



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

**MODELOS MATEMÁTICOS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN
ACTIVADA POR QUIMIOATRAYENTES EN ESPERMATOZOIDES
DE ERIZO DE MAR**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

DANIEL ALEJANDRO PRIEGO ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS

**DR. GUSTAVO CARLOS MARTÍNEZ MEKLER
INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS**

COMITÉ TUTOR

**DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DR. OSBALDO RESENDIS ANTONIO
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

CUERNAVACA, MORELOS, SEPTIEMBRE DE 2018



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.

MODELOS MATEMÁTICOS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADA POR
QUIMIOATRAYENTES EN ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS

PRESENTA

DANIEL ALEJANDRO PRIEGO ESPINOSA
LICENCIADO EN CIENCIAS GENÓMICAS



Departamento de Fenómenos No Lineales y Complejidad
Instituto de Ciencias Físicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Septiembre de 2018 – Cuernavaca, Morelos



INSTITUTO DE
CIENCIAS
FÍSICAS

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

L.C.G. Daniel Alejandro Priego Espinosa presenta tesis: *Modelos matemáticos de la vía de señalización activada por quimioatrayentes en espermatozoides de erizo de mar*, para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO ©

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Gustavo Carlos Martínez Mekler, ICF, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Alberto Darszon Israel, IBT, UNAM

Dr. Osbaldo Resendis Antonio, INMEGEN

JURADO DE EXAMEN

Presidente: Dr. Maximino Aldana González, ICF, UNAM

Secretario: Dr. Alberto Darszon Israel, IBT, UNAM

Vocal: Dr. León David Islas Suárez, FACMED, UNAM

Vocal: Dr. Luis Antonio Mendoza Sierra, IIB, UNAM

Vocal: Dr. Markus Müller Bender, CINC, UAEM

LUGAR:

Cuernavaca, Morelos

FECHA:

Septiembre de 2018

RESUMEN

La fertilización es uno de los eventos más importantes para las especies que se reproducen sexualmente. Organismos con fertilización externa, tales como los erizos de mar, son excelentes modelos para el estudio de la reproducción. En estas especies, el movimiento del espermatozoide es controlado por una vía de señalización que se dispara por péptidos liberados del recubrimiento gelatinoso del huevo, conocidos como Sperm Activating Peptides (SAPs). La estimulación por SAP desencadena varios eventos electrofisiológicos y bioquímicos interrelacionados dentro del flagelo del espermatozoide de erizo de mar: aumento en la concentración de nucleótidos cíclicos (i. e. cGMP, cAMP) y del pH intracelular (pH_i), así como cambios en el potencial de membrana causados por flujos iónicos regulados de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} . Estos eventos culminan en la generación de fluctuaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), cuya dinámica controla el grado de simetría del batido flagelar, y éste a su vez dirige al espermatozoide. La composición y regulación de esta vía aún no se entiende por completo, principalmente debido a que las proteínas transportadoras, que controlan los flujos iónicos, sólo se han podido caracterizar *in vivo* mediante fármacos cuya especificidad no está garantizada al 100%. Por otra parte, desde el hallazgo reciente de que en flagelos de espermatozoides de erizo de mar se encuentra expresado CatSper (un canal de Ca^{2+} con dependencias funcionales únicas que lo separan de los canales clásicos dependientes de voltaje (Ca_V)), todavía no está claro cuánto contribuye éste y si otros canales de calcio también participan en esta vía.

Aquí, con base en un modelo de red lógica respaldado experimentalmente, se sugiere que CatSper es fundamental en la Vía de Señalización Activada por SAPs (VSAS), mientras que otros canales de Ca^{2+} aún podrían ser relevantes. Mediante cálculos en redes knock-out *in silico*, se argumenta que CatSper es el principal generador de oscilaciones de calcio en la vía y que otros canales de calcio, si están presentes, juegan papel auxiliar.

Con el fin de llevar el análisis a un nivel más cuantitativo en tiempo real y explorar las estequiometrías plausibles entre los canales sugeridos, se propuso de forma independiente un modelo de ecuaciones diferenciales, basado en formalismos de cinética enzimática y de Hodgkin & Huxley. Para calibrar y caracterizar el sistema, éste se dividió en: 1) un módulo disparador que liga la actividad de SAP con el cGMP y la respuesta temprana del potencial de membrana (V); 2) dos módulos alternativos que presentan uno de los canales de Ca^{2+} mencionados. Estas dos partes se enlazan mediante la variable V . Los módulos alternativos explican por separado las características típicas de la envolvente y el espaciamiento progresivo de los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$: en el primero, la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ depende de la acción concertada de canales tipo Ca_V y canales de K^+ Ca^{2+} -dependientes, BK; mientras que el segundo requiere del canal CatSper. Luego de resultados obtenidos tanto de variaciones controladas *in silico* en cGMP, pH_i y V , así como de la exploración de escenarios mixtos, se predice que dinámicas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ razonables se obtienen sólo con escenarios donde la aportación de CatSper al flujo total de calcio supera a la de Ca_V , dentro de ciertos límites. Los enfoques adoptados aquí permiten proponer mecanismos, que de otra forma serían difíciles de caracterizar sólo por procedimientos experimentales.

PUBLICACIONES

Algunas de las ideas, resultados y figuras de esta tesis fueron reportadas en las siguientes publicaciones:

- [1] Daniel Alejandro Priego-Espinosa, Alberto Darszon, Adán Guerrero, Ana Laura González-Cota, Takuya Nishigaki, Gustavo Martínez-Mekler y Jorge Carneiro. «Interplay scenarios between CatSper and CaV channels in sea urchin sperm flagellum signaling cascades triggered by egg peptides: a mathematical modelling approach». En: *bioRxiv* (2018). DOI: [10.1101/415687](https://doi.org/10.1101/415687).
- [2] Christopher Wood, Adan Guerrero, Daniel Priego-Espinosa, Gustavo Martínez-Mekler, Jorge Carneiro y Alberto Darszon. «Sea Urchin Sperm Chemotaxis». En: *Flagellar Mechanics and Sperm Guidance*. Ed. por Jacky Cosson. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2015. Cap. 2, págs. 135-182. ISBN: 978-1-68108-129-8. DOI: [10.2174/9781681081281115010007](https://doi.org/10.2174/9781681081281115010007).
- [3] Jesús Espinal-Enríquez, Daniel Alejandro Priego-Espinosa, Alberto Darszon, Carmen Beltrán y Gustavo Martínez-Mekler. «Network model predicts that CatSper is the main Ca²⁺-channel in the regulation of sea urchin sperm motility.» En: *Scientific reports* 7.1 (2017), pág. 4236. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/s41598-017-03857-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-03857-9).

En [3], Jesús Espinal-Enríquez y Daniel Alejandro Priego-Espinosa son primer autor.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes instituciones:

- Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.
- A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) UNAM y al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero otorgado para realizar la presente investigación a través de los proyectos IN112514 y 255914, respectivamente.
- Al CONACyT, por la beca de manutención otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (agosto de 2012 a julio de 2017, número de beca 275795); por la beca otorgada por el proyecto 255914 (Agosto de 2017 a Enero de 2018), y por la beca mixta para realizar una estancia de investigación en el Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC), Portugal (Septiembre de 2013 a Marzo de 2014).
- A la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) de la UNAM por el financiamiento complementario otorgado para la realización de estancias de investigación en el IGC, Portugal: Septiembre-Diciembre de 2013 y Febrero-Mayo de 2015 a través del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), y Septiembre-2013 a Marzo-2014 por el Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes.

De igual manera agradezco y reconozco a los siguientes académicos y colegas por el apoyo brindado a lo largo de la realización de la presente investigación:

- A mi asesor *Gustavo Martínez Mekler*, por todo el apoyo y generosidad en todo momento para permitirme lograr este grado; por todas las enseñanzas que compartió conmigo y siempre expandir mis intereses.
- A los miembros de mi comité tutor. Gracias a *Alberto Darszon*, por su estímulo constante, el apoyo y guía tan cercana durante la realización de este proyecto. Gracias a *Osbaldo Resendis*, por las observaciones y comentarios tan acertados en cada reunión semestral.
- A *Jorge Carneiro*, por sus atenciones durante los meses que trabajé con él en el Instituto Gulbenkian de Ciência, por contagiarme de su entusiasmo y enseñarme a siempre procurar pensar fuera de lo usual.
- A *Jesús Espinal*, por toda la ayuda brindada durante el inicio de este proyecto; su experiencia y retroalimentación fue invaluable para adentrarme en un campo que era nuevo para mí.
- A *Adán Guerrero* y *Ana Laura González* quienes proporcionaron mediciones experimentales de $[Ca^{2+}]_i$ en célula única que facilitaron la calibración del modelo continuo.

- A los miembros del jurado designado para la revisión crítica del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones, los cuales enriquecieron la versión final de esta tesis.

Finalmente, en mis agradecimientos personales quiero mencionar a quienes me apoyaron fuera del ámbito académico:

- A mi novia *Tania*, por su compañía constante y los ánimos que me brindó durante la etapa más desafiante de este proyecto. Gracias por creer en mí y siempre procurar mi felicidad.
- A mi familia, por todos y cada uno de los sacrificios que hicieron para que yo pudiera llegar hasta este punto y alcanzar este logro tan importante.

ÍNDICE GENERAL

I ORIGEN

| | | |
|-------|---------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1 | Marco teórico | 3 |
| 1.1.1 | Descripción del fenómeno biológico | 3 |
| 1.1.2 | Vía de señalización activada por SAPs | 6 |
| 1.2 | Antecedentes de modelación | 10 |
| 2 | OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 | Planteamiento del problema | 15 |
| 2.2 | Objetivo general | 16 |
| 2.3 | Objetivos particulares | 16 |

II MODELO DISCRETO

| | | |
|-------|---|----|
| 3 | MODELO DISCRETO | 21 |
| 3.1 | Antecedentes y motivación | 21 |
| 3.1.1 | Propuesta anterior para la VSAS | 21 |
| 3.1.2 | Limitaciones del modelo propuesto anteriormente | 22 |
| 3.2 | Metodología | 22 |
| 3.2.1 | Definición del modelo | 22 |
| 3.2.2 | Implementación de las simulaciones | 23 |
| 3.3 | Resultados | 25 |
| 3.3.1 | CatSper podría participar en la generación del patrón oscilatorio de $[Ca^{2+}]_i$ en la VSAS | 25 |
| 3.3.2 | CatSper juega un papel central en la VSAS | 27 |
| 3.3.3 | Sobre la dependencia PDE | 28 |
| 3.3.4 | Sobre la dependencia del pH_i | 30 |
| 3.3.5 | El Modelo III resuelve una falla de la predicción del modelo anterior para la eliminación del nodo CaKC | 30 |
| 3.4 | Resumen de observaciones sobresalientes | 33 |

III MODELO CONTINUO

| | | |
|-------|---|----|
| 4 | MODELO CONTINUO | 37 |
| 4.1 | Antecedentes y motivación | 37 |
| 4.2 | Metodología | 38 |
| 4.2.1 | Plataforma de modelación general | 38 |
| 4.2.2 | Implementación computacional y estimación de parámetros | 41 |
| 4.2.3 | Parametrización en escenarios mixtos | 42 |
| 4.2.4 | Consideraciones para el sistema en reposo y condiciones iniciales | 43 |
| 4.3 | Resultados | 43 |
| 4.3.1 | Una red de señalización modular | 43 |
| 4.3.2 | Módulo disparador de la respuesta activada por SAP | 44 |

| | | |
|--------------------------|---|-----|
| 4.3.3 | Dos módulos de señalización candidatos pueden explicar la estructura de los trenes de oscilaciones de calcio | 45 |
| 4.3.4 | Los módulos Ca_V+BK y $CatSper+sNHE$ predicen respuestas distintivas ante manipulaciones controladas del pH_i y V | 55 |
| 4.3.5 | El módulo $CatSper + sNHE$ se complementa por el módulo Ca_V+BK en bajas estequiometrías | 57 |
| 4.4 | Resumen de observaciones sobresalientes | 61 |
| IV RECAPITULACIÓN | | |
| 5 | DISCUSIÓN | 65 |
| 5.1 | Modelo discreto | 65 |
| 5.2 | Modelo continuo | 66 |
| 5.2.1 | Eventos tempranos de la vía | 66 |
| 5.2.2 | Dinámica general de la señal de calcio | 67 |
| 5.2.3 | Criterios basados en otras variables del modelo para distinguir módulos de calcio | 68 |
| 5.2.4 | Biestabilidad | 70 |
| 5.2.5 | Escenarios mixtos | 71 |
| 6 | CONSIDERACIONES FINALES | 75 |
| V APÉNDICES | | |
| A | MODELO DISCRETO | 81 |
| A.1 | Evaluación de la robustez de $CatSper$ | 81 |
| B | MODELO CONTINUO | 83 |
| B.1 | Modelación de los componentes de señalización y canales | 83 |
| B.1.1 | Receptores de SAP y guanilato ciclasa | 83 |
| B.1.2 | Canal de K^+ dependiente de nucleótidos cíclicos | 84 |
| B.1.3 | Canal activado por hiperpolarización y modulado por nucleótidos cíclicos | 85 |
| B.1.4 | Intercambiador sodio/protón electroneutral de espermatozoide | 86 |
| B.1.5 | Canales de calcio voltaje-dependientes | 87 |
| B.1.6 | Canales $CatSper$ | 88 |
| B.1.7 | Canales de potasio de alta conductancia | 90 |
| B.2 | Compendio de ecuaciones | 90 |
| B.2.1 | Módulo disparador | 90 |
| B.2.2 | Módulo Ca_V+BK | 91 |
| B.2.3 | Módulo $CatSper+sNHE$ | 91 |
| B.2.4 | Ecuaciones de acoplamiento de módulos | 91 |
| B.3 | Variables, funciones intermedias y valores de parámetros | 92 |
| B.4 | Calibración | 100 |
| B.5 | Simulación de un pulso despolarizante antecedido por un pulso hiperpolarizante | 103 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 105 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|-----|
| Figura 1.1 | Respuesta sensoriomotriz en el espermatozoide de erizo de mar para localizar un huevo conespecífico | 4 |
| Figura 1.2 | Regulación de la quimiotaxis de espermatozoides de erizo de mar por medio del calcio | 5 |
| Figura 1.3 | Mediciones de la dinámica de calcio intraflagelar en célula única | 7 |
| Figura 1.4 | Panorama actual de la vía de señalización activada por SAP | 8 |
| Figura 1.5 | Estructura general de los canales de Ca^{2+} presentes en el flagelo de espermatozoides de erizo de mar | 9 |
| Figura 1.6 | Modelo de red lógica discreta para la <i>VSAS</i> , propuesto anteriormente por Espinal et al. | 12 |
| Figura 3.1 | Vía de señalización de acuerdo con el Modelo II y Red Lógica de la <i>VSAS</i> | 26 |
| Figura 3.2 | Series de tiempo de $[Ca^{2+}]_i$ bajo el bloqueo de HVA-LVA y CatSper. | 27 |
| Figura 3.3 | Diagrama de red del Modelo III | 28 |
| Figura 3.4 | Series de tiempo de $[Ca^{2+}]_i$ en redes sin PDE. | 29 |
| Figura 3.5 | Series de tiempo de $[Ca^{2+}]_i$ eliminando el cambio de pH_i | 31 |
| Figura 3.6 | Series de tiempo de $[Ca^{2+}]_i$ eliminando el nodo CaKC | 32 |
| Figura 3.7 | Comparación de los Modelos I, II y III | 34 |
| Figura 4.1 | Modelo cinético de la vía de señalización activada por <i>SAPs</i> | 44 |
| Figura 4.2 | Solución numérica del módulo disparador con $S(0)=25\text{ nM}$ | 46 |
| Figura 4.3 | Trenes de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ provocados por SAP en flagelos de espermatozoides de erizo de mar y su modelación. | 47 |
| Figura 4.4 | Dinámica del modelo que acopla el módulo que Ca_V+BK con el módulo disparador. | 49 |
| Figura 4.5 | Análisis de bifurcación del modelo con el módulo $Ca_V + BK$ | 50 |
| Figura 4.6 | Dinámica del modelo que acopla el módulo CatSper + sNHE con el módulo disparador. | 53 |
| Figura 4.7 | Análisis de bifurcación del modelo con el módulo CatSper + sNHE | 54 |
| Figura 4.8 | Los módulos Ca_V+BK y CatSper+sNHE predicen respuestas distintas a la manipulación del pH intraflagelar. | 56 |
| Figura 4.9 | Los módulos Ca_V+BK y CatSper+sNHE predicen respuestas distintas a la manipulación del potencial de membrana. | 57 |
| Figura 4.10 | Titulación de Ca_V sobre el módulo CatSper+sNHE. | 58 |
| Figura 4.11 | Titulación de BK sobre el módulo CatSper+sNHE. | 59 |
| Figura 4.12 | Titulación del módulo Ca_V+BK sobre el módulo CatSper+sNHE. | 60 |
| Figura A.1 | Matrices de correlación de las redes mutantes que resultan de perturbar la función reguladora de CatSper | 82 |
| Figura B.1 | Cinética de la concentración de cGMP provocada por diferentes concentraciones de SAP | 100 |
| Figura B.2 | Calibración de los parámetros de compuerta de spHCN | 101 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figura B.3 | Calibración de la compuerta pH- y voltaje-dependiente de CatSper . | 102 |
| Figura B.4 | Simulación de un pulso hiperpolarizante seguido de un pulso despolarizante | 103 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabla 2.1 | Resumen de evidencia experimental en erizos de mar sobre canales de calcio propuestos en la VSAS | 16 |
| Tabla 3.1 | Tabla de verdad de cGMP | 24 |
| Tabla 3.2 | Resumen comparativo de observaciones en simulaciones vs. experimento, para las tres variantes del modelo discreto | 33 |
| Tabla B.1 | Variables, funciones intermedias y valores de parámetros | 93 |

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| SAP | Sperm Activating Peptide |
| VSAS | Vía de Señalización Activada por SAPs |
| cGMP | Cyclic guanosine monophosphate |
| cAMP | Cyclic adenosine monophosphate |
| AN | Ácido Niflúmico |
| IBMX | 3-Isobutil-1-metilxantina |
| PDE | Phosphodiesterase |
| LVA | Low-voltage-activated calcium channel |
| HVA | High-voltage-activated calcium channel |
| CatSper | Cation channels of sperm |
| KCNG | K ⁺ -selective, cyclic nucleotide-gated channel |
| spHCN | Sea urchin sperm hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel |
| sNHE | Sperm-specific electroneutral sodium/proton exchanger |
| Ca _v | Voltage-gated calcium channel |

BK Big-conductance potassium channel

HH Hodgkin & Huxley

Parte I

ORIGEN

INTRODUCCIÓN

So, anyone out there [...] who have successfully tried IVF, and especially any of the estimated five million or more people who now exist because of such assisted reproductive technology—thank sea urchins. All of those innovations stand on the shoulders of a basic understanding of what actually happens when sperm and egg collide. And we know that from studying sea urchins.

MARAH J. HARDT, *Sex in the sea*, 2016 [1]

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 Descripción del fenómeno biológico

La fertilización es un evento primordial para las especies con reproducción sexual, el cual requiere del encuentro exitoso entre un gameto masculino (espermatozoide) con un gameto femenino (óvulo). El espermatozoide es una de las pocas células que abandona el cuerpo de un organismo para ejercer una sola función fuera de éste¹: depositar su material genético en el óvulo para dar origen a un nuevo ser. Este evento tan fundamental para la vida requiere de que el espermatozoide, una vez liberado al medio, lleve a cabo una secuencia de procesos controlados por mecanismos bioquímicos finamente regulados: 1) la maduración y adquisición de la motilidad, 2) el nado mediado por señales del medio para encontrar al óvulo, y 3) la fusión con éste último.

La investigación sobre la fertilización ha sido intensiva en erizos de mar desde hace más de dos siglos, ya que ofrece ventajas en el laboratorio que lo han situado como un excelente modelo de estudio en la biología del desarrollo. Entre estas ventajas se puede mencionar que, al ser un organismo de fertilización externa, es sencillo reproducir las condiciones del medio en que suceden la secuencia de procesos antes mencionada; por otro lado, los procedimientos para coleccionar gametos son prácticos, además de que se pueden obtener grandes cantidades de éstos por cada individuo. En una sola emisión, una hembra puede liberar del orden de 10^6 óvulos, mientras que un macho puede eyacular cerca de 10^{11} espermatozoides, una cantidad equivalente a lo que producirían mil hombres.

En invertebrados marinos con fertilización externa, como los erizos de mar, hembras y machos liberan sincronizadamente sus gametos en el mar. Para alcanzar el huevo, los espermatozoides se propulsan en el medio valiéndose de una estructura subcelular conocida como flagelo, el cual es un organelo que los provee con motilidad y es altamente conservado en todo los organismos eucariotas. Sin embargo, las corrientes del mar y el efecto de la dilución de los gametos, pueden representar una desventaja para el encuentro entre éstos;

¹ Esto es cierto en organismos con fertilización interna. En el caso de la fertilización externa, el óvulo también es expulsado y el encuentro entre gametos sucede en el medio externo

además, los espermatozoides cuentan con una ventana de tiempo de aproximadamente un par de horas para fertilizar un huevo antes de perder su viabilidad. No obstante, para contender con estos obstáculos aparentes, a lo largo de la evolución surgió una adaptación como estrategia para favorecer la probabilidad de encuentro más allá de lo esperado por simple azar.

