–9484.

78. N. Fritz, N. Macrez, J. Mironneau, L.H. Jeyakumar, S. Fleischer, J.L. Morel, Ryanodine receptor subtype 2 encodes Ca²⁺ oscillations activated by acetylcholine via the M2 muscarinic receptor/cADP-ribose signaling pathway in duodenum myocytes, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 2261–2270.
79. K. Mikoshiba, IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts, *J. Neurochem.* 102 (2007) 1426–1446.
80. R.L. Patterson, D. Boehning, S.H. Snyder, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 437–465.
81. I. Bezprozvanny, J. Watras, B.E. Ehrlich, Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum, *Nature* 351 (1991) 751–754.
82. R. Taufiq Ur, A. Skupin, M. Falcke, C.W. Taylor, Clustering of InsP₃ receptors by InsP₃ retunes their regulation by InsP₃ and Ca²⁺, *Nature* 458 (2009) 655–659.
83. Tsukioka M., Jino M. and Endo M. 1994. pH dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release in permeabilized smooth muscle cells of the guinea-pig. *Journal of Physiology*, 475(3):369-75.
84. R. Zalk, S.E. Lehnart, A.R. Marks, Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium, *Annu. Rev. Biochem.* 76 (2007) 367–385.
85. M. Endo, M. Tanaka, Y. Ogawa, Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres, *Nature* 228 (1970) 34–36.
86. J.W. Putney, Capacitative calcium entry: from concept to molecules, *Immunol. Rev.* 231 (2009) 10–22.
87. M.J. Berridge, The AM and FM of calcium signalling, *Nature* 386 (1997) 759–760.
88. D. Chin, A.R. Means, Calmodulin: a prototypical calcium sensor, *Trends Cell Biol.* 10 (2000) 322–328.
89. J. Lisman, H. Schulman, H. Cline, The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory, *Nat. Rev. Neurosci.* 3 (2002) 175–190.
90. G. Dupont, A. Goldbeter, CaM kinase II as frequency decoder of Ca²⁺ oscillations, *Bioessays* 20 (1998) 607–610.
91. O. Dyachok, O. Idevall-Hagren, J. Sagetorp, G. Tian, A. Wuttke, C. Arriemerlou, G. Akusjarvi, E. Gylfe, A. Tengholm, Glucose-induced cyclic AMP oscillations regulate pulsatile insulin secretion, *Cell Metab.* 8 (2008) 26–37.
92. J. Ferreira-Martins, C. Rondon-Clavo, D. Tugal, J.A. Korn, R. Rizzi, M.E. Padinluegas, S. Ottolenghi, A. De Angelis, K. Urbanek, N. Ide-Iwata, D. D'Amario, T. Hosoda, A. Leri, J. Kajstura, P. Anversa, M. Rota, Spontaneous calcium oscillations regulate human cardiac progenitor cell growth, *Circ. Res.* 105 (2009) 764–774.
93. P.J. Hanley, B. Musset, V. Renigunta, S.H. Limberg, A.H. Dalpke, R. Sus, K.M. Heeg, R. Preisig-Muller, J. Daut, Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 9479–9484.
94. M. Colella, F. Grisan, V. Robert, J. D. Turner, A. P. Thomas, T. Pozzan, Ca²⁺ oscillation frequency decoding in cardiac cell hypertrophy: role of calcineurin/NFAT as Ca²⁺ signal integrators, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 2859–2864.
95. Z. Feng, C. Wei, X. Chen, J. Wang, H. Cheng, X. Zhang, Q. Hong, S. Shi, B. Fu, R. Wei, Essential role of Ca²⁺ release channels in angiotensin II-induced Ca²⁺ oscillations and mesangial cell contraction, *Kidney Int.* 70 (2006) 130–138.
96. L. Desfrere, M. Karlsson, H. Hiyoshi, S. Malmersjo, E. Nanou, M. Estrada, A. Miyakawa, H. Lagercrantz, A. El Manira, M. Lal, P. Uhlen, Na, K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (2009) 2212–2217.
97. K. Campbell, K. Swann, Ca²⁺ oscillations stimulate an ATP increase during fertilization of mouse eggs, *Dev. Biol.* 298 (2006) 225–233.
98. C.M. Saunders, M.G. Larman, J. Parrington, L.J. Cox, J. Royse, L.M. Blayney, K. Swann, F.A. Lai, PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development, *Development* 129 (2002) 3533–3544.
99. Jackson C. Kirkman-Brown, Christopher L. R. Barratt and Stephen J. Publicover. 2004. Slow calcium oscillations in human spermatozoa. *Biochem. J.* 378, 827–832.