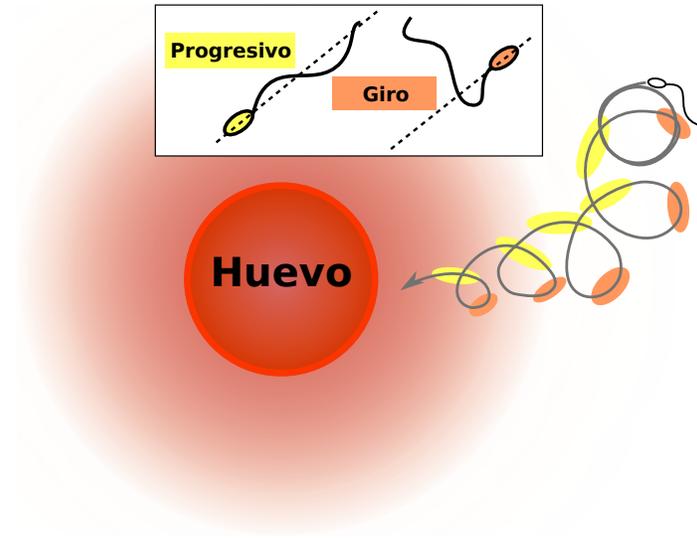


Figura 1.1: **Respuesta sensoriomotriz en el espermatozoide de erizo de mar para localizar un huevo conespecífico.** La capa gelatinosa que recubre al huevo contiene péptidos pequeños conocidos como Sperm Activating Peptides (SAPs), los cuales se desprenden y difunden formando un gradiente de concentración alrededor de dicha célula. La señal dada por el patrón espacial de SAP es interpretada por los espermatozoides para guiar su nado más fácilmente hacia el huevo. En ausencia del quimioatrayente, los espermatozoides describen una trayectoria circular con un radio más o menos constante cuando nadan confinados a una superficie, mientras que en tres dimensiones el tipo de movimiento es helicoidal. Cuando los espermatozoides se enfrentan al gradiente de SAP, muestran un patrón de movimiento que se caracteriza por giros pronunciados (marcados en naranja), causados por una marcada curvatura asimétrica del flagelo, intercalados por episodios de nado más progresivo (marcados en amarillo), provocados por un batido flagelar más simétrico, el cual genera trayectorias con un radio de curvatura mayor que en el nado basal. La temporalidad coordinada de este patrón de movimiento con respecto a la posición espacial del espermatozoide dentro del gradiente, llevará al eventual encuentro entre gametos. Modificado de [2].

Una vez que la motilidad se activa en el medio externo, el espermatozoide responde a señales moleculares del huevo, las cuales forman un gradiente de concentración al rededor de éste último y guían el nado del primero. Este tipo de movimiento dirigido se conoce como quimiotaxis. En el caso del erizo de mar, la membrana del huevo está cubierta por una capa de gelatina que contienen péptidos conocidos genéricamente como Sperm Activating Peptides (SAPs), los cuales se desprenden y difunden en el medio. La respuesta a SAP guarda un cierto nivel de especificidad molecular, ya que dependiendo del orden y género al que pertenecen las especies de erizo de mar, puede haber variaciones tanto en la secuencia de aminoácidos que codifica el SAP correspondiente [3] como en el grado de reactividad que presentan los espermatozoides a quimioatrayentes de otras especies [4]. Por ejemplo, en las especies más estudiadas en el laboratorio, *Strongylocentrotus purpuratus*

y *Lytechinus pictus*, los espermatozoides sólo responden al SAP speract [5], un decapeptido; mientras que en *Arbacia punctulata* (la primera especie de erizo de mar donde se describió la quimiotaxis), el quimioatrayente es resact, un tetradecapeptido [6]. El patrón de nado estereotípico que muestran los espermatozoides estimulados por SAP, consiste de una serie de giros pronunciados intercalados con episodios de nado casi recto (Figura 1.1). Cabe resaltar que la escala de tiempo en que se desarrollan estas trayectorias es del orden de segundos, y más aún, la duración de los modos de nado descritos es de apenas unas cuantas décimas de segundo. La localización del huevo por parte de los espermatozoides dependerá de la correcta coordinación entre este patrón de movimiento y el estímulo periódico de SAP [5, 7].

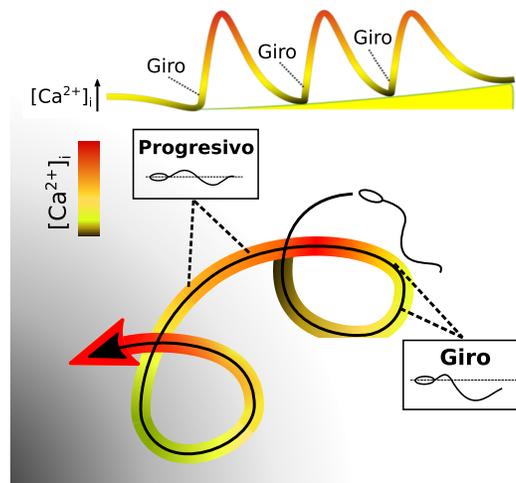


Figura 1.2: **Regulación de la quimiotaxis de espermatozoides de erizo de mar por medio del calcio.** Se esquematiza la trayectoria (línea negra) de un espermatozoide nadando en un gradiente de quimioatrayente, cuya fuente está en la parte inferior izquierda (fondo gris). Cuando el espermatozoide se desplaza con dirección hacia la mayor concentración, la activación de los receptores de SAP de su flagelo va incrementando, lo cual predispone a que el flagelo experimente un aumento transitorio de la concentración de calcio interna $[Ca^{2+}]_i$ luego de que la trayectoria del espermatozoide comienza a ir en contra del gradiente. Los niveles de calcio intraflagelar durante la trayectoria quimiotáctica se indican con un código de colores que va de negro (concentración baja) a rojo (concentración alta); en la parte superior se dibuja un trazo temporal correspondiente. De la misma forma como en la Figura 1.1, se señala las coincidencias de giros pronunciados con un batido flagelar asimétrico, y de episodios de nado más progresivo con un flagelo que se dobla más simétricamente. Es de notar que los giros tienen lugar al comienzo del aumento del $[Ca^{2+}]_i$, mientras que los episodios de nado progresivo ocurren cuando los niveles de calcio van en descenso desde los picos de concentración alcanzados. De esta forma, se establece una secuencia de giros quimiotácticos que viene dada por la transducción de un estímulo extracelular de SAP en una señal interna de calcio.

Cuando el espermatozoide es estimulado por SAP, una señal de calcio se desencadena al interior del flagelo, la cual consiste de trenes de oscilaciones en la concentración de dicho catión [8, 9]. Estas fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ se correlacionan con cambios en el comportamiento de natación del espermatozoide. Cuando los flagelos detectan aumentos en la tasa de influjo de Ca^{2+} , su batido se vuelve asimétrico y el espermatozoide experimenta giros

pronunciados, mientras que la extrusión de calcio produce un batido flagelar más simétrico y por consecuencia una trayectoria más progresiva [5, 10, 11]. Por lo anterior, resultan fundamental que estas elevaciones transitorias de calcio sucedan con una temporalidad adecuada con respecto de la dinámica del estímulo que va enfrentando el espermatozoide a lo largo de la exploración del gradiente. De esta forma, la transducción de la señal de SAP en un tren de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ constituye un mecanismo mediante el cual un patrón espacial, dado por el gradiente del quimioatrayente, es interpretado y codificado internamente por el espermatozoide mediante un patrón temporal, a través de la señal de calcio (Figura 1.2).

Vale la pena mencionar que, si bien los trenes de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ son típicos de trayectorias quimiotácticas, éstos no están condicionados a la existencia de un estímulo periódico como sucede durante la exploración de un gradiente de SAP. De hecho, se ha observado que en células fijadas sobre una superficie, y estimuladas con una concentración homogénea de SAP, también se produce una serie de picos de calcio con una organización temporal típica, caracterizada por una disminución gradual de la amplitud de los picos y un aumento progresivo de los intervalos entre picos consecutivos (Figuras 1.3A y 4.3). Esto da una idea de la existencia de un oscilador interno, el cual desempeña una función esencial en el nado del espermatozoide cuando se acopla con un estímulo periódico.

1.1.2 Vía de señalización activada por SAPs

Los espermatozoides son células altamente especializadas, y a diferencia de la mayoría de tipos celulares, las maquinarias de transcripción y traducción se encuentran inactivas o prácticamente inexistentes en ellos; es por esto que, para efectos de la escala temporal en que suceden sus funciones básicas, el número de componentes proteínicos que lo conforman pueden considerarse estables en el tiempo. Por otro lado, la capacidad que muestran estas células de reaccionar rápidamente ante los cambios del medio, tal como sucede en la quimiotaxis, depende principalmente de procesos de señalización mediados por segundos mensajeros y flujos iónicos; este tipo de procesos toman lugar a escalas de tiempo más rápidas (fracciones de segundo) que los procesos llevados a cabo por redes de regulación genética (minutos a horas). Más específicamente, con respecto a los eventos moleculares que subyacen la generación de la señal de $[Ca^{2+}]_i$, estos toman lugar en el flagelo. La figura 1.4 muestra un esquema general de las relaciones moleculares que componen la VSAS.

Las moléculas de SAP pueden unirse directamente a una guanilato ciclasa de membrana (resact [13]) o a un receptor asociado a ella (speract [14, 15]); en respuesta al ligando natural, la estimulación de la actividad de guanilato ciclasa genera una señal de cGMP [6]. El aumento en la concentración de cGMP conduce a la apertura de canales de K^+ regulados por nucleótidos cíclicos (KCNG / CNGK) que produce un flujo saliente de K^+ y por consiguiente hiperpolariza la membrana ([16, 17]. A su vez, esta hiperpolarización promueve la apertura de canales activados por hiperpolarización y modulado por nucleótidos cíclicos (spHCN) que conducen una corriente catiónica que ejerce el efecto opuesto sobre el potencial de membrana, repolarizándolo [18].

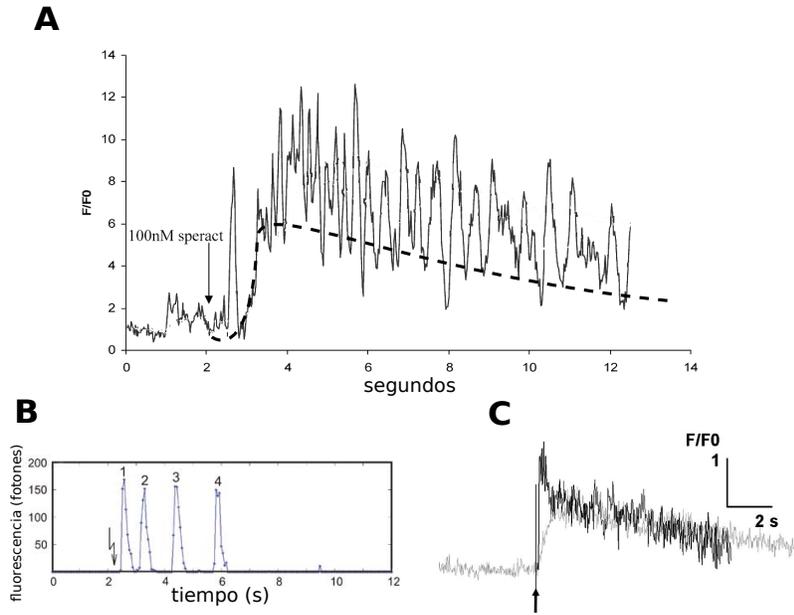


Figura 1.3: **Mediciones de la dinámica de calcio intraflagelar en célula única.** Se muestran trazos temporales de una señal de fluorescencia generada por la unión específica entre un colorante y iones calcio; ésta da una estimación del aumento relativo de la $[Ca^{2+}]_i$ con respecto al nivel basal. (A) Medición en un espermatozoide fijado de *S. purpuratus*, donde la solución que contiene el SAP speract se añade en el tiempo indicado por la flecha; la línea discontinua ilustra el componente tónico de la respuesta, sobre el cual se superpone el componente fásico que corresponde a todas las fluctuaciones (modificado de [8]). (B,C) Mediciones de espermatozoides nadando libremente estimulados con análogo de cGMP desenjaulable; la flecha indica el instante cuando se incide el haz de luz UV para liberar el cGMP activo. La serie de tiempo en B corresponde a la especie *A. punctulata*, y C a *S. purpuratus* (modificado de [9] y [10], respectivamente). En C, la curva negra corresponde a la medida del flagelo, y la línea gris corresponde a la cabeza

Se han reportado transcritos de canales clásicos de calcio dependientes de voltaje, en tejido testicular de *S. purpuratus*: $Ca_V1.2$, $Ca_V2.3$ y Ca_V3 [18, 19]; este tipo de canales se encontrarían ampliamente representados en otras células excitables (Figura 1.5A). De éstos, sólo los canales $Ca_V1.2$ fueron inmunodetectados en los flagelos de los espermatozoides de esta especie [19] y posteriormente se detectó un transcrito de Ca_V de tipo T (Ca_V3) en tejido de testículo [18]. En este contexto, resulta sensato considerar que la caída transitoria del potencial de membrana podría eliminar la inactivación de éste último canal para que luego se active por la repolarización inducida por spHCN.

Por otro lado, CatSper, un canal de Ca^{2+} específico de espermatozoides activado por pH_i , y reconocido por ser esencial para la fertilización humana y de ratones [20, 21], se encuentra codificado en el genoma del erizo de mar [22], e incluso está conservado en muchos clados eucariotas [23]. Recientemente se ha demostrado que este canal está funcionalmente presente en los espermatozoides de *A. punctulata* [24]; se caracteriza por ser regulado por voltaje y marcadamente sensible al pH_i (Figura 1.5B). Por lo tanto, la hiperpolarización inducida por KCNG puede estimular un intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide (sNHE), que alcaliniza el citosol mediante la extrusión de protones, con lo que desplaza la curva de activación por voltaje de CatSper hacia valores

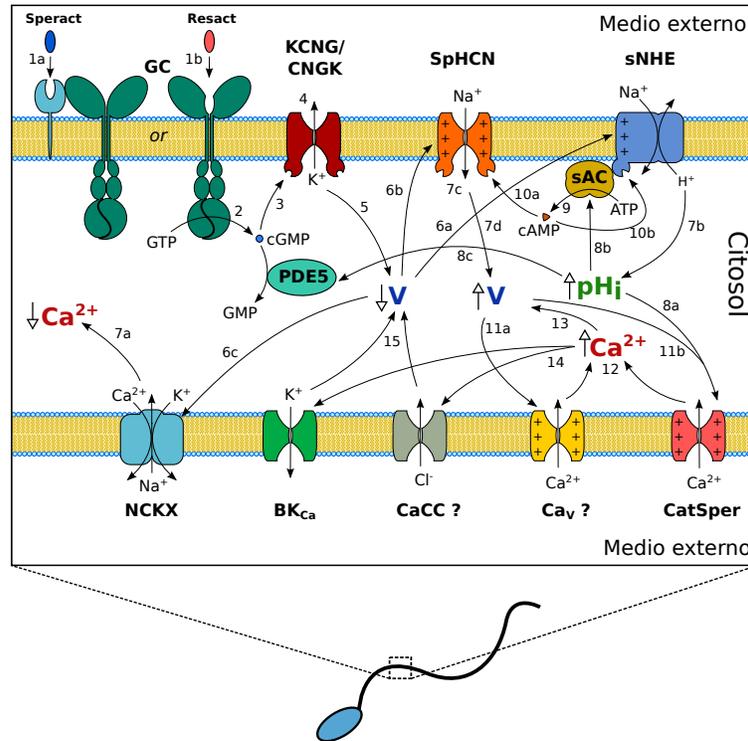


Figura 1.4: **Panorama actual de la vía de señalización activada por SAP.** Después de unirse a su receptor, una molécula de SAP puede estimular a la guanilato ciclasa de membrana (GC), ya sea indirectamente (speract, 1a) como en *S. purpuratus* y *L. pictus*, o directamente (resact, 1b) como en *A. punctulata*; esto eleva transitoriamente la concentración de cGMP (2), activa los canales tetraméricos de K⁺ regulados por cGMP (KCNG) (3), causando una hiperpolarización del potencial de membrana, V, (5) debido al flujo saliente de K⁺ (4). Este cambio en V puede activar un intercambiador Na⁺/H⁺ (sNHE) (6a), eliminar la inactivación de canales de Ca²⁺ activados por voltaje (Ca_vs), promover la apertura de canales activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (spHCN) (6b), y facilitar la extrusión de Ca²⁺ (7a) mediante intercambiadores Na⁺/Ca²⁺ dependientes de K⁺ (NCKX) (6c). La activación de sNHE aumenta el pH_i (7b) que sensibiliza CatSper a los cambios de voltaje (8a) e incrementa la actividad tanto de la adenilato ciclasa soluble (sAC) (8b) como de la fosfodiesterasa-5 (PDE5) (8c). El aumento en la concentración de cAMP (9) podría potenciar la apertura de spHCN (10a) y sostener la actividad de sNHE (10b). La apertura de spHCN causa el influjo de cationes (7c) y contribuye a despolarizar V (7d) activando Ca_vs (11a) y/o CatSper (11b), lo que aumenta [Ca²⁺]_i (12) y a su vez promueve una curvatura flagelar asimétrica que provoca que los espermatozoides giren pronunciadamente. Posiblemente, el aumento de [Ca²⁺]_i también abre los canales de K⁺ regulados por Ca²⁺ (BK_{Ca}) y canales de Cl⁻ regulados por Ca²⁺ (CaCC) (14), que luego compensan (15) la despolarización de la membrana causada por el influjo de Ca²⁺ (13), lo cual remueve la inactivación de los canales de Ca_v y a su vez disminuye la apertura de CatSper. Esta sucesión de eventos ocurre cíclicamente, organizando aumentos transitorios de [Ca²⁺]_i (12) que producen una secuencia de giros en el nado del espermatozoide hasta que los segundos mensajeros se agoten. Modificado de [12]

de potencial más negativos, facilitando la apertura de dichos canales cuando la membrana se despolariza [24, 25].

Una adenilato ciclasa soluble (sAC) es dependiente de pH_i en el caso de los espermatozoides de erizo de mar [29, 30]; además, sNHE de mamíferos contiene un dominio de

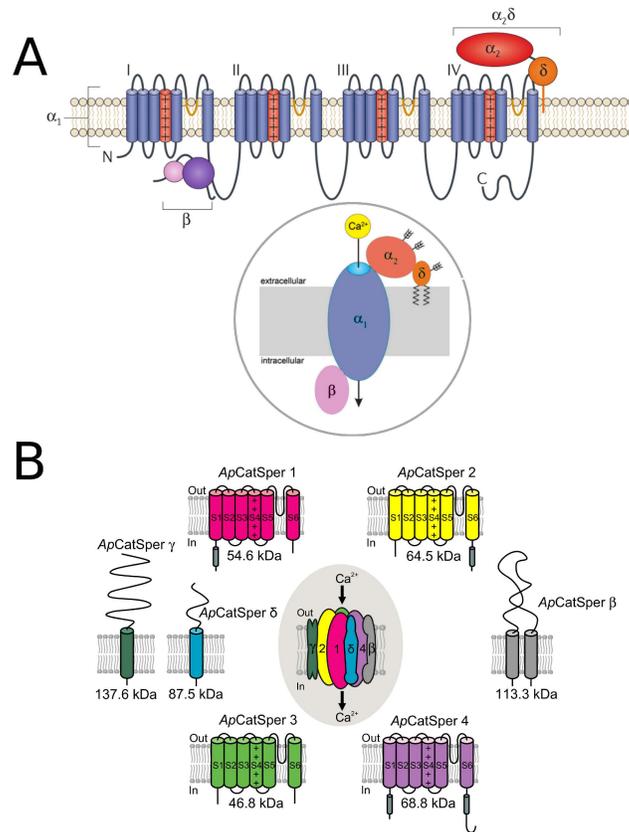


Figura 1.5: **Estructura general de los canales de Ca^{2+} presentes en el flagelo de espermatozoides de erizo de mar.** Para los canales Ca_V (A) y CatSper (B), se muestra una caricatura de la topología membranaral predicha para sus respectivas subunidades, así como una representación de cómo éstas ensamblan el complejo de canal iónico. En (A), se muestra la subunidad principal α_1 , que es una proteína integral de membrana formadora del poro que contiene 4 dominios repetidos (etiquetados I, II, III y IV), los cuales se pliegan formando un pseudo-tetrámero; cada uno de estos dominios contiene 6 segmentos transmembranales (S1-S6), de los cuales el S4 es un dominio sensor de voltaje, presente típicamente en canales voltaje-dependientes, mientras que S5 y S6 forman el vestíbulo del poro. La sensibilidad al voltaje se debe principalmente al contenido de varios aminoácidos cargados positivamente (señalados con símbolos +). A diferencia de los canales Ca_V tipo 3 (LVA), los Ca_V de tipo 1 y 2 (HVA) también requieren de subunidades accesorias además de la subunidad principal α_1 : β (que es soluble) y $\alpha_2\delta$ (anclada al lado exterior de la membrana), las cuales confieren rasgos particulares en cuanto a la dinámica y sensibilidad de la compuerta voltaje-dependiente. Modificado de [26, 27]. En (B), se muestra el caso de CatSper en la especie de erizo de mar *A. punctulata*; cada subunidad tiene señalado el peso molecular predicho. A diferencia de los Ca_V , el poro de CatSper está formado por 4 proteínas homólogas, codificadas cada una por un gen diferente (CatSper1-4); al igual que los 4 dominios de la subunidad α_1 de Ca_V , estas subunidades contienen segmentos S1 al S6, de los cuales el S4 tiene sus cargas positivas esquematizadas como en (A). Los cilindros grises de las subunidades 1, 2 y 4 indican dominios *coiled-coil*, los cuales se propone son mediadores de la heterotetramerización [28]. Las subunidades accesorias β , δ y γ son proteínas integrales de membrana que no guardan ninguna relación de homología con las de los Ca_V . Hasta la fecha, la expresión heteróloga de este complejo no ha sido posible. Modificado de [24].

unión a nucleótidos cíclicos [31], lo que sugiere que el cAMP podría regular su actividad. Lo anterior abre la posibilidad de que haya un aumento del nivel de cAMP como resultado de la alcalinización inducida por hiperpolarización [32]. Por lo tanto, esto implicaría una forma en que el aumento de cAMP contribuya a una estabilización de un pH_i elevado, y como se indicó anteriormente, activaría un canal de Ca^{2+} sensible al pH_i [33, 34], tal como CatSper [24, 35].

La evidencia acumulada sugiere que los ciclos de hiperpolarización/despolarización del potencial de membrana acoplan las fluctuaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con los gradientes de SAP [36-38]. Actualmente, una hipótesis de trabajo es que canales de K^+ y Cl^- , dependientes de Ca^{2+} , los cuales generarían corrientes hiperpolarizantes, podrían contribuir al reinicio de la vía después del influjo de Ca^{2+} a través de CatSper y/o de los canales Ca_V [24, 35]. Con esta interacción directa entre el calcio y una nueva hiperpolarización, se pueden generar trenes de oscilaciones de V con estos componentes después de la primera fluctuación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo cual explicaría la respuesta prolongada de varios segundos provocado por un pulso de SAP [8] (Figura 1.3A), o incluso por un pulso de cGMP [9] (Figura 1.3B).

1.2 ANTECEDENTES DE MODELACIÓN

Después de la descripción del fenómeno de la quimioatracción en la sección anterior, queda claro que la respuesta sensoriomotriz del espermatozoide del erizo de mar ante SAP depende de una retroalimentación coordinada entre variables externas e internas, las cuales están relacionadas respectivamente con: 1) la concentración local del péptido quimioatrayente que el espermatozoide va enfrentando al desplazarse dentro del gradiente que rodea al huevo, y 2) el conjunto de cambios moleculares desencadenados en el interior del flagelo.

La acumulación continua de mediciones experimentales enfocadas en aspectos muy puntuales del este fenómeno, sumada a la naturaleza no lineal de las interacciones que lo subyacen, ha planteado la necesidad de recurrir a enfoques teóricos que permitan integrar el conjunto de observaciones en modelos mecánicos y así lograr un mejor entendimiento de la evidencia experimental en el contexto de un sistema completo, capturando rasgos esenciales de éste mismo. Más allá de la utilidad de los modelos como herramientas descriptivas, han resultado ser valiosas plataformas de predicción que ayudan con el planteamiento de hipótesis y a responder preguntas que de otra manera estarían fuera del alcance por las limitaciones de las técnicas experimentales actuales.

Desde hace más de una década, ha habido un creciente interés en estudiar varias cuestiones relacionadas con el fenómeno de la quimiotaxis de espermatozoides a través de modelos matemáticos. Algunos de éstos han abordado la dinámica cualitativa [35, 39] o la dinámica continua de un conjunto reducido [40] de los componentes de la VSAS, mientras que otros se han enfocado más detalladamente en la respuesta motora, incorporando la señalización mediante modelos fenomenológicos muy simplificados [11, 41-44].

Los sistemas de regulación que controlan las funciones esenciales de las células comprenden la acción conjunta de una variedad de procesos bioquímicos interrelacionados. Esto plantea la necesidad de una plataforma adecuada para abordar sistemas de tal complejidad, cuyos componentes a menudo se desenvuelven en varias escalas de tiempo y siguen

dinámicas que involucran múltiples retroalimentaciones. Actualmente, una variedad de formulaciones matemáticas se han desarrollado para el estudio de sistemas regulatorios, las cuales implican combinaciones de todos tipos de: variables con estados continuos/discretos, descripciones en tiempo continuo/discreto, interacciones de corto/largo alcance, interrelaciones con una gama de topologías definidas, y reglas de evolución bajo formalismos deterministas y/o estocásticos. También, vienen a la mente los sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias, mapeos acoplados, autómatas celulares, ecuaciones diferenciales parciales. La riqueza y variedad de formalismos, junto con la disponibilidad de capacidades computacionales sin precedentes, abren un panorama insospechado para los estudios matemáticos de fenómenos biológicos.

Con respecto al estudio de la generación de fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ que controlan la motilidad del espermatozoide, el primer modelo dinámico propuesto para la vía de señalización de calcio en la cual se centra este trabajo [39], se situó dentro de la familia de modelos de dinámica de grano grueso. En este tipo de formalismo, tanto el estado de las variables como las unidades de tiempo se definen en niveles discretos; los componentes de la vía se conceptualizan como nodos conectados que conforman una red, y el estado de cada uno de éstos se determina por reglas regulatorias codificadas como tablas de verdad (Figura 1.6, el formalismo se explica con más detalle en la sección 3.2). Ante un estímulo *in-silico* por SAPs, la dinámica de la red completa alcanza un patrón periódico, i. e. la configuración del sistema se repite luego de un número finito de iteraciones. Este número define el periodo. En particular, para el nodo que representa al Ca^{2+} intracelular se recupera un comportamiento oscilatorio que puede relacionarse con la serie de picos de calcio que se observa experimentalmente en el flagelo de espermatozoide [8]. El modelo, además de haber corroborado fenomenología ya reportada, generó varias predicciones sobre la alteración de la dinámica de la señal de calcio que se verificaron en el laboratorio. Entre las predicciones a resaltar están: 1) un canal de potasio activado por calcio (CaKC) regula los intervalos entre picos, 2) la actividad de un canal dependiente de voltaje de alto umbral (HVA, por sus siglas en inglés) interviene en el tiempo de aparición del tren de oscilaciones.

Por otro lado, Aguilera et al. [40] propusieron un modelo para la dinámica continua de un subconjunto reducido de los componentes de la vía (9 variables). Un modelo de esta naturaleza, que consiste de ecuaciones diferenciales, permite caracterizar la dinámica del estado de las variables en unidades de medición y escalas de tiempo reales, a diferencia del descrito arriba. En dicho trabajo, se dieron a la tarea de encontrar cuáles serían las variables esenciales del oscilador central. Sin embargo, por ser un modelo reducido, no se consideraron los eventos de la vía que están directamente relacionados con la producción de segundos mensajeros y activación del receptor. Cabe mencionar que los resultados de ese modelo señalaron a 3 variables como indispensables para el oscilador: Na^+ , K^+ y Ca^{2+} .

A pesar de que los modelos anteriores consideran los canales de Ca^{2+} controlados por voltaje clásicos como las entidades moleculares responsables del influjo de Ca^{2+} , el papel de CatSper [22-24, 35, 38] no se descarta. Además, Espinal-Enrriquez et al. [35] sugieren su presencia, dada la posibilidad de examinar la consecuencia de alterar varios subconjuntos de componentes de la red de señalización.

En una plataforma de modelación matemática, se vuelve fácil analizar el efecto de fármacos multiblancos y se puede abordar la cuestión de si éstas actúan simultáneamente o

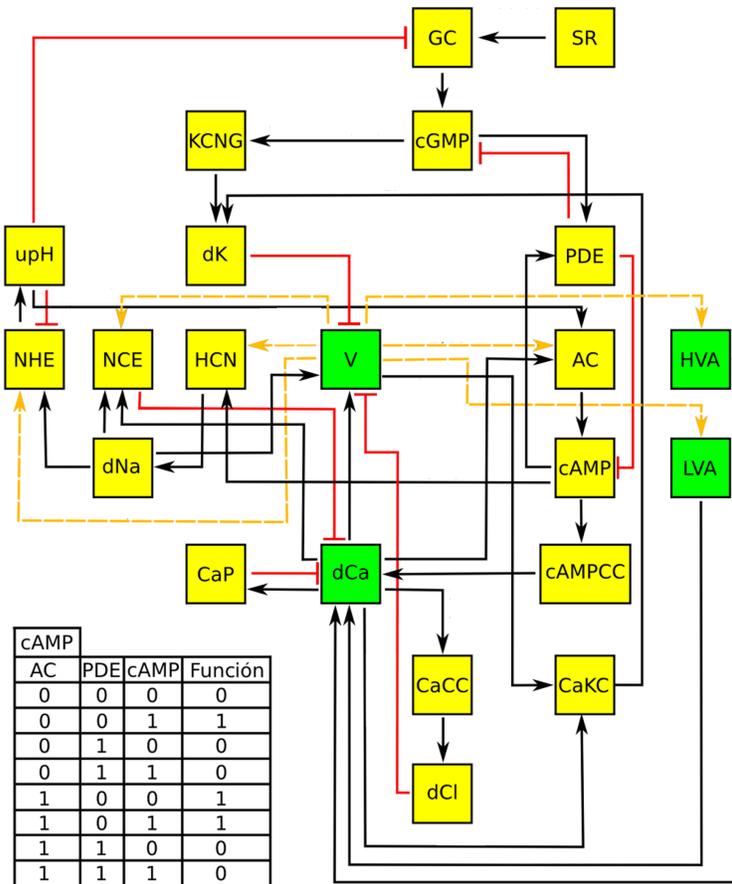


Figura 1.6: **Modelo de red lógica discreta para la VSAS, propuesto anteriormente por Espinal et al. [39].** Cada componente de la vía de señalización se conceptualiza como una variable discreta que asume un estado de un repertorio de niveles bien definidos: binaria si tiene 2 estados posibles (cajas amarillas) y ternaria si tiene hasta 3 (cajas verdes). En cada instante de tiempo, los nodos actualizan su valor aplicando una función regulatoria lógica codificada como tabla de verdad. Abajo, se muestra como ejemplo la función del cAMP; ésta contempla todas las combinaciones únicas de los valores de sus reguladores (AC, PDE y cAMP) y le asigna a cada una de ellas un valor de salida específico (última columna), el cual se basa en la abstracción cualitativa de observaciones experimentales. El conjunto de estas variables se puede visualizar como una red donde los nodos son las variables que la componen y las entradas de sus reglas regulatorias son los enlaces. Los enlaces pueden ser activadores (negro), inhibitorios (rojo) o duales (amarillo). Modificado de [39].

no en más de un nodo de la red. Esto se llevó a cabo para el caso del Ácido Niflúmico (AN), un fármaco que se sabe afecta la activación de los canales HCN, CaCC y CaKC. Motivado por las simulaciones del modelo discreto en [39], en donde se determinaron cambios en el período, nivel promedio y amplitud de la señal de Ca^{2+} , en [38] se abordó dicho escenario de acción del AN sobre la vía de señalización activada por speract y se realizó un estudio experimental que reveló la interrupción de la quimiotaxis por AN en espermatozoides del erizo *L. pictus*. Al observar el efecto de la alteración individual y conjunta de los canales sensibles a AN sobre las características de fluctuación del Ca^{2+} , en [35] se concluyó que el bloqueo de HCN produce las modificaciones más fuertes en las propiedades temporales

de la respuesta, esto al introducir un elemento de irregularidad y disminuir la amplitud de la señal. El bloqueo de CaCC aumenta la amplitud de las oscilaciones y el bloqueo de CaKC aumenta los valores promedio y máximos de la señal de Ca^{2+} . Este tipo de estudio combinatorio, inviable o muy difícil de implementar experimentalmente, se vio facilitado por la modelación matemática, que ayuda a revelar comportamientos de varios elementos reguladores en conjunto, así como el papel particular de cada uno de estos. El estudio en [35] exploró dos acciones opuestas de AN sobre CaKC en espermatozoides de erizo de mar, es decir, inhibitorio versus estimulante, para el cual existe evidencia experimental controvertida en otros sistemas biológicos (discutido en [35]). Según el modelo, se pueden prever dos escenarios congruentes con resultados experimentales [36], dependiendo de la participación de: i) un canal de K^+ adicional diferente de Slo1 o ii) un canal adicional dependiente de Ca^{2+} , pH_i y voltaje tal como CatSper. Esta última predicción está ahora experimentalmente corroborada [24].

OBJETIVOS

Today's biologists increasingly recognize that appropriate mathematics can help interpret any kind of data. In this sense, mathematics is biology's next microscope, only better. [...] In the coming century, biology will stimulate the creation of entirely new realms of mathematics. In this sense, biology is mathematics' next physics, only better.

JOEL E COHEN, 2004 [45]

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La vía de señalización que media la quimiotaxis dirigida por $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide de erizo de mar ha sido objeto de intenso estudio, y varias décadas de investigación experimental han implicado varios canales y componentes moleculares [2, 12, 46, 47]. A pesar de que esta vía ha sido ampliamente estudiada, quedan muchas preguntas con respecto a los elementos participantes y sus relaciones, principalmente debido a las limitaciones experimentales.

Inicialmente se pensaba que los canales clásicos de Ca^{2+} , voltaje dependientes de alto y bajo umbral (HVA, LVA) eran los principales responsables de las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ [2, 5, 6, 10, 18, 19, 48]. Sin embargo, las observaciones experimentales han demostrado que en espermatozoides de erizo de mar el aumento de la señal de calcio es antecedido por una alcalinización del citosol, medido primero a nivel de población de células ([24, 48] y recientemente en células individuales [49]. Esto sugiere que el intercambiador sNHE [31] puede jugar un papel en los primeros pasos de la vía. Aunque la regulación fina del pH_i a través de sNHE aún no se entiende completamente, el considerar una interacción directa con las fluctuaciones del $[Ca^{2+}]_i$ se vuelve llamativo. Un fuerte candidato para este enlace es el canal de calcio CatSper, ya que en mamíferos se ha demostrado que está expresado principalmente en espermatozoides, es activado por alcalinización, ligeramente sensible al voltaje y esencial para fertilización [21, 50, 51]. La participación de un canal de calcio con estas características en la fisiología de los espermatozoides de erizo de mar se conjeturó en [35, 38] y recientemente se identificó la expresión de CatSper en el flagelo de espermatozoides de la especie *A. punctulata* [24].

En la Tabla 2.1, se resumen las evidencias experimentales para los tipos de canales de calcio propuestos para participar en los trenes de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ activados por SAP. Hay que recalcar que la mayoría de las pruebas son indirectas y se basan en enfoques farmacológicos, que intentan implicar canales con base en ensayos que utilizan fármacos bloqueadores y activadores, las cuales a menudo no son específicos y, por lo tanto, tienen efectos cruzados. Las técnicas de ingeniería genética que permitirían llegar a conclusiones definitivas sobre la necesidad y suficiencia de los canales postulados, e. g. mutantes nulos

| Canal de Ca ²⁺ | Evidencia experimental en flagelos de espermatozoides | |
|---------------------------|---|---|
| | Biología molecular | Farmacología ^a |
| LVA (tipo T) | mRNA en tejido testicular[18] | Níquel [31] Nimodipina [8, 10] |
| HVA (tipo L) | mRNA en tejido testicular, inmunolocalización ^b [19] | Nimodipina [19] Nifedipina [19] Verapamil [39] |
| CatSper ^d | mRNA en tejido testicular, inmunolocalización ^c , espectrometría de masas [24, 52] | Mibefradil [24] MDL12330A [24] NNC 55-0396 [52] |

Tabla 2.1: **Resumen de evidencia experimental en erizos de mar sobre los principales canales de calcio propuestos en la VSAS.** ^a Cabe mencionar que de los bloqueadores farmacológicos enlistados, ninguno guarda una especificidad del 100% con los canales asociados. ^b Anticuerpo levantado contra un polipéptido de la subunidad α del canal en rata, el cual también reconoce la versión homóloga en espermatozoides de ratón y humano. ^c Anticuerpo levantado contra polipéptidos de subunidades formadoras de poro de *A. punctulata* [24] y *S. purpuratus* [52]. ^d Es de interés notar que no se han logrado registros electrofisiológicos directos en espermatozoides maduros de erizo de mar en comparación con el canal homólogo de espermatozoides de ratón, humano y macaco [53].

(*knock-outs*), aún han sido imposibles de implementar en los espermatozoides de este organismo modelo.

Por lo tanto, siguiendo un enfoque experimental basado en el uso de fármacos vuelve difícil definir si un solo o múltiples tipos de canales de calcio desempeñan un papel activo en esta vía de señalización. En este sentido, los modelos matemáticos pueden ayudar a explorar hipótesis alternativas que todavía son imposibles de abordarse directamente en el laboratorio. Más aún, todo lo anterior justifica la elaboración y análisis de una propuesta actualizada de modelación que incorpore las evidencias empíricas recientes sobre el posible papel del canal CatSper.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Proponer y analizar modelos matemáticos que sirvan como plataforma para estudiar la vía de señalización que controla los trenes de oscilaciones de concentración de calcio en flagelos de espermatozoides de erizo de mar.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar cuáles son los elementos esenciales que participan en la vía de señalización activada por SAPs.

- Proponer mecanismos de acción y funciones particulares para cada uno de dichos elementos.
- Predecir cuáles son las características que deben tener los canales iónicos que permiten el influjo de calcio en el flagelo del espermatozoide.

Parte II

MODELO DISCRETO

Tomando como punto de partida el modelo de red propuesto previamente en [39] (etiquetado aquí como Modelo I), aquí se aborda la necesidad de extender el modelo e incluir un canal de calcio adicional dependiente del pH_i en la Vía de Señalización Activada por SAPs (VSAS): CatSper. Con esta red mejorada, etiquetada como Modelo II, se analizó en qué medida podría participar CatSper en la VSAS con respecto a los otros canales de Ca^{2+} previamente considerados (HVA y LVA), ésto mediante knock-outs *in silico* de dichos canales. El resultado de que el canal CatSper desempeña un papel principal con respecto a la amplitud de las fluctuaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ llevó a plantear otra variante de modelo, en la cual el único canal de Ca^{2+} restante es CatSper (Modelo III). Con los tres modelos en mano, los resultados de un estudio comparativo entre sus dinámicas, así como el contraste entre redes *knock-out* de un conjunto de nodos esenciales, condujeron a la predicción de que CatSper es el principal generador de oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la VSAS y los otros canales de calcio considerados son probablemente secundarios.

To make progress in understanding all this, we probably need to begin with simplified (oversimplified?) models and ignore the critics' tirade that the real world is more complex. The real world is always more complex, which has the advantage that we shan't run out of work.

JOHN A. BALL, *Memes as Replicators*, 1984 [54]

3.1 ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN

3.1.1 Propuesta anterior para la VSAS

Después de la unión del SAP speract, el complejo speract-receptor activa una guanilato ciclasa de membrana (GC) que a su vez produce guanosín monofosfato cíclico (cGMP). Este segundo mensajero abre un canal de K^+ dependiente de cGMP (KCNG) cuya corriente iónica hiperpolariza el potencial de membrana (v). La hiperpolarización influye en varios procesos:

- i estimula al intercambiador $K^+/Na^+/Ca^{2+}$ (NCKX) [48, 55, 56] que disminuye la $[Ca^{2+}]_i$,
- ii activa un intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide (sNHE) [57], que aumenta el pH intracelular (pH_i),
- iii disminuye la inactivación de los canales de calcio HVA y LVA, y
- iv estimula un canal activado por voltaje y modulado por cAMP (spHCN) que repolariza la membrana [48, 56, 58, 59].

La elevación del pH_i estimula una adenilato ciclasa soluble (sAC) [32] que sintetiza cAMP, el cual a su vez promueve la activación del canal spHCN mencionado anteriormente, así como un canal de calcio dependiente de cAMP (cAMPCC) que además repolariza la membrana. A través de esta cadena de eventos, el cAMPCC guarda una dependencia indirecta sobre el pH_i . Los niveles de nucleótidos cíclicos son fuertemente controlado por fosfodiesterasas (PDE) que los degradan. La despolarización permite la apertura de canales de calcio LVA y HVA. Los aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ pueden abrir canales de K^+ dependientes de calcio (CaKC) y canales de Cl^- (CaCC). Estos dos últimos canales pueden reiniciar la vía a través de una nueva hiperpolarización [36, 39]. La extrusión de calcio se lleva a cabo por la bomba de calcio (CaP) y el NCKX, mencionado anteriormente. La alternancia cíclica de la hiperpolarización y la despolarización generan el tren de oscilaciones en $[Ca^{2+}]_i$ que rigen el patrón de nado del espermatozoide de erizo de mar [39].

3.1.2 Limitaciones del modelo propuesto anteriormente

La red lógica previamente desarrollada por Espinal et al. reprodujo varias observaciones previamente reportadas y produjo predicciones que posteriormente se validaron experimentalmente [39]. En ese estudio, se demostró que un bloqueo *in silico* del CaKC aumentaba tanto el tiempo entre los picos de calcio como el promedio de la señal de $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, cuando se llevaron a cabo los experimentos con Iberitoxina, un bloqueador específico del canal CaKC [60], se observó que, aunque el tiempo transcurrido entre los picos de calcio efectivamente aumentaba, el $[Ca^{2+}]_i$ promedio en realidad disminuía. Como una salida a esta discrepancia, se sugirió la existencia de otros canales iónicos, no considerados anteriormente, que pudieran estar participando en la vía.

En un artículo posterior [35], se estudió con el mismo modelo el efecto del AN sobre la VSAS, esto al considerar su acción sobre la permeabilidad de CaCC, HCN y CaKC. Aunque con ligeras diferencias, AN afecta estos tres canales en el rango μM : CaCC [38, 61-64], CaKC [65, 66], y HCN [38, 67-69]. Dos escenarios surgieron a raíz de la controversia experimental sobre si la acción de AN en CaKC es inhibitoria o activadora, debido a que en otros sistemas celulares se ha reportado evidencia para ambos casos. En [39] sólo se abordó el escenario inhibitorio. Teniendo en cuenta la evidencia recientemente acumulada con respecto a la activación de CaKC por AN, el modelo requirió de la participación de más canales iónicos en la vía que fueran sensibles a este compuesto a fin de recuperar los resultados experimentales realizados por Wood et al. [36]. En ese estudio [35], antes de que se comprobara su expresión funcional en espermatozoides de erizo de mar, se plantea como una cuestión a dirigirse en trabajo futuro que CatSper bien podría ser tal canal.

3.2 MÉTODOLÓGÍA

3.2.1 Definición del modelo

En la red de señalización lógica correspondiente a la VSAS, introducida por primera vez por Espinal et al. [39], los nodos representan los componentes antes mencionados: actividades de canales iónicos, concentraciones intracelulares de iones y moléculas, y el potencial de membrana, entre otros; los enlaces son indicativos de dependencias funcionales entre nodos. En el modelo, se considera que la red opera en una dinámica de tiempo discreto, donde los nodos sólo toman un valor de un conjunto de hasta tres niveles $\{0, 1, 2\}$ y, en cada iteración, se actualizan de acuerdo con un conjunto de reglas regulatorias. Esta es una generalización del enfoque de red Booleana que ha funcionado para redes genéticas, proteómicas, metabólicas y transcripcionales, entre otros [70-74].

El estado de la red consiste en un conjunto de N variables discretas $\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_N$. La mayoría de las variables pueden asumir dos valores, i. e. 0 para los estados cerrado/apagado y 1 para encendido/abierto. No obstante, una descripción precisa de los procesos dinámicos en la red requiere que cuatro nodos tengan hasta tres estados posibles: el potencial de membrana (hiperpolarizado 0, reposo 1, ó despolarizado 2); canales de calcio LVA y HVA (inactivo 0, cerrado 1 ó abierto, 2); y la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (0 basal, tónica 1 ó supratónica 2). En este formalismo, así como el estado de los nodos se

expresa en unidades discretas, la dinámica se desarrolla en unidades arbitrarias de tiempo dadas por pasos discretos de máquina. Bajo la suposición de que los tiempos típicos de cambio de estado son similares para cada nodo, se empleó el esquema de actualización síncrona, i. e. en cada iteración todos los nodos aplican su regla lógica al mismo tiempo. De esta forma, el estado que cada nodo σ_n adquiere en un siguiente instante de tiempo $t + 1$ está determinado por el estado del conjunto de sus reguladores (los nodos funcionalmente vinculados directamente a éste) en el tiempo t . Denotemos como $\sigma_{n_1}, \sigma_{n_2}, \dots, \sigma_{n_k}$ los k reguladores de σ_n . Luego, en cada paso de tiempo el valor de σ_n viene dado por

$$\sigma_n(t + 1) = F_n(\sigma_{n_1}(t), \sigma_{n_2}(t), \dots, \sigma_{n_k}(t)), \quad (3.2.1)$$

donde F_n es la función reguladora específica de ese nodo. Para la construcción de estas funciones reguladoras se consideró un vasto conjunto de observaciones experimentales, disponible en la literatura y del propio laboratorio del Dr. Darszon. Con este modelo se puede observar *in silico* el efecto de alterar ciertos elementos relevantes para la vía. A partir de ahora el modelo desarrollado en [39] será referido como Modelo I (ver [Figura 1.6](#)).