100. Harper C. V., Barratt C., and Publicover S. 2004. Stimulation of Human Spermatozoa with Progesterone Gradients to Simulate Approach to the Oocyte. *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 279, No. 44.
101. World Health Organization, WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen, Fifth, WHO Press, Switzerland, 2010.
102. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998; 13:2139–2146.
103. Battistone MA, Alvau A, Salicioni AM, Visconti PE, Da Ros VG, Cuasnicú PS. 2014. Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase A activation during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod.* 20(11):1054-66.

104. Ho K, Wolff CA., Suarez SS. CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod Fertil Dev*, 2009, vol. 21 (pg. 345-350).
105. Alasmari W, Barratt CL, Publicover SJ, Whalley KM, Foster E, Kay V, Martins da Silva S, Oxenham SK. 2013. The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Hum Reprod*. 28(4):866-76.
106. Visconti PE, Krapf D, de la Vega-Beltran JL, Acevedo JJ, Darszon A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*. 2011.13:395–405.
107. Y. Kirichok, B. Navarro, D.E. Clapham, Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel, *Nature*. 439 (2006) 737–740.
108. A.E. Carlson, L.A. Burnett, D. del Camino, et al., Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation, *PLoS One*. 4 (2009).
109. A.E. Carlson, L.A. Burnett, D. del Camino, et al., Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation, *PLoS One*. 4 (2009).
110. J.C. Chávez, J.L. De la Vega-Beltrán, O. José, et al., Acrosomal alkalization triggers Ca²⁺ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa, *J. Cell. Physiol*. (2017).
111. T. Takuma, B. L. Kuyatt, and B. J. Baum, "Calcium transport mechanisms in basolateral plasma membrane-enriched vesicles from rat parotid gland," vol. 227, pp. 239–245, 1985
112. M. P. Blaustein, R. W. Ratzlaff, N. C. Kendrick, and E. S. Schweitzer, "Calcium buffering in presynaptic nerve terminals. I. Evidence for involvement of a nonmitochondrial ATP-dependent sequestration mechanism.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 72, no. 1, pp. 15–41, 1978
113. Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Mochizuki M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. 2009. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol*. 26; 53(21):1993-2005.
114. Sosa C., Zanetti N., Pocognoni C., and Mayorga L. 2016. Acrosomal Swelling Is Triggered by cAMP Downstream of the Opening of Store Operated Calcium Channels During Acrosomal Exocytosis in Human Sperm. *Biology of Reproduction*. 94(3):57, 1–9.
115. Györke, S; Lukyanenko, V., Györke I. 1997. Dual effects of tetracaine on spontaneous sodium release in rat ventricular myocytes. 500 (2). *J Physiol*: 297–309.
116. E. Buck, I. Zimayni, J. J. Abramson, and I. N. Pessah, "Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 33, pp. 23560–23567, 1992.
117. K. M. Williams and W. C. L. Ford, "Effects of Ca-ATPase inhibitors on the intracellular calcium activity and motility of human spermatozoa," *Int. J. Androl.*, vol. 26, no. 6, pp. 366–375, 2003.
118. E. Carafoli, "Calcium pump of the plasma membrane," *Physiol. Rev.*, vol. 71, no. 1, p. 129, 1991.
119. C. Harper, L. Wootton, F. Michelangeli, L. Lefièvre, C. Barratt, and S. Publicover, "Secretory pathway Ca²⁺-ATPase (SPCA1) Ca²⁺ pumps, not SERCAs, regulate complex [Ca²⁺]_i signals in human spermatozoa," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. 8, pp. 1673–85, 2005.
120. M. Mukhopadhyay, A. Singh, S. Sachchidanand, and A. K. Bera, "Quercetin inhibits acid-sensing ion channels through a putative binding site in the central vestibular region," *Neuroscience*, vol. 348, pp. 264–272, 2017.
121. W. Eggert-Kruse, A. Köhler, G. Rohr, and B. Runnebaum, "The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction.," *Fertil. Steril.*, vol. 59, no. 3, pp. 617–28, 1993.
122. M. Fill and J. A. Copello, "Ryanodine Receptor Calcium Release Channels," *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 4, pp. 893–922, 2002.
123. K. Fukami, S. Inanobe, K. Kanemaru, and Y. Nakamura, "Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance," *Prog. Lipid Res.*, vol. 49, no. 4, pp. 429–437, 2010.
124. M. J. Berridge, "The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease," *Physiol. Rev.*, vol. 96, no. 4, pp. 1261–1296, 2016.