3.2.1.1 Construcción de funciones reguladoras

La construcción de las reglas de evolución para cada uno de los nodos que componen el modelo de red de la [VSAS](#) se entiende mejor por medio de un caso de ejemplo. Se expone el caso de la regulación del cGMP. Esta molécula es un segundo mensajero conocida en casi todos los tipos de células. Es sintetizada por la guanilato ciclasa (GC) y degradada por las fosfodiesterasas (PDE). En este caso, cGMP, GC y PDE pueden tomar uno de dos valores: 0 ó 1. Para la construcción de su función reguladora es necesario tener en cuenta todas las combinaciones posibles de los nodos vinculados a éste. A un tiempo dado t , si PDE está activo (estado 1), cGMP no puede ser sintetizado, aunque GC esté activo; esto se debe a que PDE es un inhibidor fuerte. Por el contrario, si el estado de la PDE es 0, basta con que GC o cGMP se encuentren en el estado 1 para que cGMP tome el valor de 1 en el tiempo $t + 1$. Esta tabla incluye como entrada al mismo cGMP, ya que para conocer su estado en la iteración siguiente es necesario tomar en cuenta si existía o no en el tiempo anterior, lo cuál plantea implícitamente que no se puede crear ni degradar por sí mismo. De esta forma, la función reguladora queda codificada como una tabla de verdad en la [Tabla 3.1](#).

Esta construcción se aplicó a todos los nodos del sistema. Es importante mencionar que varios criterios pueden intervenir en la construcción de una función reguladora, y para que ésta sea significativa, es esencial contar con conocimiento biológico.

3.2.2 Implementación de las simulaciones

Para la implementación computacional de los modelos se desarrollaron librerías en el lenguaje de programación Julia. La paquetería es de libre acceso en el repositorio <https://github.com/dpriego87/DiDySim.jl>

| GC(t) | PDE(t) | cGMP(t) | cGMP($t + 1$) |
|-----------|------------|-------------|-----------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 1 | 1 |
| 0 | 1 | 0 | 0 |
| 0 | 1 | 1 | 0 |
| 1 | 0 | 0 | 1 |
| 1 | 0 | 1 | 1 |
| 1 | 1 | 0 | 0 |
| 1 | 1 | 1 | 0 |

Tabla 3.1: **Tabla de verdad de cGMP.** Toda la combinatoria de estados posible de los reguladores del cGMP (GC, PDE, cGMP) están contenidos en las primeras 3 columnas; la cuarta columna muestra los valores resultantes de la función asociado a cada combinación particular.

3.2.2.1 *Knock-outs in-silico*

Para implementar la eliminación de nodos y evaluar su efecto sobre la dinámica de la red, se fijó el estado del nodo silenciado a su nivel menos activo independientemente de su función reguladora; dicho nivel corresponde al valor 0 en el caso de los nodos analizados en redes *knock-out* de este trabajo.

3.2.2.2 *Simulación de series de tiempo de Ca^{2+} pseudo-continuas*

Para cualquier condición inicial dada, la dinámica de la red atravesará por una serie de configuraciones transitorias hasta alcanzar un patrón estacionario de actividad llamado atractor. Todas las condiciones iniciales que terminan en un atractor dado constituyen la cuenca de atracción de éste. Varios atractores pueden coexistir en el espacio fase de una misma red, cada uno con su propia cuenca del atracción. El conjunto de los atractores con sus cuencas constituye el paisaje de atracción de la red.

Las series de tiempo de las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ que se miden experimentalmente corresponden al comportamiento promedio sobre segmentos del flagelo, y éstas se desarrollan con dinámicas prácticamente continuas, es decir, tanto el tiempo como los niveles de calcio toman valores del conjunto de números reales. Para aproximar cualitativamente el rango dinámico continuo del calcio utilizando el modelo discreto, se tomó una muestra aleatoria de 10^5 condiciones iniciales diferentes del espacio de configuraciones de la red dado por los estados 0 y 1 para todos los nodos, y se promedió el valor del nodo del calcio, dCa en cada paso de tiempo sobre todas las realizaciones. De esta forma, se obtiene una dinámica que da lugar a variables que toman valores de un conjunto discreto más fino y que evolucionan en tiempos discretos; a esto nos referimos como dinámica pseudo-continua. En los casos donde el paisaje de atracción contenga al menos un atractor cíclico, y además el nodo dCa varíe en el tiempo, el valor promedio del nodo dCa será periódico con un valor conmensurable con el ciclo del atractor. Aunque las condiciones iniciales se eligen de acuerdo con una distribución uniforme, las fases oscilatorias están determinadas por

la distribución de transitorios asociada a cada atractor. En este estudio se compararon los niveles de Ca^{2+} promedio de la simulaciones con respecto de los niveles medidos experimentalmente determinados por la señal de calcio promediada sobre la longitud flagelo. El contar con una resolución más fina para la concentración de calcio permite una comparación más adecuada con mediciones experimentales, así como tener simulaciones que se prestan al cálculo de características globales.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 *CatSper podría participar en la generación del patrón oscilatorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la VSAS*

La [Figura 3.1](#) muestra el Modelo II y la red lógica correspondiente. A fin de obtener una descripción de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ más cercana a las observaciones experimentales, que son medidas promediadas de una sola célula a lo largo del flagelo, se calculó el valor promedio de las simulaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sobre más de 10^5 condiciones iniciales, tal como en [\[35, 39\]](#). Además proporcionando una variable más precisa para las comparaciones experimentales, este valor promedio, como se verá más adelante, contribuye a una mejor comprensión de la dinámica.

El hallazgo mostrado adelante es que la contribución del canal CatSper sobre el nodo del calcio es capaz de producir oscilaciones y opaca a los otros dos canales de calcio ([HVA](#) y [LVA](#)) previamente considerados en la [VSAS](#). La presencia de este canal se corrobora aún más después del resultado de que, con su adición, las deficiencias antes mencionadas con el Modelo I se pueden superar. Adicionalmente, para evaluar la certidumbre de estos resultados con respecto a la función regulatoria propuesta para el canal de CatSper de erizo de mar, se realizó un análisis de robustez para dicha función y se encontró que los resultados se mantenían para la gran parte de escenarios ([Figura A.1](#)).

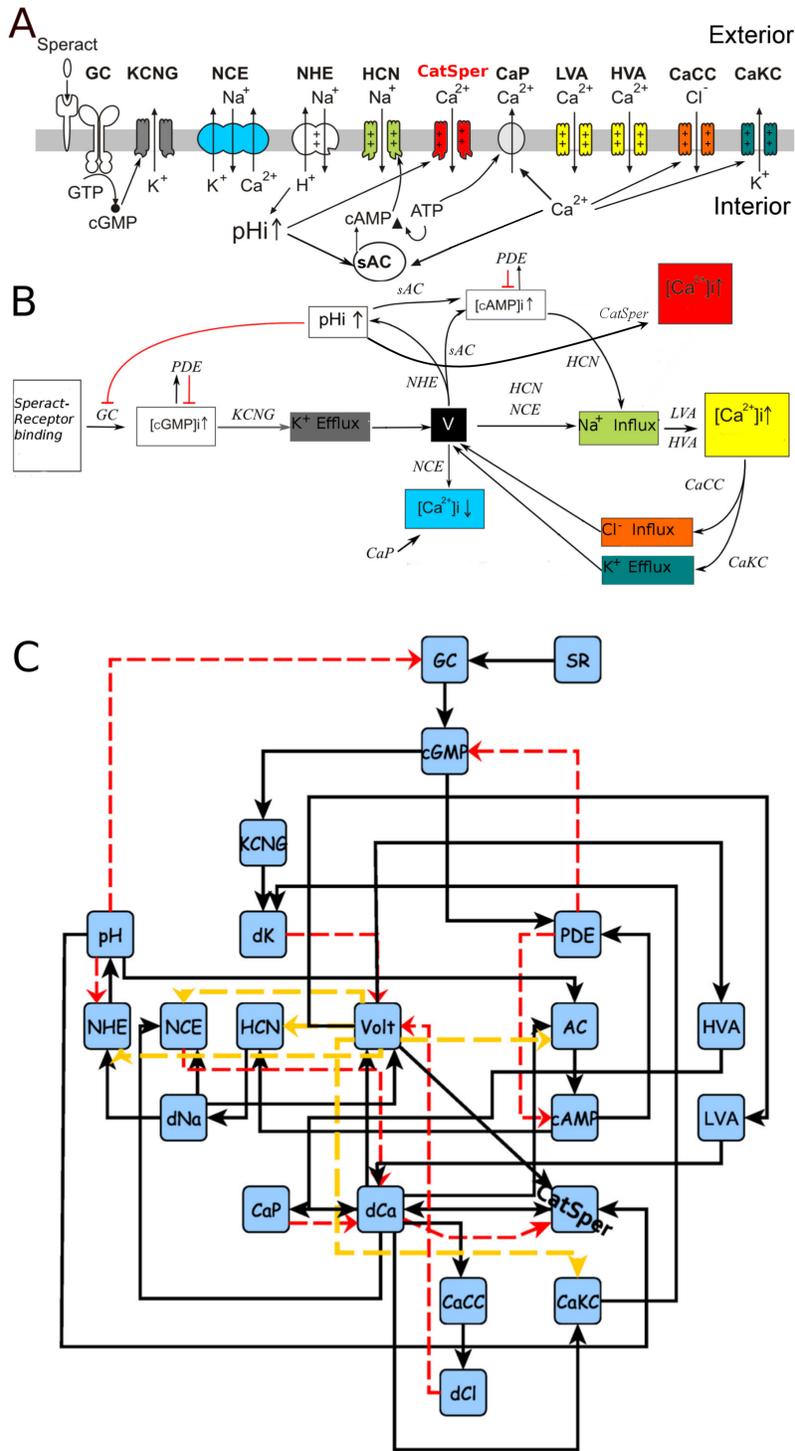


Figura 3.1: Vía de señalización de acuerdo con el Modelo II y Red Lógica de la VSAS. (A) Esquema de la vía de señalización desencadenada por SAPs. La VSAS comienza con la unión de SAP a su receptor y después de varios pasos, que incluyen cambios en potencial de membrana, se obtienen oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$. A diferencia del Modelo I, aquí el canal de Ca^{2+} dependiente de cAMP deja de ser considerado y pasa a ser sustituido por CatSper. (B) Eventos bioquímicos relacionados con (A). (C) Modelo de red de la vía de señalización. Cada nodo en la red representa un elemento de la vía. Las flechas negras indican activación; líneas rojas indican inhibición y las flechas amarillas discontinuas pueden activar e inhibir dependiendo del valor del estado de V.

3.3.2 *CatSper* juega un papel central en la VSAS

En la [Figura 3.2](#) se muestran en negro los valores del nodo del calcio, dCa , para el Modelo II promediados sobre 10^5 trayectorias determinadas a partir de la ecuación [3.2.1](#), utilizando funciones reguladoras correspondientes a la [Figura 3.1](#). Cada una de dichas trayectorias proviene de un muestreo aleatorio de condiciones iniciales sobre el espacio de configuraciones dado por combinaciones de estados 0 y 1, como se explica en la sección [3.2.2.2](#). También está trazado en rojo el caso en que el nodo *CatSper* ha sido bloqueado ($CatSper^{KO}$), manteniendo los nodos HVA y LVA activos, y en azul el caso en el que ambos canales HVA y LVA han sido bloqueado dejando a *CatSper* presente (HVA,LVA^{KO}). Se puede observar que el bloqueo de *CatSper* produce una disminución drástica en los niveles de calcio en comparación con el bloqueo conjunto de HVA y LVA, colocándolo como la principal fuente de influjo de Ca^{2+} . Además, el comportamiento temporal oscilatorio de las fluctuaciones de calcio en la mutante $CatSper^{KO}$ es modificado por la aparición de un pequeño pico adicional dentro del periodo del modelo completo (WT).

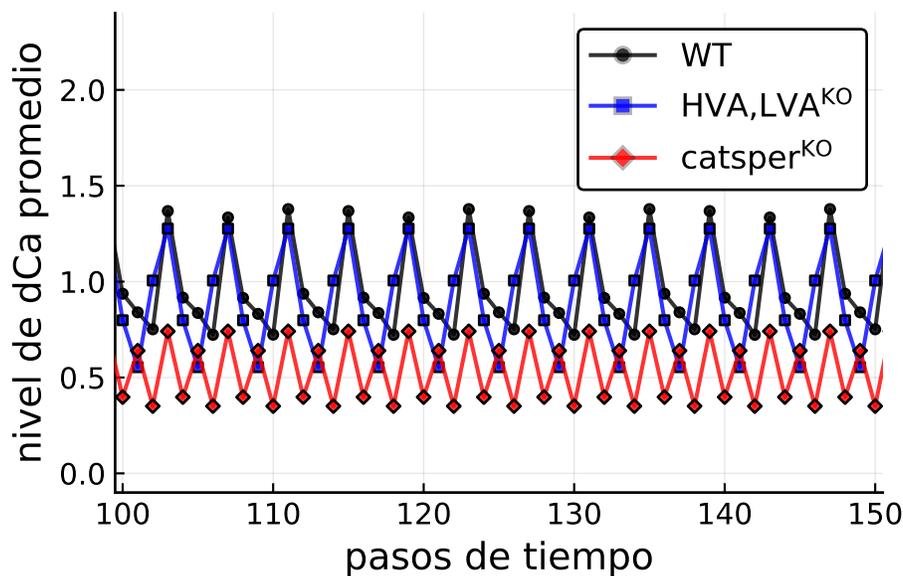


Figura 3.2: Series de tiempo de $[Ca^{2+}]_i$ generada por la red bajo el bloqueo de diferentes canales de Ca^{2+} presentes en el flagelo de espermatozoide de erizo de mar: HVA-LVA y *CatSper*. La curva de $[Ca^{2+}]_i$ con todos los nodos presentes (WT) se representa en negro. La línea roja corresponde a la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ después del bloqueo del canal *CatSper*. La línea azul representa la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ resultante de la red *knock-out* para ambos canales HVA y LVA. Las unidades del eje X son el número de iteración en curso de la dinámica de la red. Las unidades del eje Y son arbitrarias, indicativas de valores relativos del nodo $[Ca^{2+}]_i$.

Por lo tanto, *CatSper* también juega un papel en el control de la frecuencia de oscilaciones en la nueva variante de red (Modelo II), mientras que el bloqueo conjunto de los canales HVA y LVA no tiene ningún efecto sobre el periodo de oscilación. Sin embargo, en la mutante HVA,LVA^{KO} hay apenas una diferencia notable de fase de un paso en los valles con respecto al WT, lo cual causa pérdida de la asimetría en la dinámica de activación-relajación original en los picos individuales de calcio (observar que las pendiente de subida y bajada

de dCa son similares en la red doble mutante). Por consiguiente, aunque CatSper es el canal dominante para la regulación de las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$, los otros canales aún pueden jugar un papel en moldear otros rasgos de éstas. Teniendo en cuenta lo anterior, a continuación se presenta un estudio comparativo entre los modelos I, II y III; éste último es el modelo donde CatSper es el único canal de calcio. La red para el Modelo III se muestra en la [Figura 3.3](#).

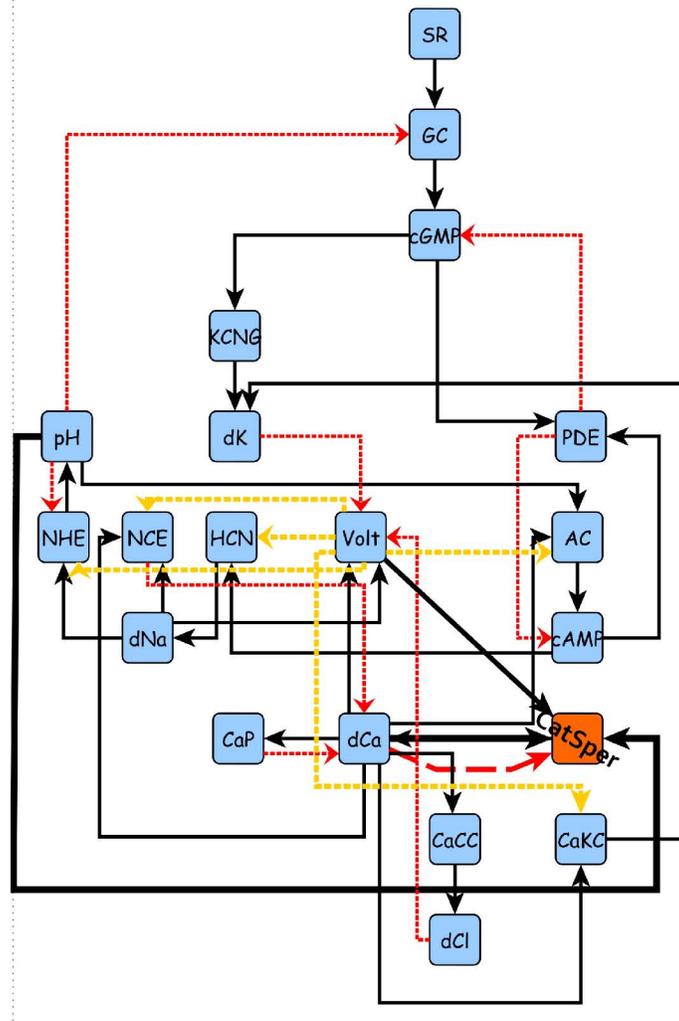


Figura 3.3: Diagrama de la red de la vía de señalización con el canal CatSper como la única fuente de influjo que aporta a la $[Ca^{2+}]_i$. Hay que notar la ausencia de los canales LVA y HVA, anteriormente incluidos en la [Figura 3.1](#). También es de distinguirse los enlaces de interacción de los nodos pH, voltaje y calcio con el canal CatSper, resaltados con flechas negras remarcadas.

3.3.3 Sobre la dependencia PDE

Se ha reportado que la exposición a 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX), un bloqueador general de PDE, disminuye las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ dependientes de speract [8]. En la [Figura 3.4](#) se presenta una comparación del experimento hecho por Wood, Darszon

y Whitaker [8] con los resultados de estado estacionario en el bloqueo *in silico* de PDE en los tres modelos. El panel A, se muestran trazos experimentales relacionados con el tratamiento de IBMX. En el panel B, se muestra que en el Modelo I se produce una pequeña disminución en los valores promedio de $[Ca^{2+}]_i$ con respecto al *wild type* y el comportamiento temporal se vuelve irregular con oscilaciones de menor amplitud. Para el panel C, donde se considera el Modelo II, la participación de HVA y LVA, junto con una contribución de CatSper produce, bajo la supresión de PDE, oscilaciones que casi se superponen con el comportamiento del WT. Mientras en el panel D, el Modelo III reproduce cualitativamente los resultados experimentales al presentar una considerable disminución en el nivel de $[Ca^{2+}]_i$.

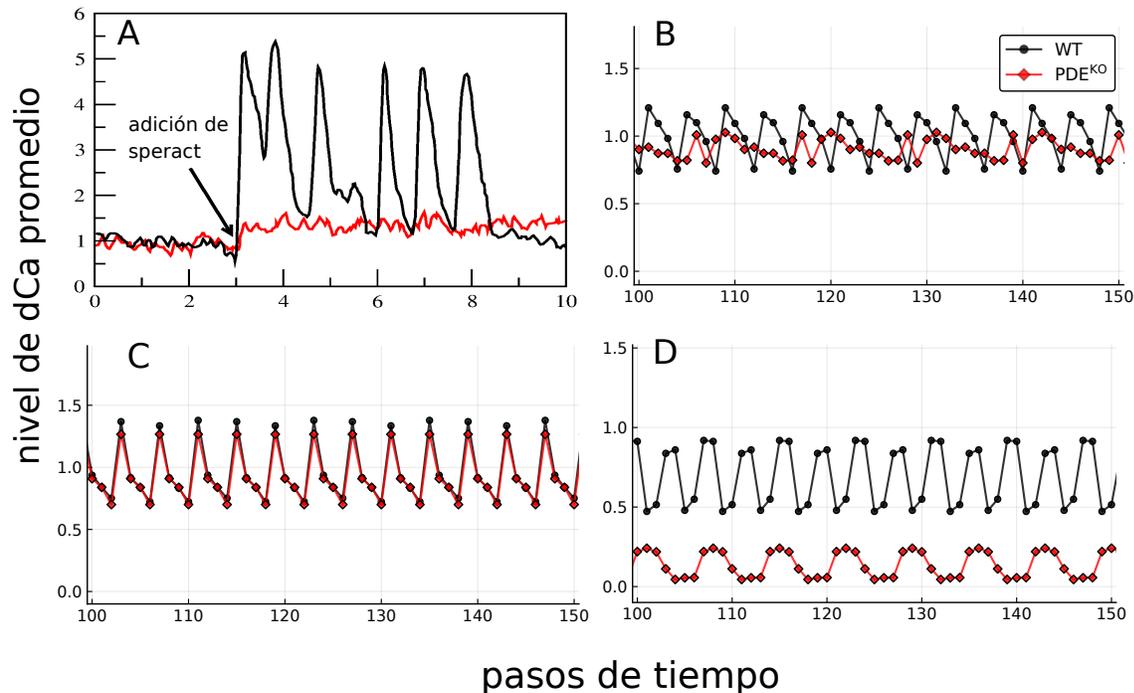


Figura 3.4: **Serie de tiempo de $[Ca^{2+}]_i$ en redes sin PDE.** Panel A muestra una medición experimental de fluorescencia típica de $[Ca^{2+}]_i$ después de la exposición a speract. La curva de control se representa en negro, la curva roja representa el nivel de calcio con speract + IBMX, un conocido bloqueador de PDE. Extraído de [8]. Hay que tomar en cuenta que la considerable disminución de Ca^{2+} inducida por el bloqueo de PDE. Los paneles B, C y D son las series de tiempo del nivel de calcio para la curva de control (negro) y bajo la supresión del nodo PDE para los Modelos I, II y III respectivamente. En la serie temporal del panel B, el nivel promedio de calcio es ligeramente menor y sus oscilaciones menores bajo la supresión de PDE. El Modelo II (panel C) muestra de manera notable cambios apenas perceptibles. Sin embargo, para el Modelo III (panel D), el nivel medio del calcio y la amplitud de sus oscilaciones bajan drásticamente al bloquear PDE.

Los resultados con el Modelo III (sólo CatSper, panel 3.4D) pueden explicarse teniendo en cuenta que IBMX es un inhibidor no específico de la fosfodiesterasa que permite acumulación de cGMP y cAMP en todos los compartimentos celulares. En una respuesta regular ante SAP primero se eleva el cGMP en los flagelos y, con un retraso, luego sube cAMP [6, 75]. La demora entre la elevación de cGMP y la de cAMP permite que los canales

KCNG abran primero e hiperpolaricen la membrana, para que cuando cAMP comience a aumentar, los canales HCN puedan abrirse y despolarizar. Respuestas a speract bajo la presencia de IBMX, medidas en población de espermatozoides, han demostrado que el potencial de membrana permanece hiperpolarizado, lo cual indica que la activación de KCNG por cGMP prevalece sobre la despolarización causada por spHCN, inducida por cAMP [76, 77]. Entonces, IBMX destruye la coordinación temporal entre estos dos canales y, si bien permite que la $[Ca^{2+}]_i$ aumente, impide que la dinámica del calcio oscile. Debido a que los canales CatSper requieren de una despolarización para activarse, a pesar de que una hiperpolarización eleva el pH_i , éstos no se abrirían lo suficiente, resultando en niveles de Ca^{2+} menores.

Hay que recordar que para el caso del Modelo I (ver Figura 1.6), se cuenta con dos canales puramente dependientes de voltaje (HVA y LVA) y uno dependiente de cAMP (cAMPCC). La ausencia de PDE en este escenario (panel 3.4B) traería un doble efecto sobre la regulación de Ca^{2+} a través de nucleótidos cíclicos: uno con acción inhibitoria (mediado por la hiperpolarización dependiente de cGMP) y otro con acción activadora (por la apertura del cAMPCC mediante cAMP). cAMPCC representa una vía por la que, de forma independiente de voltaje, se incrementa $[Ca^{2+}]_i$ y por consiguiente una corriente despolarizante que ayudaría con la apertura de los canales LVA y HVA, luego de que la hiperpolarización mediada por cGMP haya removido la inactivación de éstos. Mientras que para el Modelo II (panel C), la interacción entre estos procesos opuestos produce un mayor nivel de calcio en comparación con el Modelo III. La conclusión general es que de acuerdo con estos resultados se respalda un papel dominante para CatSper con respecto a los otros canales de Ca^{2+} : HVA y LVA.

3.3.4 Sobre la dependencia del pH_i

Se espera que las oscilaciones $[Ca^{2+}]_i$ sean sensibles al pH_i [49, 78]. En la Figura 3.5, para el Modelo I (panel 3.5A), aunque el efecto de las variaciones de pH_i se modula indirectamente a través de cAMPCC (vía sAC), las oscilaciones en el estado estacionario en presencia de HVA y LVA son básicamente imperturbables por la supresión del aumento de pH_i , siendo más notable que las oscilaciones se vuelven más simétricas en la red *knock-out*. Una situación similar se registra en el panel B, el Modelo II, ahora por el efecto de CatSper en lugar de cAMPCC. Para el Modelo III, donde hay conexión directa del pH_i a un canal de calcio (CatSper) y además dejan de incluirse LVA y HVA, se provoca un colapso total de los niveles de Ca^{2+} cuando el nodo de pH_i se elimina. Esto se muestra en el panel 3.5C.

3.3.5 El Modelo III resuelve una falla de la predicción del modelo anterior para la eliminación del nodo CaKC

En [39], a partir de la inspección visual de la evolución del sistema para condiciones iniciales específicas (todos los nodos apagados), Espinal et al. predijeron con la red del Modelo I que, con la eliminación del canal CaKC, se produce un aumento en el intervalo entre oscilaciones sucesivas de $[Ca^{2+}]_i$, así como una elevación en el nivel promedio de éstas últimas. En dicho trabajo, esto motivó a Espinal et al. a realizar experimentos en S.

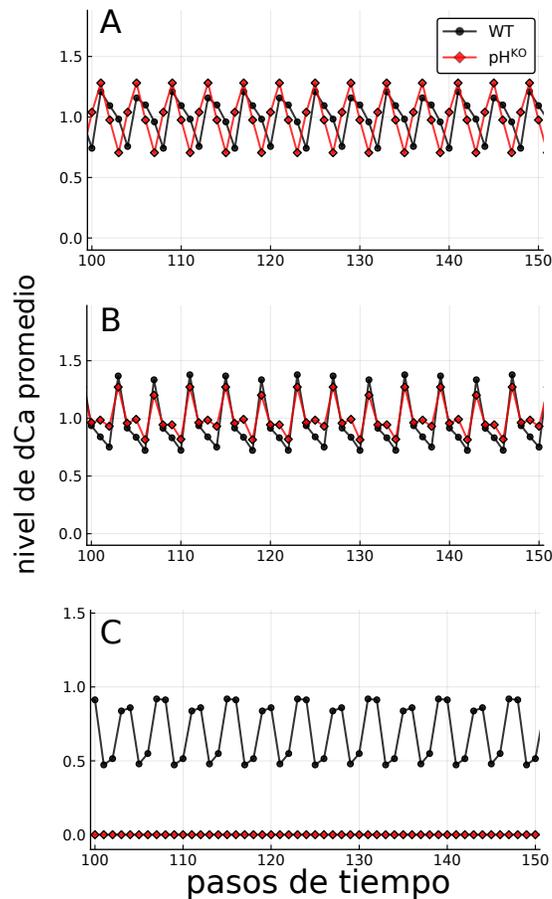


Figura 3.5: **Dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ de la red eliminando el nodo de pH_i para los tres modelos.** En el panel A, para la dinámica de calcio del Modelo I, con todos los nodos presentes (negro) y sin el nodo de pH (rojo); hay que observar que apenas hay diferencia en el nivel de calcio entre las dos situaciones. Una situación similar se presenta en el panel B para el Modelo II. El caso del Modelo III se muestra en el panel C, las fluctuaciones de calcio desaparecen por completo en ausencia del incremento de pH , esto es así porque el pH controla directamente el dinámica de Ca^{2+} .

purpuratus sobre el efecto de Iberiotoxina, un bloqueador potente y específico del canal $Slo1$ (BK), un canal de $K^+ Ca^{2+}$ -dependiente, los cuales mostraron un aumento del intervalo entre picos sucesivos de $[Ca^{2+}]_i$, corroborando así la predicción. Sin embargo, una percepción cualitativa de la intensidad fluorescente de las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ fue indicativa de un valor promedio menor que el caso WT (película suplementaria 3 en [39]). Aquí, al considerar el nodo dCa , que representa $[Ca^{2+}]_i$, ahora promediando su valor sobre 10^5 condiciones iniciales, se observa en los paneles A y C de la Figura 3.6 que para los modelos I y II, el valor promedio del calcio es mayor que el WT (en desacuerdo con el experimento) y la periodicidad aparentemente no se modifica sustancialmente (de nuevo en contraste con el experimento).

Para cuantificar el comportamiento temporal de las dinámicas de calcio, se realizó un análisis de espectro de potencias. En pocas palabras, los picos en los espectros de potencia son indicativos de las frecuencias más importantes en estas series de tiempo (modos de Fourier). Como se ha elegido la representación de frecuencia en este análisis, el

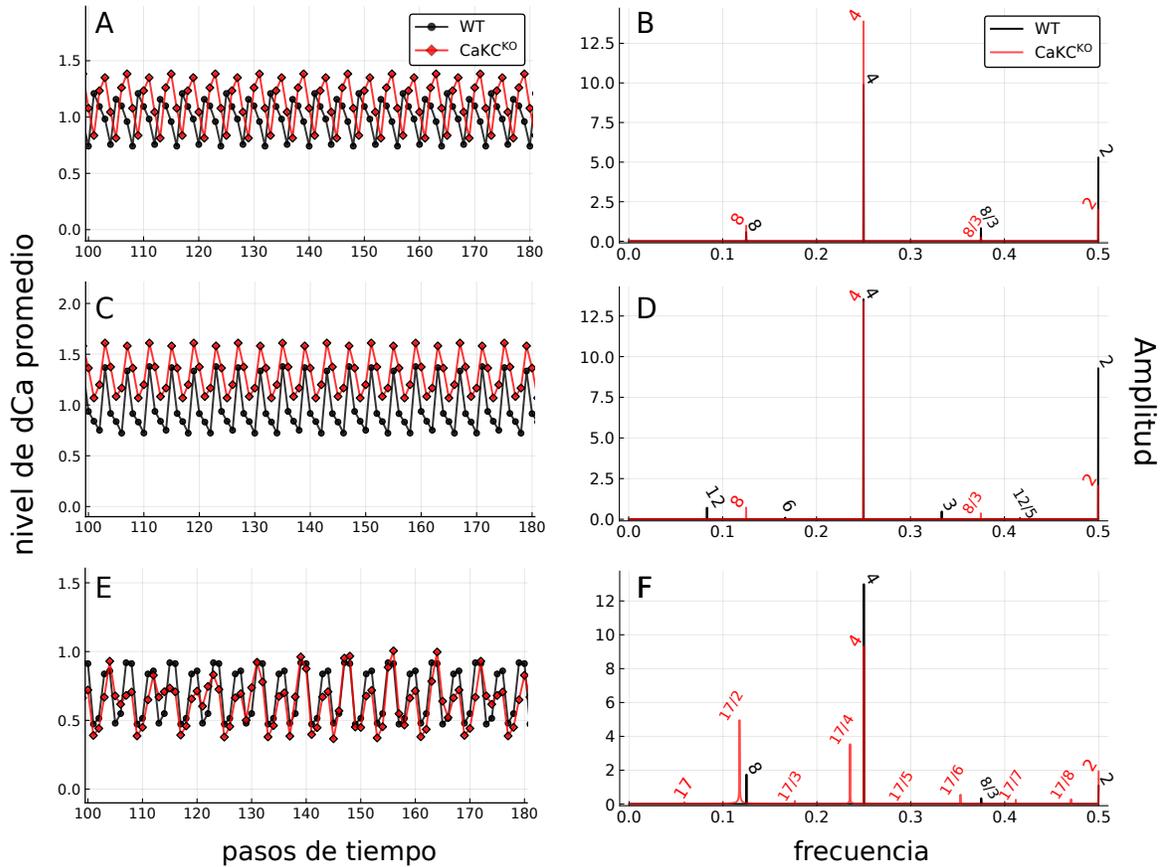


Figura 3.6: Dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ de la red eliminando el nodo de CaKC para los tres modelos. En la columna izquierda, paneles A, C y E, se muestra la dinámica de calcio promedio de los modelos I, II y III, respectivamente; las series de tiempo en negro vienen de la red completa *wild-type* (WT) y las rojas vienen de redes *knock-out* de CaKC ($CaKC^{KO}$). De la misma forma, en la columna derecha, paneles B, D y F, muestran sus respectivos espectros de potencias, con los modos de Fourier etiquetados con su período correspondiente. Los espectros de potencias se estimaron mediante el cálculo del periodograma con el método de FFT (Fast Fourier Transform), implementado en la librería DSP. jl del lenguaje Julia (<https://github.com/JuliaDSP/DSP.jl>). Las dinámicas analizadas se calcularon sobre 2500 iteraciones, de las cuales se desecharon las primeros 150 para asegurar estados estacionarios. Hay que observar que en los Modelos I y II, el tren de oscilaciones de las mutantes $CaKC^{KO}$ se monta en niveles más altos (promedio de 1.125 y 1.306) que los de sus correspondientes redes completas (promedio de 1 y 0.963). En contraste, en el Modelo III, la dinámica del calcio muestra un ligero decremento (promedio de 0.636) con respecto a la red completa (promedio de 0.693). La aparición de modos de Fourier en frecuencias más bajas (periodos más altos) con respecto al caso WT, es evidente sólo en el modelo III. La modificación en niveles promedio y la aparición de frecuencias más lentas en el modelo III, coincide con lo observado en experimentos del bloqueo de dicho canal por Iberiotoxina, reportados previamente [39].

inverso de la frecuencia asociada a cada modo de Fourier corresponde a los períodos más importantes de la dinámica del calcio. Estos modos dependen de la periodicidad de los estados estacionarios alcanzados por toda la dinámica de red y de las cuencas de atracción correspondientes a cada atractor.

El análisis del espectro de potencias, realizado como en [35], indica en la red del Modelo II la presencia de un modo de frecuencia más baja que en la versión que elimina el nodo CaKC (CaKC^{KO}), es decir, hay un componente de período más grande en el WT (período 12) con respecto al caso bloqueado de CaKC (período 8 en [Figura 3.6D](#)), lo cual va en la tendencia contraria de lo observado experimentalmente. En contraste con lo anterior, el comportamiento del Modelo III mostrado en paneles [3.6E](#) y [F](#), recupera ambas observaciones experimentales: un aumento en el período, reflejado por el espectro de potencias donde se representan modos de frecuencias más bajas (un modo fundamental de período 17) acompañado de una disminución en el nivel promedio de $[Ca^{2+}]_i$.

3.4 RESUMEN DE OBSERVACIONES SOBRESALIENTES

En la [Tabla 3.2](#), que resume los hallazgos principales de esta sección, se indica claramente que los mejores resultados se obtienen con el Modelo III, mientras que el Modelo II prácticamente no muestra ventajas sobre el Modelo I. Aquí se hace la comparación de cuatro determinaciones experimentales (sensibilidad a los niveles de pH_i , sensibilidad a la actividad de PDE y el efecto del bloqueo del CaKC) con las determinaciones modelo. Es importante recalcar que, si bien el Modelo II incluye el mayor número de componentes al introducir los dos tipos de canales, CatSper y los canales voltaje dependientes HVA y LVA (ver [Figs. 3.1](#) y [3.7](#)), no necesariamente es el escenario que da los mejores resultados con respecto de lo observado experimentalmente. Para situar el contexto de estos resultados con respecto a los componentes particulares de cada una de las tres variantes, se resaltan las diferencias que existen entre éstas últimas en la [Figura 3.7](#).

| Tratamiento | Medición | Modelo | | | Experimento |
|-----------------|--------------------|--------|----|-----|-------------|
| | | I | II | III | |
| Bloqueo de pH | Nivel de Ca^{2+} | - | - | ↓ | ↓ |
| Bloqueo de PDE | Nivel de Ca^{2+} | - | - | ↓ | ↓ |
| Bloqueo de CaKC | Nivel de Ca^{2+} | ↑ | ↑ | ↓ | ↓ |
| | Período | - | ↓ | ↑ | ↑ |

Tabla 3.2: **Resumen comparativo de observaciones en simulaciones vs experimento, para las tres variantes del modelo discreto.** La primera columna indica el tratamiento farmacológico en consideración; la columna 2 especifica la cantidad medida; la columna 3 se refiere a resultados del Modelo I; columna 4, resultados del Modelo II; columna 5, resultados del Modelo III; columna 6, determinaciones experimentales. ↑ corresponde a un aumento en la propiedad de calcio indicada en la columna de medición. ↓ está asociado con una disminución y “-” significa que no hubo cambios o que éstos fueron apenas notorios.

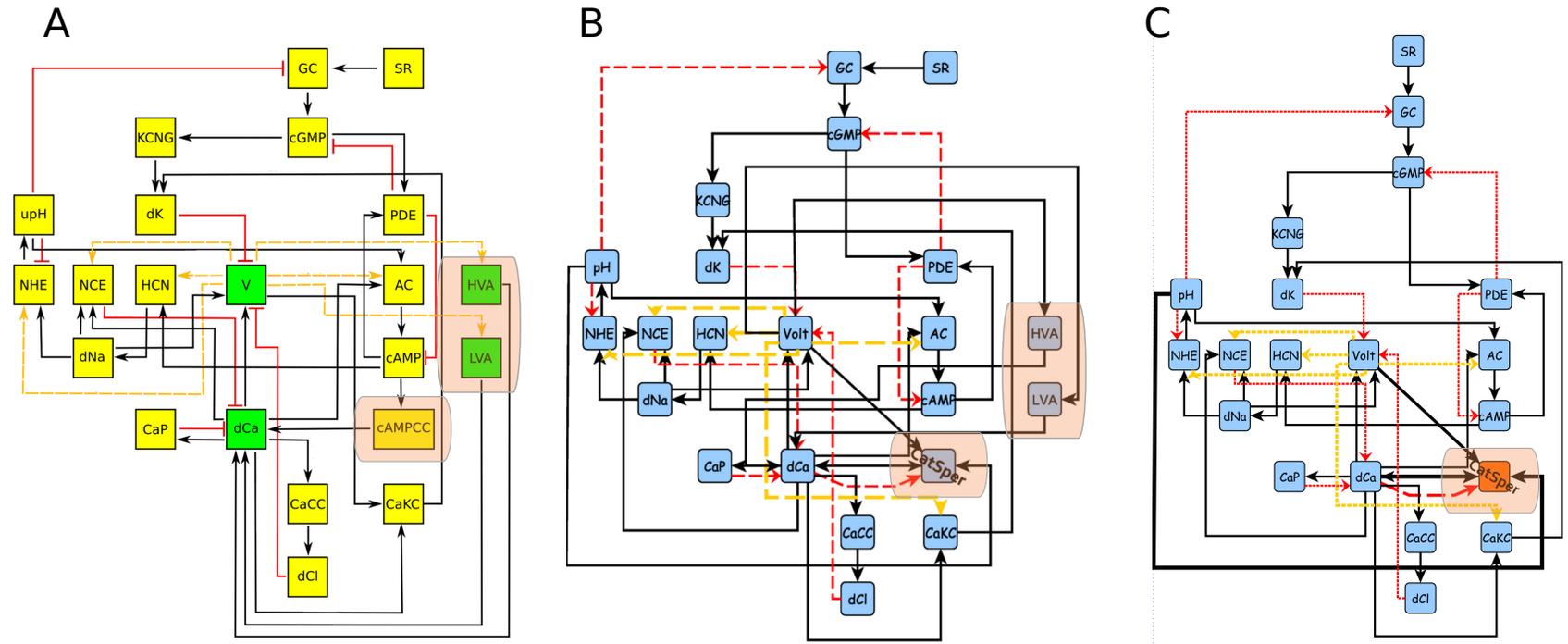


Figura 3.7: **Comparación de los Modelos I, II y III.** Los nodos que son diferentes entre las tres variantes están marcados con un recuadro sombreado: Para el Modelo I, en (A) se encuentra resaltados los nodos cAMPCC, HVA y LVA. En (B), se muestra el Modelo II con los nodos CatSper, HVA y LVA sombreados. Nótese la usencia de cAMPCC. El Modelo III resalta a CatSper (C), y tiene ausentes a HVA, LVA y cAMPCC con respecto a las otras dos variantes anteriores.

Parte III

MODELO CONTINUO

Mediante un modelo de ecuaciones diferenciales, se buscó responder la pregunta de cuál es el conjunto de canales que pueden explicar la envolvente característica y la organización temporal de los trenes de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$. La calibración de la red de señalización se abordó por módulos. El módulo disparador, el cual inicia la respuesta, vincula la actividad de SAP con el cGMP y el potencial de membrana río abajo, a través de la activación del receptor, síntesis y decaimiento de cGMP, hiperpolarización y repolarización de la membrana. Las salidas de este módulo se ajustaron a datos cinéticos sobre la actividad de cGMP y el potencial de membrana temprano, medidos en poblaciones de células en solución. Dos módulos candidatos que presentan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje vinculan estas salidas a la dinámica descendente y pueden explicar de forma independiente el decaimiento de la envolvente y el espaciamiento progresivo entre picos de $[Ca^{2+}]_i$. En el primer módulo, los trenes de oscilaciones son explicados por la acción concertada de canales clásicos tipo Ca_V y canales BK. En el segundo, la dinámica es producida por CatSper, un canal dependiente del pH_i e inhibido por $[Ca^{2+}]_i$. Además, se demuestra que la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ generada por una alcalinización sostenida permitiría identificar si predomina CatSper o un módulo pH -independiente de Ca_V+BK . Finalmente, el modelo predice que el módulo Ca_V+BK puede complementar al módulo CatSper+sNHE si es agregado en densidades bajas, sin embargo, interfieren entre sí cuando la estequiometría entre ellos se aproxima a 1:1, ya que se producen dinámicas incongruentes con experimentos. Esto lleva a sugerir que uno de los módulos debería predominar sobre el otro *in vivo*. Dada la dependencia fuerte de las oscilaciones de calcio sobre pH_i , se sugiere que dicho módulo debe ser el que contenga a CatSper

MODELO CONTINUO

Model building is the art of selecting those aspects of a process that are relevant to the question being asked.

JOHN HENRY HOLLAND, *Hidden order*, 1995 [79]

4.1 ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN

Los resultados de la sección anterior demostraron que, bajo una modelación discreta, la exploración de diferentes escenarios favorecen a CatSper como el canal dominante con respecto a los canales de calcio puramente voltaje dependientes, los cuales habían sido inicialmente propuestos en trabajos previos de modelación [39, 40]. Sin embargo, este tipo de modelos guarda limitaciones inherentes al mismo formalismo, ya que a la hora de describir las concentraciones y los detalles cinéticos se dificulta la obtención de conclusiones al comparar las simulaciones con experimentos cuantitativos. Hay que recordar que en las redes lógicas, los estados asociados a cada nodo se interpretan prácticamente con niveles de actividad siguiendo un principio de *todo o nada*. Por lo anterior, en todas las variantes de modelo discreto para esta vía, está implícita la suposición de una densidad equiparable entre todos los tipos de canales, i. e. una estequiometría 1:1. Es de notarse que bajo este modelo, la predicción de que los canales de calcio voltaje dependientes (Ca_V) podrían tener un papel secundario deja la pregunta abierta sobre en qué medida se sostiene la predominancia de CatSper, es decir, bajo qué estequiometrías con respecto a los Ca_V . Para poder explorar cuáles son las relaciones entre estos tipos de canales que explican las observaciones experimentales, es necesario recurrir a otro formalismo que supere las limitaciones de la modelación discreta. En un modelo basado en ecuaciones diferenciales ordinarias, el estado de las variables de estado y de tiempo pueden tomar valores de un rango continuo, dentro del conjunto de números reales.

Aguilera et al. propusieron un modelo de ecuaciones diferenciales acopladas para un subconjunto reducido de elementos participantes de la misma vía activada por SAPs [40]. Sólo consideraron la cinética de 5 variables: voltaje, Ca^{2+} , K^+ , Na^+ y Cl^- ; mientras que los niveles de apertura de compuerta de 4 canales iónicos: HVA, CaKC, HCN y CaCC, se modelaron con funciones algebraicas que provienen de simplificaciones que suponen estados estacionarios. El propósito de dicho trabajo fue encontrar las variables esenciales del oscilador central. Debido a esto, el modelo que desarrollaron es aún más reducido y enfocado a únicamente corrientes iónicas, ignorándose todos los pasos relacionados con los procesos iniciales de la vía, tales como: la activación del receptor, dinámica de nucleótidos cíclicos y el cambio de pH_i . Cabe mencionar que las variables que encuentran como indispensables para el oscilador fueron Na^+ , K^+ y Ca^{2+} .

En el siguiente modelo continuo de la *VSAS*, con un enfoque alternativo al discreto, se propone un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas para explorar cuáles de los supuestos canales de calcio pueden mediar la respuesta de Ca^{2+} activada por SAP. De esta forma, se pueden aprovechar completamente la información cuantitativa y cinética disponible en datos experimentales; cabe mencionar que este nuevo modelo incluye un conjunto de variables mayor y, a diferencia del modelo continuo mencionado anteriormente [40], su calibración se realizó apeándose a más datos experimentales.

La pregunta que se busca responder es qué canales pueden intervenir y cómo controlan las características dinámicas relevantes de los trenes de oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observados. El objetivo es contrastar las diferentes hipótesis con base en sus implicaciones cuantitativas con el fin de identificar las propiedades críticas que pueden usarse como guía para desentrañarlas experimentalmente.

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Plataforma de modelación general

La estrategia para este modelo es describir la dinámica de la vía de señalización activada por SAP para comprender cómo las fluctuaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se pueden controlar por componentes moleculares propuestos. Se plantea un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas para describir la dinámica del potencial de membrana y de las concentraciones intraflagelares de tres componentes fisiológicos esenciales para la vía: cGMP, protones y Ca^{2+} . Estas cuatro variables dependen a su vez de las actividades de diferentes canales iónicos y enzimas flagelares, cuyas dinámicas también son descritas por ecuaciones de este tipo. Estas variables constituyen las principales observables en el modelo y ofrecen los medios para evaluar sus predicciones luego de contrastarlas con datos experimentales. La derivación de cada una de las ecuaciones empleadas para modelar los procesos de señalización y apertura de compuertas de canales iónicos se presenta en la sección B.1.

4.2.1.1 Potencial de membrana

La dinámica del potencial de membrana, V , sigue el formalismo de Hodgkin & Huxley (HH) [80], el cual se expresa por una ecuación diferencial en términos de la suma de densidades de corrientes iónicas normalizada por la capacitancia específica del flagelo, tal como dicta la ley de Kirchoff sobre conservación de cargas:

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{1}{C_m} \left(I_L + \sum_i I_i \right). \quad (4.2.1)$$

Cada corriente, subíndizada con la letra i , está asociada a un tipo de canal dado a ser elegido de un conjunto de canales iónicos, $i \in \{\text{KCNG}, \text{HCN}, \text{Ca}_V, \text{BK}, \text{CatSper}\}$. Los términos relacionados con cada corriente I_i están definidos de acuerdo con la ley de Ohm:

$$I_i = g_i f_i^o (V - E_i), \quad (4.2.2)$$

donde

E_i potencial de inversión asociado a la corriente del canal i

f_i^o fracción de canales i abiertos que conducen la corriente

g_i conductancia efectiva del canal i por unidad de área

La densidad de conductancia g_i viene definida como el producto de la conductancia unitaria del canal por la densidad total de canales presente en la membrana del flagelo. Siguiendo la tradición del modelo de HH, definimos un término de corriente de fuga $I_L = g_L(V - E_L)$, el cual permite asegurar que el potencial de membrana en reposo $\hat{V} = E_m$ se alcance asintóticamente al imponer la siguiente restricción sobre E_L , dados los parámetros y variables f_i en el equilibrio:

$$E_L = E_m \left(1 + \sum_i \frac{g_i}{g_L} \hat{f}_i E_i \right). \quad (4.2.3)$$

La corriente de fuga es una aproximación para incluir en un sólo término la corriente neta que surge de todos los canales y transportadores que no son explícitamente descritos en el modelo.

Como aclaración sobre la notación, a lo largo de esta sección, una variable dada x adornada con un sombrero (\hat{x}) se refiere al valor de dicha variable en el equilibrio.

4.2.1.2 Concentración de nucleótidos cíclicos

Las concentraciones de los segundos mensajeros **cGMP** y **cAMP** aumentan en el flagelo del espermatozoide en respuesta a los estímulos de **SAP**. Estos nucleótidos afectan la permeabilidad de varios canales iónicos controlados por nucleótidos, a su vez cambiando el potencial de membrana. Teniendo en cuenta que el **cGMP** es el nucleótido que muestra los cambios más grandes después de la unión de **SAP** y que la liberación de su análogo fotoactivable dentro del flagelo es suficiente para producir una respuesta muy similar a la provocada por el ligando fisiológico (Figura 1.3), el análisis posterior se restringió a este nucleótido, ignorando el papel eventual del **cAMP**. La concentración intraflagelar de **cGMP** se denota por G y su dinámica se describe por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dG}{dt} = \sigma_G - \delta_G G + \theta_G \rho_G. \quad (4.2.4)$$

En esta ecuación, se sugiere que las actividades de guanilato ciclasas y fosfodiesterasas generales conducen a un cambio constitutivo de **cGMP**, con una fuente constante, σ_G , y una constante de degradación δ_G . En ausencia de una señal de **SAP**, este recambio resulta en una concentración estacionaria en reposo de **cGMP**, derivada como $G_r = \sigma_G / \delta_G$. Otra suposición esencial para el modelo es que este recambio se ve perturbado por la producción de **cGMP** a cargo de la actividad de los receptores estimulados por **SAP**, descrito por el término ρ_G .

G se comparó con datos provenientes de experimentos de población de células en solución, en los cuales se reportan medidas de **cGMP** total por radioinmunoensayo [6]. Dado que la variable G representa la concentración intraflagelar efectiva de **cGMP** disponible para generar una respuesta en un espermatozoide, más específicamente, capaz de unirse al

KCNG, fue necesario introducir un factor de escalamiento para el término ρ_G . Este factor, θ_G , consiste del producto del volumen flagelar (v_f), capacidad de amortiguamiento de cGMP en el flagelo (B_G) y la constante de Avogadro (N_A). De esta forma, sólo una fracción del cGMP total sintetizado por los receptores activos participa en la respuesta de señalización y la señal de G se sitúa dentro del rango de sensibilidad nM reportado para el canal **KCNG** [16] (Sección B.1.2).

4.2.1.3 Concentración de protones

La permeabilidad de algunos canales se ve afectada por la concentración citoplásmica de protones. La concentración intraflagelar de protones, denotada por H , se describe mediante la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dH}{dt} = \sigma_H - \delta_H H - \frac{J_H}{v_f}, \quad (4.2.5)$$

que supone una fuente de protones intraflagelares σ_H , un recambio basal δ_H y el flujo de protones J_H mediado por la actividad del intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoides (sNHE). Este último término está dividido por el volumen flagelar (v_f) a fin de transformar el flujo en unidades de cambios de concentración. Los valores de los parámetros están restringidos al imponer que la concentración basal de protones, obtenida al resolver H para el equilibrio, sea 7.943×10^{-8} M ($\text{pH}_i=7.1$, Tabla B.1). Los cambios relativos de H en el tiempo se comparan con señales de sondas fluorescentes sensibles al pH, ya sean medidas en poblaciones de espermatozoides [48] o en células individuales [49].

4.2.1.4 Concentración de calcio intraflagelar

La concentración intraflagelar de Ca^{2+} , representada por la variable C , es la observable principal de este estudio. Su dinámica está descrita por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dC}{dt} = \sigma_C - \delta_C C - \frac{s_f}{2v_f F} \sum_j I_j, \quad (4.2.6)$$

con $j \in \{\text{Ca}_V, \text{CatSper}\}$. Al igual que en el caso de los componentes anteriores, se consideran que las diferentes fuentes y sumideros del Ca^{2+} intraflagelar resulta en una tasa de producción constante σ_C y una tasa de recambio basal δ_C . La dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está controlada además por las actividades de canales de calcio, descritas por el tercer término en la ecuación como la suma de las densidades de corriente iónica reescaladas por la relación del área de la membrana del flagelo (s_f) sobre el producto de la carga iónica del calcio, el volumen flagelar (v_f) y la constante de Faraday (F). La lista de corrientes a considerar dependerá del escenario que se analice.

La variable C se comparará con los datos medidos por sondas fluorescentes sensibles al Ca^{2+} , ya sea en células individuales o en poblaciones [6, 8, 9]. Se usarán medidas de células individuales para analizar la estructura temporal y la magnitud de los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mientras que las mediciones de la población dan solo información sobre la envolvente del tren de fluctuaciones.

4.2.2 Implementación computacional y estimación de parámetros

Los sistemas de ecuaciones diferenciales se resolvieron numéricamente con Mathematica 11, XPPAUT 8 ó R (utilizando el paquete deSolve). XPPAUT 8 se usó para los análisis de bifurcaciones (ver abajo). Mathematica se utilizó además para hacer estimación de parámetros ajustando los modelos a observaciones experimentales usando la función NonlinearModelFit con el método de optimización Differential Evolution con restricciones.

En el análisis se delimitaron módulos que incluyen un subconjunto específico de las variables presentadas anteriormente. Algunos de estos módulos se usaron para hacer la estimación de parámetros y algunos se usaron para analizar propiedades específicas. El ajuste del módulo disparador se realizó en dos partes:

- El espacio de estados comprendido por las variables (S, R_H, R_L, G) , que incluye las reacciones que involucraban al receptor SAP (Ecuación B.1.3) y la dinámica del cGMP (Ecuación 4.2.4), se ajustó a los datos cinéticos de cGMP medidos en poblaciones de células [6]. Los datos se extrajeron de la publicación y están expresados en unidades de pmol por 10^8 células. Se hizo un ajuste simultáneo sobre las curvas de cGMP obtenidas bajo diferentes concentraciones de SAP [6] (Figura B.1). Para dicho ajuste, no se incluyó el parámetro θ_G (descrito en la sección 4.2.1.2), ya que los datos experimentales usados para la calibración de G corresponden a concentraciones totales de cGMP y la introducción de dicho parámetro sólo es pertinente en la dinámica de apertura de KCNG.
- Las variables restantes del módulo, (f_{kn}^o, f_{hc}^o, V) , que involucran los cambios electrofisiológicos tempranos provocados por SAP, i. e. hiperpolarización y repolarización debido a la apertura de KCNGy spHCN, respectivamente. Primero se hizo el ajuste de parámetros de compuerta de los canales iónicos: para spHCN se extrajeron y calcularon a partir de [58, 59, 81, 82], mientras que los de KCNG se basaron en los valores reportados en [16-18]. Después, se calibraron los parámetros de densidad de esos canales junto con B_G (incluido como parámetro libre en el factor de escalamiento θ_G), esto mediante el ajuste de la dinámica de V con los datos cinéticos de [18], que comprenden la respuesta temprana del cambio de potencial de membrana. En este módulo, debido a que sólo era de interés explicar el comportamiento transitorio temprano en términos de estos dos canales, sólo se consideraron los datos correspondientes al primer segundo de la serie de tiempo.

Para poder calibrar este módulo, se hizo la suposición de que la dinámica general tanto en los regímenes de célula individual como en los de población puede ser comparable utilizando un factor de escalamiento; este factor depende del término del volumen flagelar para convertir la señal de cGMP en una concentración efectiva con un efecto fisiológico a nivel de célula individual (ver parámetro θ_G , sección 4.2.1.2).

Para estudiar la dinámica del calcio intraflagelar, se exploró la posible contribución de diferentes canales bajo dos escenarios principales.

- En un escenario, el modelo presenta el módulo Cav + BK y tiene el espacio de estado $(S, R_H, R_L, G, f_{kn}^o, f_{hc}^o, V, f_{cv}^o, f_{cv}^c, f_{bk}^o, C)$. La estimación de los parámetros de Cav

se basó en las características de los canales de Ca^{2+} tipo T activados por voltaje de bajo umbral [83], para los cuales hay evidencia que sugiere su presencia en los espermatozoides [8, 18] (Tabla 2.1), además de seguir criterios que favorecieran la generación de oscilaciones de calcio en rangos fisiológicamente razonables.

- En el escenario alternativo, el modelo presenta al módulo **CatSper + sNHE** y tiene el siguiente espacio de estado ($S, R_H, R_L, G, f_{\text{kn}}^o, f_{\text{hc}}^o, V, m_{\text{cs}}, h_{\text{cs}}, f_{\text{nh}}^a, C, H$). Se establecieron los parámetros de compuerta de CatSper para situar su rango de sensibilidad a Ca^{2+}_i y pH_i dentro de los rangos de valores fisiológicamente alcanzables en una respuesta por **SAP** (Figura B.3).

4.2.3 Parametrización en escenarios mixtos

También se analizaron mezclas de los módulos $\text{Ca}_V + \text{BK}$ y **CatSper + sNHE**, creando así el modelo más extendido con espacio de estado ($S, R_H, R_L, G, f_{\text{kn}}^o, f_{\text{hc}}^o, V, f_{\text{cv}}^o, f_{\text{cv}}^c, f_{\text{bk}}^o, m_{\text{cs}}, h_{\text{cs}}, f_{\text{nh}}^a, C, H$). Además, fue necesario introducir un parámetro de ponderación, θ , para controlar directamente la contribución de los módulos; éste parámetro modula a las densidades de conductancia de CatSper, Ca_V y BK de la siguiente manera:

$$I_{\text{cs}} = (1 - \theta) (g_{\text{cs}} m_{\text{cs}} h_{\text{cs}} (V - E_{\text{Ca}})), \quad (4.2.1a)$$

$$I_{\text{cv}} = \theta (g_{\text{cv}} f_{\text{cv}}^o (V - E_{\text{Ca}})), \quad (4.2.1b)$$

$$I_{\text{bk}} = \theta (g_{\text{bk}} f_{\text{bk}}^o (V - E_{\text{K}})). \quad (4.2.1c)$$

A partir de las ecuaciones anteriores, se puede expresar una relación de la conductancia máxima efectiva de Catsper con respecto a la de Ca_V :

$$r_g = \frac{(1 - \theta) g_{\text{cs}}}{\theta g_{\text{cv}}}. \quad (4.2.2)$$

Siempre tomando al módulo **CatSper + sNHE** como punto de partida, el análisis de escenarios mixtos se dividió en tres partes: a) Añadir sólo canales Ca_V , b) añadir sólo canales BK, y c) añadir $\text{Ca}_V + \text{BK}$. Debido a que los parámetros que controlan el estado de equilibrio en reposo difieren entre los dos módulos alternativos (g_L y δ_C , ver Tabla B.1), para asegurar la recuperación consistente de los comportamientos predichos por cada módulo en los casos extremos ($\theta=0$ y $\theta=1$), se reescalaron estos parámetros de una forma dependiente de θ de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\delta_C = \delta_C^{\text{cs}} + \theta (\delta_C^{\text{cv}} - \delta_C^{\text{cs}}), \quad (4.2.3a)$$

$$g_L = g_L^{\text{cs}} + \theta (g_L^{\text{cv}} - g_L^{\text{cs}}), \quad (4.2.3b)$$

donde los superíndices cs y cv etiquetan a las variantes de los parámetros según el módulo al cual pertenecen (**CatSper + sNHE** y $\text{Ca}_V + \text{BK}$, respectivamente).

4.2.4 Consideraciones para el sistema en reposo y condiciones iniciales

Las condiciones iniciales de las variables de compuerta de **KCNG**, **spHCN**, **Ca_v**, **BK** y **sNHE**, así como los parámetros σ_C , E_L y δ_H , se calcularon al resolver el sistema en equilibrio en ausencia de **SAP**, es decir, igualando cada una de las ecuaciones diferenciales a 0. Las observables fisiológicas G , C , H y V se inicializaron en sus respectivos valores de reposo reportados en la literatura ([Tabla B.1](#)). Los parámetros que rigen la activación de **sNHE** se eligieron de forma que aproximadamente el 40 % de los intercambiadores estuvieran activos en el estado de reposo, tal como se observa experimentalmente en los espermatozoides activados ya en movimiento antes de cualquier estimulación [[84](#), [85](#)], mientras que el flujo efectivo máximo de protones por **sNHE**, J_{\max} , se ajustó para acotar el pH_i máximo alcanzable en ~ 7.7 , luego de una estimulación fisiológica por **SAP** [[56](#), [76](#)].

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Una red de señalización modular

El modelo cinético de la red señalización que se plantea aquí se ilustra en la [Figura 4.1](#). La red está organizada en tres módulos: un módulo disparador, que incluye la unión de **SAP** a su receptor, las reacciones que generan la respuesta de **cGMP** y la típica caída transitoria del potencial de membrana V , y dos módulos alternativos conectados inmediatamente al potencial de membrana que generan la respuesta oscilatoria de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El módulo **Ca_v + BK** incluye los canales de calcio dependientes de voltaje y los de potasio Ca^{2+}_i -dependientes **BK**; mientras que el módulo **CatSper + sNHE** está compuesto por **CatSper**, el canal específico de espermatozoide, dependiente de voltaje, pH_i y Ca^{2+}_i , y también la concentración de protones intraflagelares junto con el intercambiador de sodio/protón dependiente de voltaje, específico de espermatozoide. La estructura modular facilitó el análisis del modelo y abordar la pregunta sobre qué conjunto de canales controlan los trenes de oscilaciones de calcio provocados por **SAP**. Un listado de los sistemas de ecuaciones asociados a cada módulo se concentra en la [Sección B.2](#).

Teniendo en cuenta que todos los componentes del módulo superior son independientes de las variables de los módulos alternativos, primero se desarrolló el módulo disparador, esto de forma aislada de la dinámica subsecuente que se involucra directamente con el calcio. Al hacerlo, se aseguró que este primer módulo se ajustara cuantitativamente a series de tiempo de potencial de membrana [[18](#)] y **cGMP** [[6](#)], ambas medidas en poblaciones de espermatozoides estimulados con **SAP** ([Subsección B.1.1](#)). Los valores de los parámetros obtenidos en este módulo se mantuvieron para los análisis posteriores de la dinámica de los componentes río abajo. En dichos análisis, el ajuste de los módulos que presentaban canales de Ca^{2+} se realizó buscando que, dada la entrada del módulo disparador, produjeran una salida en la variable correspondiente al calcio (C) que asemejara a los trenes de fluctuaciones observados en flagelos; es decir, cada uno de los módulos putativos estuvieron restringidos por dos conjuntos de datos independientes, río arriba y río abajo. Por lo tanto, mediante el acoplamiento de los módulos **Ca_v + BK** y **CatSper+sNHE** al módulo disparador, se

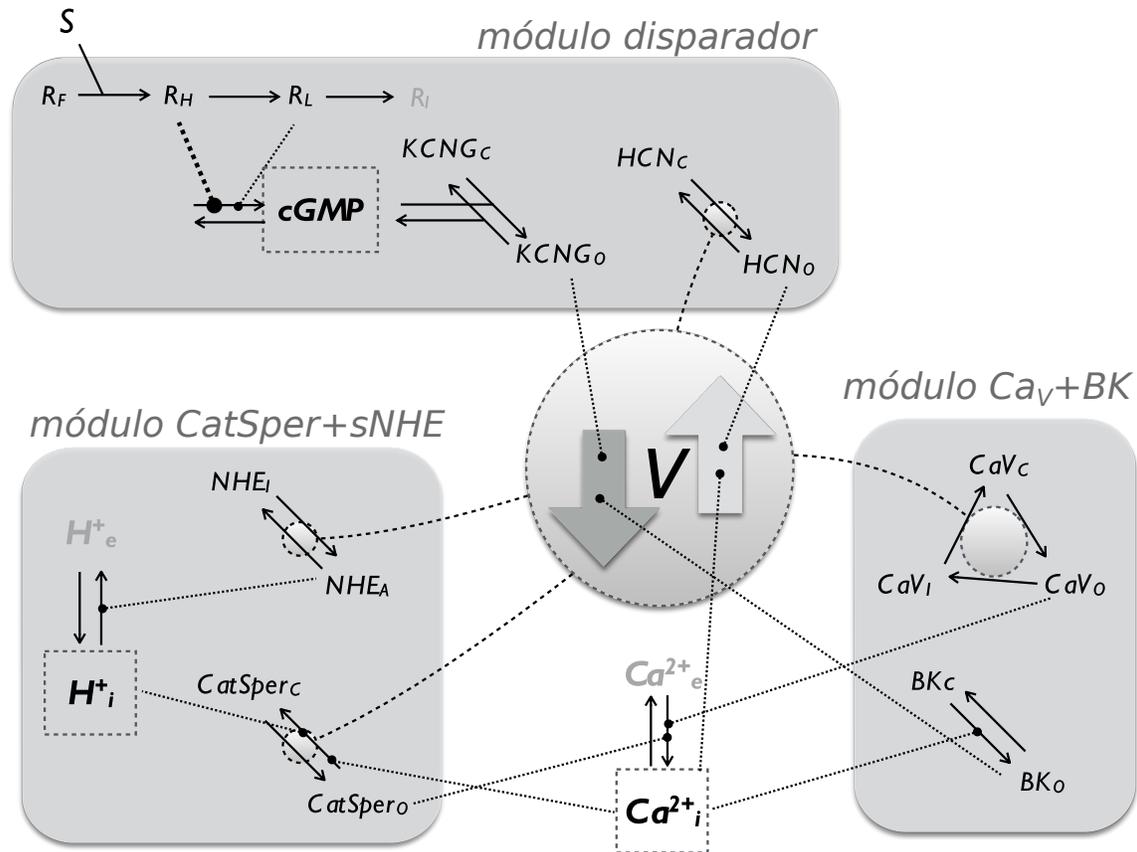


Figura 4.1: Organización modular de la red de señalización transductora de la señal de SAP hacia trenes de oscilaciones de calcio. Se muestra la separación en 3 módulos, enlazados a través de la variable del potencial de membrana (V). En el módulo disparador (descrito por las variables S , R_H , R_L , G , f_{kn}^o , f_{hc}^o) los receptores (R) captan moléculas de SAP (S) y transitan irreversiblemente por tres estados, cada uno con menor actividad de guanilato ciclasa: Alta (R_H), baja (R_L) e inactiva (R_i); el $cGMP$ sintetizado por estos receptores abre a los canales $KCNG$, ($KCNG_o$), los cuales conducen una corriente saliente de potasio que hiperpolariza (flecha hacia abajo) el potencial de membrana (V). Los niveles hiperpolarizados de V promueven la apertura de los canales $sHCN$ (HCN_o), los cuales ejercen la acción opuesta sobre V al conducir una corriente entrante catiónica. Se presentan dos módulos alternativos para explicar los trenes de oscilaciones de calcio: uno que incluye a canales clásicos voltaje dependientes y canales BK , y otro que considera a $CatSper$, al intercambiador $sNHE$ y concentración de protones. Hay que notar en el módulo Ca_V , el canal de calcio sólo es dependiente de voltaje, mientras que $CatSper$ tiene triple regulación (Ca^{2+} , H^+ y V)

muestra en las secciones 4.3.3.2 y 4.3.3.1 que ambos puede reproducir independientemente los patrones observados en trenes de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$.

4.3.2 Módulo disparador de la respuesta activada por SAP

El $cGMP$ es el componente central del módulo disparador de transducción de señal de SAP. Se eleva en respuesta a la actividad de guanilato ciclasa inducida por la activación de receptores de SAP y activa canales $KCNG$, que a su vez conducen corrientes hiperpo-

larizantes. Espermatozoides de *A. punctulata* estimulados con el SAP resact exhiben una respuesta de cGMP rápida que alcanza su nivel máximo antes de ≈ 400 ms y rápidamente cae a una pseudo-meseta que decae lentamente durante varios segundos, esto según lo reportado en [6]. Para explicar la dinámica bifásica se propuso que los receptores de SAP transitan irreversiblemente a través de tres formas con diferentes niveles de actividad de guanilato ciclasa asociada (Figura 4.1, Subsección B.1.1).

Primero se ajustó la cinética de activación del receptor y la generación de la señal de cGMP con datos publicados de ensayos en poblaciones de espermatozoides estimulados con pulsos de SAP desenjaulado, en un rango de concentración que abarca varios órdenes de magnitud [6]. Esto permitió encontrar constantes cinéticas para las transiciones del estado de los receptores, así como la síntesis y la degradación de cGMP (Figura B.1). Antes de calibrar el voltaje y la dinámica de los canales iónicos, y para luego poder calibrar los módulos alternativos de oscilaciones de calcio, se utilizaron factores adecuados para extender las simulaciones a regímenes de células individuales. Hay que recordar que las series de tiempo experimentales usadas en este módulo vienen de poblaciones de células. Con estos factores se pueden convertir las cantidades totales de cGMP en una concentración efectiva capaz de abrir canales de KCNG en un flagelo de espermatozoide (sección 4.2.1.2).

Los parámetros de densidad de canales KCNG y spHCN se ajustaron a datos de cinética del potencial de membrana medidos con indicadores fluorescentes en poblaciones de espermatozoides [18], y se encontraron valores que reproducen la caída transitoria temprana del potencial de membrana y de forma parcial la recuperación de éste mismo (Figura 4.2). Para ilustrar la contribución separada de cada canal, se muestra un caso de referencia donde KCNG es el único canal presente (línea punteada en la Figura 4.2) y, como se esperaba, su apertura lleva al potencial de membrana hacia E_K (potencial de Nernst de potasio) ≈ -80 mV. Este último valor de referencia plantea un límite para V , el cual queda por debajo del valor mínimo alcanzado de V en la simulación del caso KCNG + spHCN, contrario a lo que usualmente se supone en la literatura, i. e. $V = E_K$. Vale la pena notar que bajo este escenario, en el cual únicamente están presentes estos dos canales, no es posible encontrar una combinación de densidades de canal con la cual la corriente de spHCN sea capaz de reequilibrar V hacia sus niveles de reposo, sin comprometer la magnitud de la hiperpolarización transitoria por KCNG. Lo anterior evidencia que la recuperación total del voltaje requeriría de la actividad de otro tipo de canales iónicos adicionales, que llevaran corrientes despolarizantes y que se activaran por estas mismas, e. g. canales de calcio.

4.3.3 *Dos módulos de señalización candidatos pueden explicar la estructura de los trenes de oscilaciones de calcio*

Dos módulos de señalización alternativos, etiquetados como $Ca_V + BK$ y $CatSper + sNHE$, pueden explicar la envolvente característica y el intervalo creciente entre picos consecutivos de $[Ca^{2+}]_i$ cuando se acoplan por aparte al módulo disparador (ver Figura 4.1). Estos módulos están compuestos de combinaciones de canales iónicos y transportadores. Estas combinaciones específicas se seleccionaron por su capacidad de producir una serie de fluctuaciones de calcio que recapitula cuantitativamente las observadas experimentalmente en células individuales, y reciben como entrada la cinética de cGMP producida en el módulo

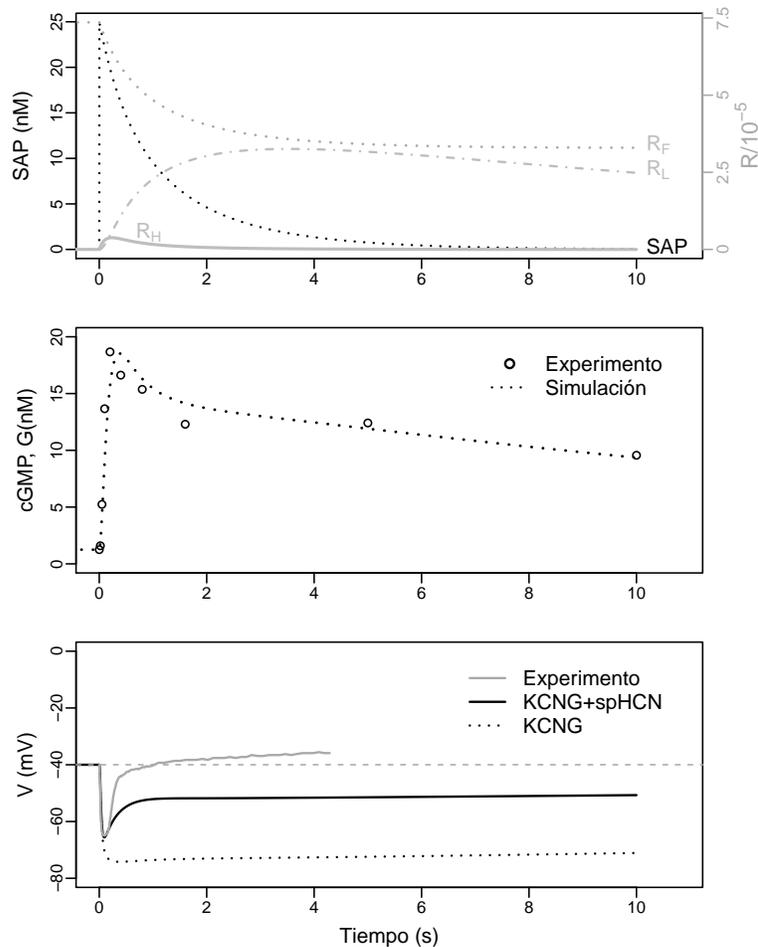


Figura 4.2: **Solución numérica del módulo disparador con $S(0)=25$ nM.** Los datos experimentales se extrajeron directamente de figuras publicadas en la literatura (cGMP de [6], V de [18]). Se escogió como referencia la estimulación de un pulso inicial de 25 nM SAP, ya que en esta concentración se satura la respuesta de V .

disparador (Figura 4.2). En otras palabras, las soluciones numéricas de estos módulos conducen a trenes de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ cuyas amplitudes e intervalos entre picos consecutivos se encuentran dentro del rango relativo de los observados en espermatozoides individuales de *S. purpuratus* estimulados con el SAP speract (Figura 4.3). Los dos módulos y sus propiedades se describen por separado en las siguientes dos secciones.

4.3.3.1 Módulo Ca_V+BK y sus propiedades dinámicas

En la literatura sobre señalización de SAP en espermatozoides de erizo de mar, los primeros canales de Ca^{2+} que se plantearon como posibles participantes en la vía fueron los Ca_V ; siguiendo esta misma cronología, se presenta primero el análisis de su módulo correspondiente. La estructura del módulo se presenta en la Figura 4.1, la cual se caracteriza por la inclusión de canales Ca_V y canales BK (de potasio dependientes de Ca^{2+}). En dicho modelo cinético, se plantea que los canales Ca_V cambian de estado irreversiblemente a través de tres formas - inactivo, cerrado y abierto - que definen un ciclo ordenado, en el cual

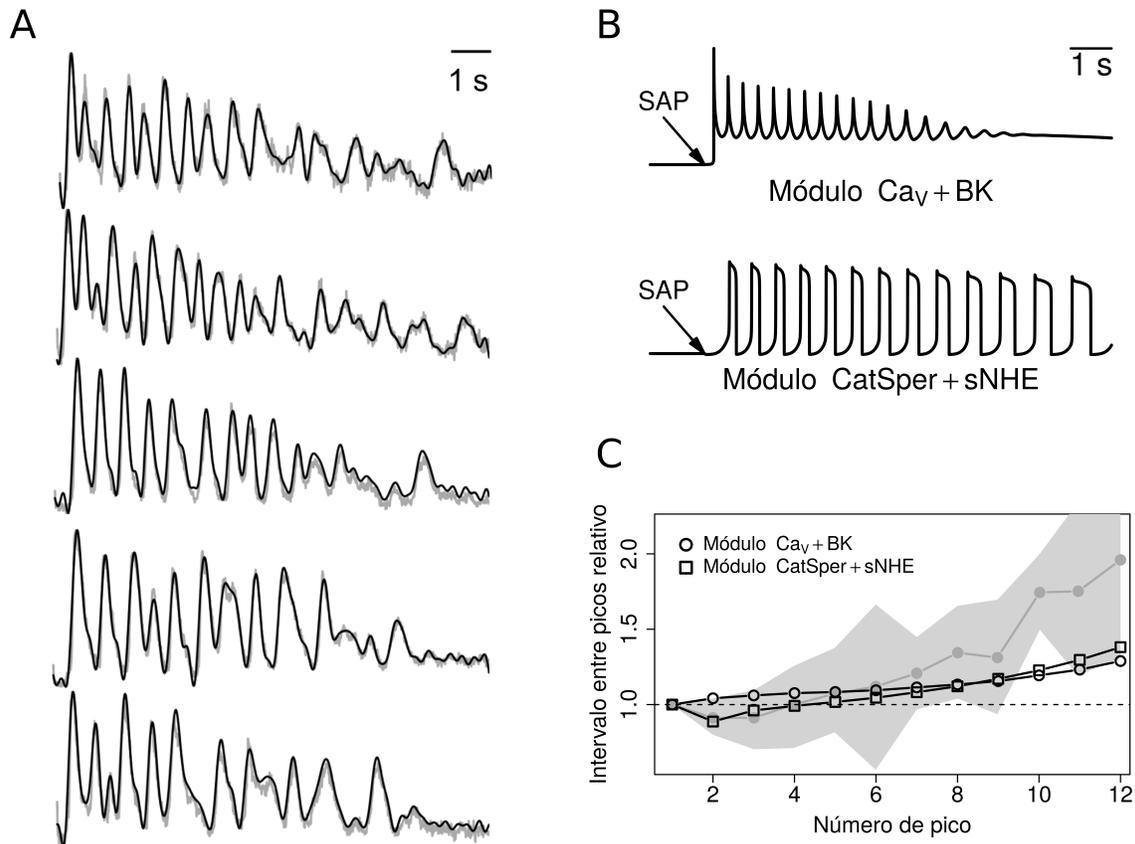


Figura 4.3: **Trenes de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ provocados por SAP en flagelos de espermatozoides de erizo de mar y su modelación.** (A) Ejemplos de series de tiempo de $[Ca^{2+}]_i$ medidas con sondas fluorescentes en flagelos de espermatozoides individuales de *S. purpuratus*, los cuales fueron pegados a un cubreobjetos y estimulados con un análogo de speract desenchaulado por luz UV. (B) Dinámicas de calcio generadas por soluciones numéricas del modelo que incluye al módulo Ca_V + BK o el módulo CatSper + sNHE, acoplado con el módulo disparador. (C) Organización temporal del intervalo entre picos consecutivos. En gris se muestran estimaciones provenientes de mediciones experimentalmente en más de 100 flagelos, donde los puntos grises señalan la mediana, y la banda gris el rango intercuartil; las mismas medidas hechas sobre la solución numérica de los módulos alternativos se muestra en negro

las tasas de transición están controladas por voltaje de forma no lineal. Sólo el estado abierto de Ca_V conduce las corrientes entrantes de Ca^{2+} que tienden a despolarizar la membrana. Siempre que la magnitud de las tasas de transición entre estas formas sean comparables entre sí, estos canales dan lugar a un ciclo límite estable (un atractor que describe una trayectoria periódica) que, como se presenta más adelante (Figura 4.5B, $g_{bk} = 0$), tiene un período constante y una amplitud relativamente pequeña en comparación con los de la Figura 4.3. El hecho de que el período predicho por estos canales solos es constante sería incompatible con el aumento progresivo de los intervalos entre picos observados experimentalmente. Este desacuerdo con las observaciones hizo necesario considerar la acción de otro canal en el módulo, i. e. BK, que una vez acoplado con Ca_V introduce un

retraso en el intervalo entre los picos progresivamente creciente y también aumenta la amplitud de éstos últimos.

La solución numérica para las variables en el módulo $\text{Ca}_V + \text{BK}$ ($S, R_H, R_L, G, f_{\text{kn}}^o, f_{\text{hc}}^o, V, f_{\text{cv}}^o, f_{\text{cv}}^c, f_{\text{bk}}^o, C$) se muestra en la [Figura 4.4](#), para los parámetros de referencia ([Tabla B.1](#)). El ascenso y el decaimiento lento del cGMP producido por el módulo disparador conduce a un tren de oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con una envolvente que sigue de cerca la forma de la señal del cGMP ([Figura 4.4A](#)) y un intervalo creciente entre los picos. La hiperpolarización transitoria inicial ([Figura 4.4D](#)), impulsada por la apertura de KCNG y la corriente iónica consecuente (f_{kn}^o y I_{kn}), precede y desencadena el primer pico de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (C). El nivel más bajo de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está muy por encima de la concentración basal de este catión y la meseta sobre la cual están montadas las oscilaciones, que se aproxima a 500 nM, se mantiene hasta por ≈ 17 s. Un comportamiento oscilatorio con un período similar, pero con fases diferentes, se observa en la dinámica de apertura de canales ([Figura 4.4B](#)) y las respectivas corrientes (C), así como el potencial de membrana (D).

La dinámica temporal de las fluctuaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ predicha por este módulo puede explicarse cualitativamente. La hiperpolarización inducida por KCNG permite la transición de Ca_V del estado inactivo al cerrado y la recuperación de V mediada por spHCN permite la apertura de estos canales cerrados. La corriente llevada por los canales Ca_V abiertos superaría la fuerza hiperpolarizadora de KCNG y por lo tanto despolarizaría la membrana transitoriamente a medida que los iones Ca^{2+} fluyen. Esta misma despolarización conduce a la inactivación de los canales de Ca_V , lo cual dejará que las corrientes hiperpolarizadoras de KCNG predominen de nuevo. Al entrar el potencial de membrana en niveles hiperpolarizados, se reinicia el ciclo, con ayuda de los canales BK que incrementan las corrientes de K^+ , luego de haber sido activados por el mismo aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De esta manera, hay un acoplamiento de las corrientes hiperpolarizantes netas con la amplitud del pico de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ anterior, lo cual lleva a decir que cuanto menor sea el pico de calcio, BK reiniciará el ciclo con menor fuerza.

La envolvente de los picos $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sigue de cerca la de los niveles de cGMP. Esto llevó a especular que el evolución temporal de cGMP podría ofrecer una forma de entender la envolvente de las fluctuaciones. Para obtener un mejor entendimiento cuantitativo de esta posible dependencia, se hizo una variante del modelo donde la variable G se hace constante y se vuelve un parámetro; para esto las variables del módulo disparador se ignoran, quedando así un espacio de estados reducido a las variables ($f_{\text{kn}}^o, f_{\text{hc}}^o, V, f_{\text{cv}}^o, f_{\text{cv}}^c, f_{\text{bk}}^o, C$); para este último modelo se analizaron los cambios cualitativos de los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y sus períodos presentes en estados estacionarios al variar el parámetro G . A esto se le conoce como análisis de bifurcaciones en la teoría de sistemas dinámicos, el cual es útil para caracterizar las propiedades globales de un sistema de ecuaciones diferenciales, en particular la dependencia de comportamientos asintóticos sobre un parámetro de interés dado (parámetro de bifurcación). Estos comportamientos pueden corresponder a atractores de punto fijo (invariantes en el tiempo) o ciclos límite (periódicos estacionarios), que a su vez pueden ser estables o inestables, entre otros; cada vez que se produce un cambio cualitativo entre éstos por variaciones del parámetro de interés, se dice que una bifurcación ha ocurrido.

Al variar G en este subsistema, el diagrama de bifurcaciones presenta 5 puntos de bifurcación ([Figura 4.5A](#), etiquetados del I al V). En I, por medio de una bifurcación tipo

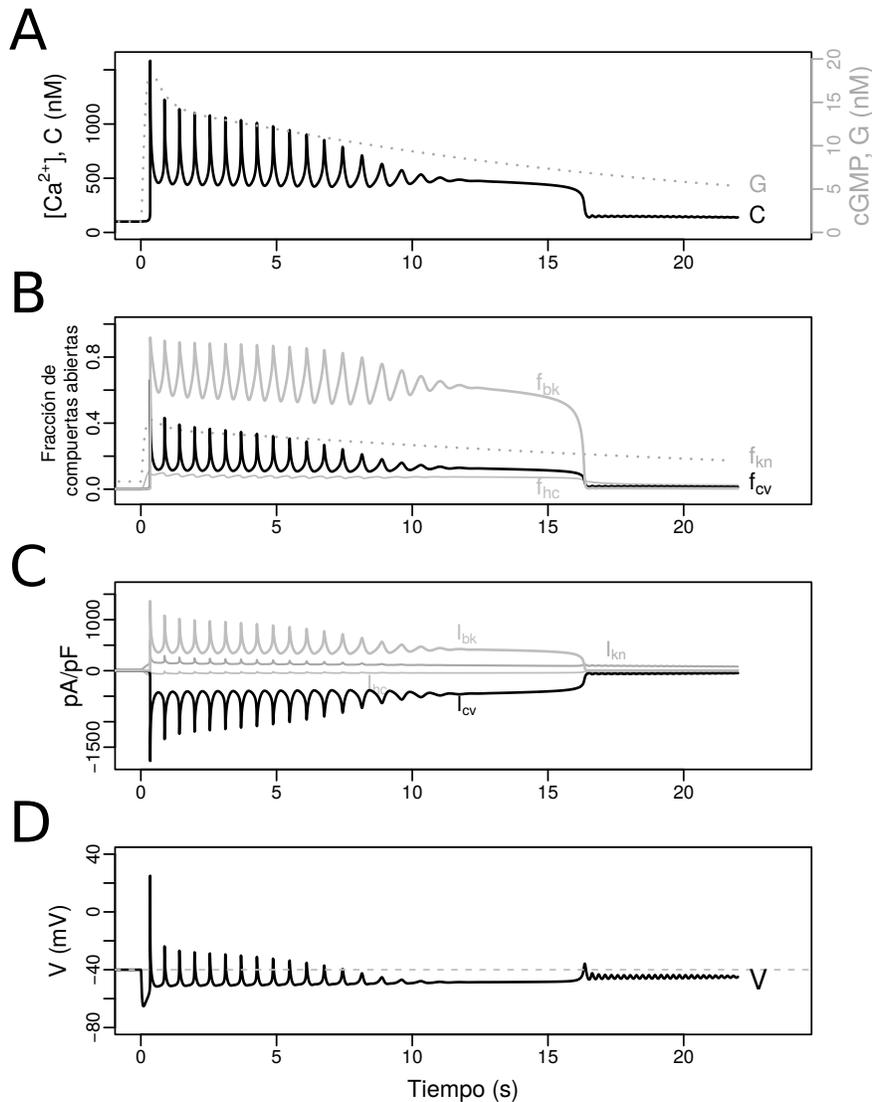


Figura 4.4: **Dinámica del modelo que acopla el módulo que Ca_V+BK con el módulo disparador.** Al igual que en la figura anterior, se usa un estímulo inicial $S(0)=25$ nM. De arriba a abajo, se muestran las soluciones numéricas para: (A) C junto con G (reescalada de tal forma que los respectivos valores basales coincidan), (B) fracciones de canales abiertos, (C) las corrientes iónicas producidas por los canales, (D) potencial de membrana.

Hopf, conforme G aumenta por encima del nivel basal, se pasa de un estado estacionario estable de calcio a un ciclo límite. Cuando se llega a II, el ciclo límite desaparece dando lugar nuevamente a un equilibrio estacionario estable por medio de una bifurcación tipo Hopf inversa. Más adelante en III, se llega a una bifurcación, la cual es nodo-silla inversa definida ante incrementos de G , donde un estado de equilibrio estable coalesce con uno inestable. De esta forma, al realizar el recorrido desde el estado de equilibrio estable anterior se pasa a un estado inestable. Ahora, al avanzar sobre éste último equilibrio inestable, se llega a otro estable por medio de la bifurcación nodo-silla directa (IV), que como en el caso anterior, se define en términos de incrementos de G . La presencia de los

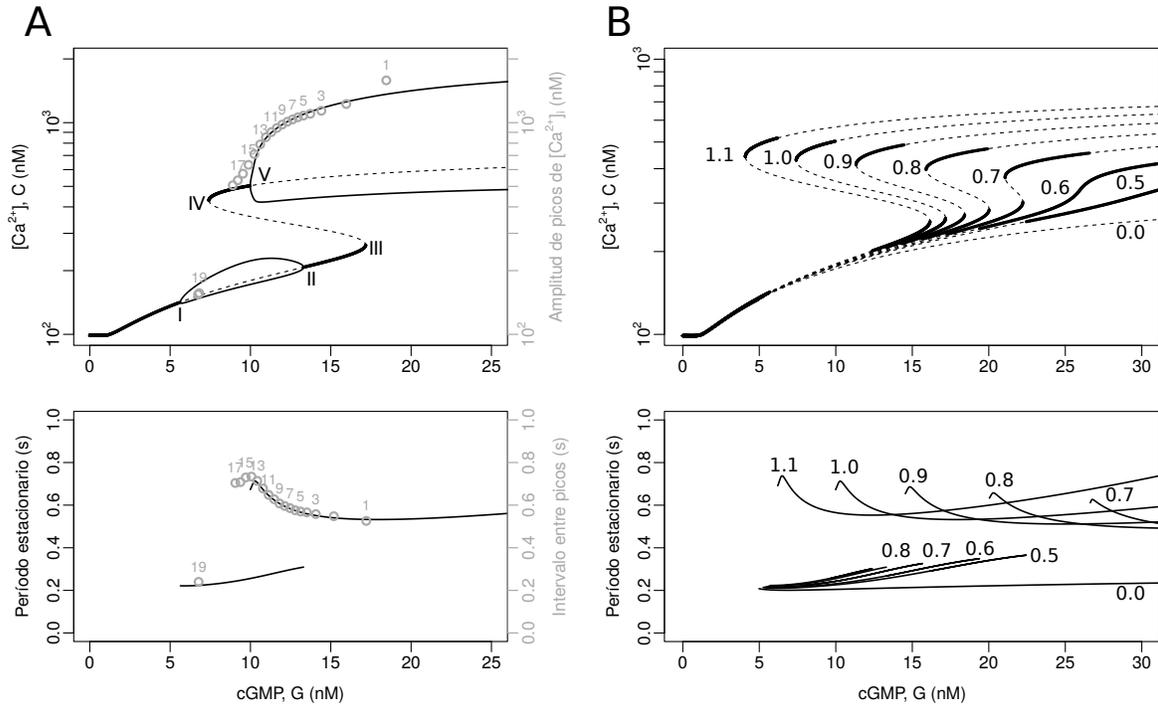


Figura 4.5: **Análisis de bifurcación del modelo con el módulo Cav + BK.** En este análisis, cGMP es una entrada constante, i. e. G es el parámetro de bifurcación y las variables río arriba son ignoradas, reduciendo así el espacio de estado a $(f_{kn}^0, f_{hc}^0, V, f_{cv}^0, f_{cv}^c, f_{bk}^0, C)$. (A) Diagramas de bifurcación calculados con XPPAUT usando los parámetros de referencia (Tabla B.1). Arriba: los gráficos muestran la variable C como una función del parámetro de entrada G . Las líneas continuas gruesas son equilibrios estables, las discontinuas indican equilibrios inestables, las continuas delgadas son los máximos y mínimos de ciclos límite estables. Los puntos de bifurcación están marcados con números romanos (I-V). Los círculos grises numerados indican el valor de los máximos de los picos consecutivos obtenidos al resolver numéricamente el modelo completo (ver Figura 4.4). Abajo: las líneas continuas representan el período de los ciclos límites estables en función de la entrada G . Los círculos grises numerados corresponden al intervalo entre picos de las soluciones numéricas, tal como en el gráfico superior. (B) Diagramas de bifurcación parametrizados por la densidad de conductancia de BK. Arriba y abajo: las líneas son como en los gráficos en (A), por claridad se omiten los mínimos y máximos de los ciclos límite. Los números en el rango de 0.0 a 1.1 son múltiplos del valor de referencia de la conductancia de BK, g_{bk} (e. g. las curvas marcadas como 1.0 coinciden con las de (A), en cambio las curvas marcadas como 0.0 corresponden a una célula sin canal BK).

puntos III y IV sugieren la posible existencia de una bifurcación tipo cúspide definida en un espacio de mayor dimensión, lo cual se corrobora en el panel B de la misma figura. Finalmente, el último estado de equilibrio estable, de nuevo por medio de una bifurcación tipo Hopf directa, da lugar a otro ciclo límite.

El período del ciclo límite en la rama superior aumenta a medida que disminuye la concentración de cGMP (Figura 4.5B, abajo), no así en el caso del ciclo límite de la rama inferior, donde el período muestra la tendencia contraria con un grado de cambio menos pronunciado. Además existe una diferencia considerable entre ambos ciclos límite en

cuanto a su amplitud, demarcada por los mínimos y máximos de Ca^{2+} en el diagrama de bifurcaciones.

Para entender mejor el papel modulador del canal BK sobre la dinámica de calcio en un escenario dependiente de Ca_V , se hicieron diagramas de bifurcación en el rango de valores de G considerados en la figura 4.5A, para diferentes valores de densidad de BK (Figura 4.5B). En B, a diferencia del panel superior de la figura 4.5A, los ciclos límite que corresponden a las líneas inferiores y superiores no se muestran por claridad. En el análisis de bifurcación, el caso extremo donde $g_{\text{bk}} = 0$, es decir, la variante del modelo que solamente presenta canales Ca_V , predice la existencia de una sola rama para la concentración de calcio. En el panel inferior, se muestra para este caso, que el período del ciclo límite asociado tiene un valor constante de aproximadamente 0.2 s (ver la línea etiquetada como 0.0, i. e. $g_{\text{bk}} = 0.0$, en Figura 4.5B, abajo). La adición gradual de BK muestra como se va generando una biestabilidad (Figura 4.5B), y exhibe la aparición de un ciclo límite superior dentro del rango de valores de G observado en Figura 4.5A. El comportamiento de los períodos asociados a los distintos valores de g_{bk} se muestra en el panel inferior de la Figura 4.5B. En una representación tridimensional, con g_{bk} como uno de los ejes, el patrón de bifurcaciones es una cúspide con ciclos límite sobrepuestos. La presencia del nuevo atractor periódico superior posibilita que el piso de las fluctuaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se sitúe en una meseta por encima del nivel basal, y que tanto la amplitud de las fluctuaciones como el intervalo creciente entre los picos sean más cercano a la respuesta fisiológica. Lo anterior implica que las propiedades mencionadas vienen dadas gracias al acoplamiento de los canales Ca_V y BK.

Los parámetros se han elegido de manera que los valores de cGMP superen transitoriamente el punto de bifurcación que fuerza al sistema a oscilar en el ciclo límite superior y caer en al ciclo límite inferior después de que la disminución de cGMP hace atravesar al sistema por la bifurcación de nodo-silla (IV). Esto explica la caída abrupta y las oscilaciones de baja amplitud que persisten después de ésta, las cuales son particularmente visibles en la solución numérica de V (Figura 4.4D). Si el valor de g_{bk} se incrementara arriba del de referencia usado en el panel A, por ejemplo, multiplicado por un factor de 1.1, la bifurcación nodo-silla ocurriría en un valor de G más bajo y estas fluctuaciones de baja amplitud no estarían presentes (ver Figura 4.5B).

Teniendo en cuenta las bifurcaciones del modelo obtenidas con cGMP como constante de control, el comportamiento del modelo completo es más fácil de entender: la unión de SAP a su receptor produce una actividad de cGMP sostenida pero decreciente, que lleva al sistema a acercarse asintóticamente a los atractores calculados para valores fijos de cGMP, es decir, la amplitud y el intervalo entre picos de las fluctuaciones tienden a la amplitud y al período de los atractores (comparar los círculos grises numerados que corresponden a la solución del sistema, tomando en cuenta la variación temporal del G como en Figura 4.4, con los valores dictados por los ciclos límite asintóticos para distintos valores fijos de cGMP en la Figura 4.5A).

Es importante notar que en niveles intermedios del cGMP, hay un rango de valores donde ciclos límite coexisten. De lo reportado en la literatura, sólo se ha observado experimentalmente dinámicas que corresponderían al ciclo límite superior. Muy probablemente, si el inferior estuviera presente, no se detectaría debido a que su amplitud es pequeña y lo

más probable es que dichas oscilaciones estén enmascaradas por las limitaciones propias de la técnica de medición.

4.3.3.2 Módulo CatSper + sNHE y sus propiedades dinámicas

Ahora consideremos el módulo alternativo cuyo componente central es CatSper, el canal de Ca^{2+} que recientemente se ha implicado en la VSAS. Para modelar la dinámica de apertura de CatSper, se emplearon dos variables independientes: una compuerta modulada por pH_i y voltaje, y otra dependiente de calcio intracelular. La fracción de canales abiertos está dada por el producto de las fracciones de estas dos compuertas abiertas (Ecuación B.1.8). Otras variables adicionales incluidas en el módulo, son la concentración intraflagelar de protones, H , y la fracción de intercambiadores Na^+/H^+ activos, f_{nh}^a . De esta forma, el modelo que resulta de acoplar este módulo con el módulo disparador presenta el espacio de estado (S , R_H , R_L , G , f_{kn}^o , f_{hc}^o , V , f_{cs}^o , f_{nh}^o , C , H); en la figura 4.6, se muestra una solución numérica con las mismas condiciones de estimulación utilizadas en el modelo anterior.

El ascenso y la caída del cGMP, producidos por el módulo de disparo, conducen a un tren de oscilaciones de calcio con una amplitud que decae lentamente y un intervalo cada vez mayor entre los picos (Figura 4.6A). El piso de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está cerca o incluso ligeramente por debajo del nivel de reposo, en contraste con las oscilaciones predichas por el módulo alternativo (ver figuras 4.3 y 4.4). Un comportamiento oscilatorio con un período similar, pero con diferentes fases, se observa en la dinámica de las fracciones de canales abiertos (Figura 4.6B), las corrientes iónicas respectivas (C), así como el potencial de membrana y la concentración de protones (D).

En comparación con el módulo $\text{Ca}_V + \text{BK}$, el patrón de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del módulo CatSper tiene una forma diferente. Los picos individuales son más prolongados y el nivel mínimo correspondiente es relativamente más corto. El decaimiento de la envolvente del tren de oscilaciones es menos pronunciado bajo los parámetros de referencia de CatSper que en el módulo $\text{Ca}_V + \text{BK}$, mientras que el aumento progresivo del intervalo entre picos es más marcado que el presentado en la sección anterior. Es notable que el módulo CatSper no predice la meseta sostenida del piso de las oscilaciones de calcio, recuperada en el módulo $\text{Ca}_V + \text{BK}$. Finalmente, entre otras diferencias interesantes entre los dos módulos es la envolvente de los picos del potencial de membrana, V . La amplitud de los picos disminuye progresivamente en el caso de $\text{Ca}_V + \text{BK}$, pero aumenta en el módulo CatSper (ver figuras 4.4D y 4.6D, respectivamente).

La lógica detrás del origen del ciclo límite en este módulo es cualitativamente sencilla. La hiperpolarización aumenta la actividad del intercambiador Na^+/H^+ que promueve la extrusión de protones y por consecuencia aumenta el pH_i . Ante esta alcalinización del flagelo, la curva de sensibilidad de CatSper a voltaje se desplaza a valores más bajos de V (ver Figura B.3D) y algunos de estos canales comienzan a abrirse. El flujo entrante de Ca^{2+} despolariza la membrana, lo cual que a su vez tiende a aumentar aún más la fracción de canales CatSper abiertos, creándose un ciclo de retroalimentación positiva. Sin embargo, esta misma despolarización progresiva también reduce la actividad del intercambiador y del canal sPHCN, lo cual ocasiona respectivamente que el pH_i tienda a volver a su nivel basal y que la fuerza despolarizante del último canal se vea cada vez más disminuida. Esto lleva a la curva de sensibilidad de CatSper a voltaje de vuelta hacia valores

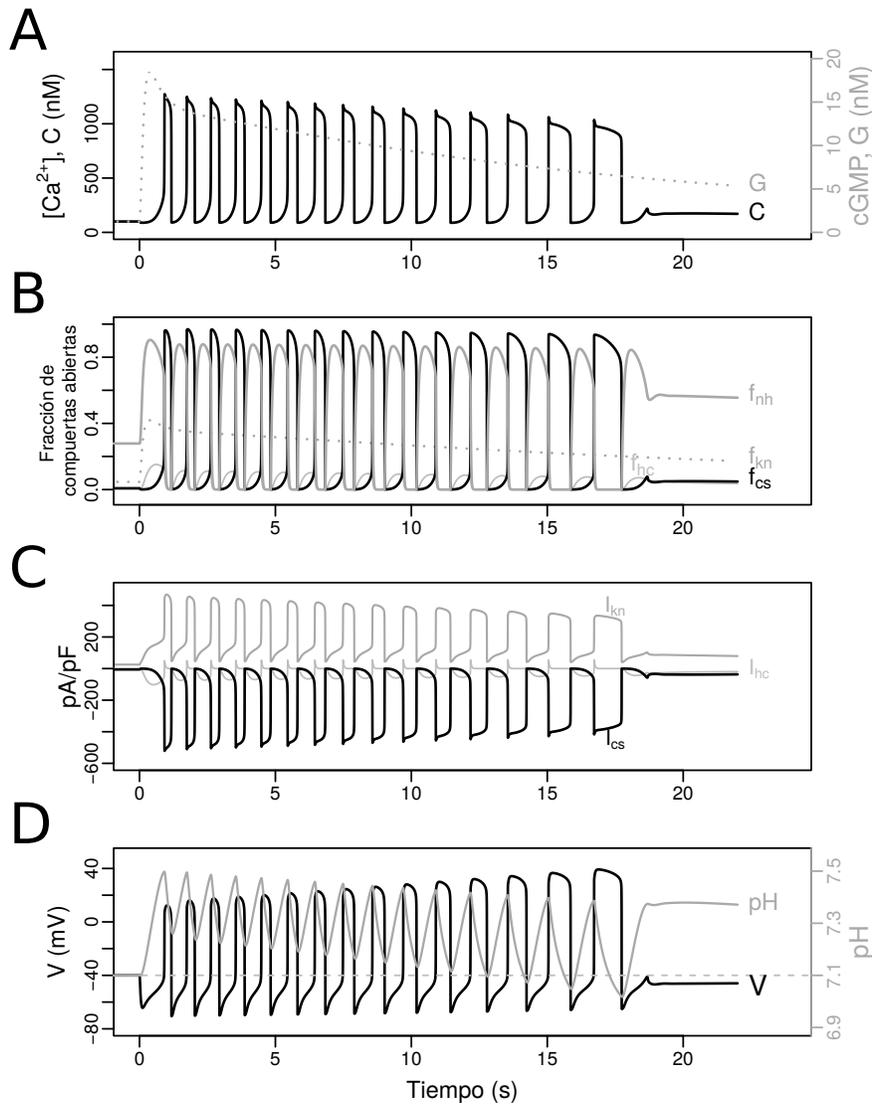


Figura 4.6: **Dinámica del modelo que acopla el módulo CatSper + sNHE con el módulo disparador.** Al igual que en la figura anterior, se usa un estímulo inicial $S(0)=25$ nM. De arriba a abajo, se muestra respectivamente: (A) C junto con G reescalada, (B) fracciones de canales abiertos, (C) las corrientes iónicas de los canales, (D) potencial de membrana.

más altos, tal como sucede en el estado de reposo. Además, aunado a la inactivación de CatSper por el mismo calcio intracelular, se ocasiona que haya instantes donde la corriente hiperpolarizante de KCNG destaque sobre la corriente despolarizante de CatSper (ver [Figura 4.6C](#)). El ciclo se reinicia cuando la membrana vuelve a ser hiperpolarizada, lo cual conduce a una nueva ronda de actividad del intercambiador (con intensidad cada vez menor por la despolarización creciente), un aumento transitorio en el pH_i y la recuperación de las corrientes de CatSper que superan las corrientes hiperpolarizantes.

Como en el caso del módulo $Ca_V + BK$, el análisis de bifurcaciones del modelo que cuenta con el módulo CatSper, pero con la entrada G constante, revela una estructura dinámica bastante compleja. El sistema muestra una cúspide que implica dos bifurcaciones

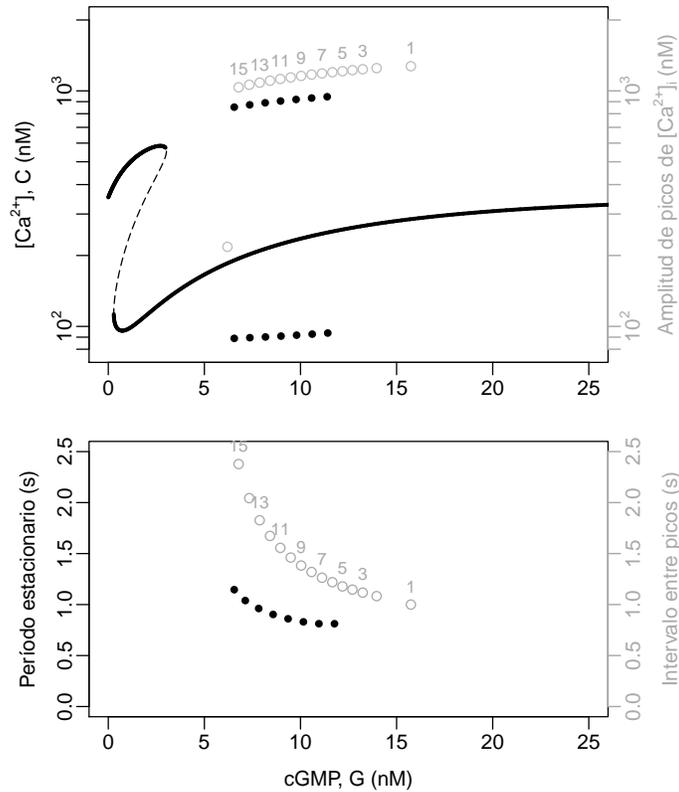


Figura 4.7: **Análisis de bifurcación del modelo con el módulo CatSper + sNHE.** Al igual que en el módulo anterior, cGMP es una entrada constante, i. e. , G es el parámetro de bifurcación y todas las variables río arriba son ignoradas, reduciendo así el espacio de estado a $(f_{kn}^0, f_{hc}^0, V, f_{nh}, m_{cs}, h_{cs}, C, H)$. Arriba: La gráfica muestra la variable C como una función de G . Las líneas continuas gruesas corresponde a equilibrio estables, mientras que la discontinua indica equilibrio inestable, caracterizado con XPPAUT. Las líneas punteadas se refieren a los máximos y mínimos del ciclo límite estable obtenido por solución numérica del sistema mediante condiciones iniciales aleatorias. Los círculos grises numerados indican los máximos de los picos consecutivos obtenidos resolviendo numéricamente el modelo completo, correspondiente a los representados en la figura 4.6. Abajo: las líneas punteadas representan el período del ciclo límite estable en función del parámetro G , obtenido por soluciones numéricas. Los puntos grises numerados corresponden al intervalo entre picos obtenidos de soluciones numéricas, como en el gráfico superior.

de nodo-silla, la cual, en contraste con el módulo $Ca_V + BK$, se encuentra en un rango de valores de G cercanos al reposo, para los cuales dos equilibrios estables de calcio coexisten. A valores más elevados de cGMP, tiene lugar un régimen donde la solución de equilibrio estable coexiste con un ciclo límite estable, cuyos máximos y mínimos están indicados por una línea de círculos negros en el gráfico superior de la figura 4.7. Vale la pena notar que la coexistencia de atractores estables dentro de un rango dado de valores de G sugiere la presencia de puntos de bifurcación que delimiten el tránsito de un comportamiento al otro, en los extremos de dicho rango. Sin embargo, para este caso, con el software de análisis de bifurcación que se ha estado implementado (XPPAUT), no fue posible determinar dichos puntos ni el ciclo límite. De hecho, el ciclo límite estable se detectó resolviendo el modelo numéricamente, explorando el espacio fase mediante aleatorización de condiciones

iniciales del sistema y dejándolo evolucionar por tiempos largos ($>5 \times 10^5$ iteraciones). También una exploración sobre condiciones iniciales entre los dos atractores, sugiere que una posible presencia de cuencas de atracción altamente entrelazadas, lo cual dificulta cálculos numéricos.

Para este escenario, así como fue el caso del modelo $Ca_V + BK$, la amplitud disminuye y el período del ciclo límite aumenta (Figura 4.7) a medida que la entrada constante de cGMP regresa a niveles basales después de haber estado situada en valores altos.

Con este análisis de bifurcaciones, podemos abordar el problema de estudiar la variación los patrones de fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ considerando a G como una variable dependiente del tiempo (Figura 4.6). En un inicio el cGMP presenta un aumento brusco en su concentración, y el sistema cae dentro de la cuenca de atracción del ciclo límite determinado para valores constantes de G . Al retornar cGMP lentamente a su nivel basal, los transitorios a esos ciclos límite van disminuyendo. Esto puede apreciarse por medio de los círculos vacíos de la Figura 4.7, donde se observa una disminución de la amplitud de los picos y un aumento de los intervalos entre picos sucesivos. Las diferencias entre los valores de amplitud y período predichos en el escenario con valores fijos de G (círculos negros), y los picos más realistas obtenidos cuando G evoluciona con su dinámica original (círculos vacíos numerados en Figura 4.7), son más marcadas en este módulo que en el caso $Ca_V + BK$.

4.3.4 *Los módulos Ca_V+BK y $CatSper+sNHE$ predicen respuestas distintivas ante manipulaciones controladas del pH_i y V*

Una de las formas más directas de distinguir cuál de los dos módulos es el más adecuado para describir la estructura esencial de la vía activada por SAPs, es poner a prueba su acoplamiento con el pH_i . Si sNHE y $[H]^+$ se acoplaran con el módulo Ca_V+BK , el primero se activaría mediante la hiperpolarización transitoria, y la concentración de protones resultaría ser sólo una variable de salida, en el sentido de que el pH_i no retroalimenta a ninguno de los procesos que determinan las fluctuaciones del calcio; en otras palabras, la concentración de protones no aparece en ninguna de las ecuaciones que rigen las variables de esa variante del modelo. Por lo tanto, este módulo predeciría que los cambios en el pH_i no conducirían a cambios en los trenes de fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$. Por el contrario, en el módulo CatSper, la dinámica del protones está estrechamente unida a las oscilaciones de calcio y es una parte esencial de los mecanismos que subyacen al comportamiento oscilatorio. Durante el análisis de la dependencia del módulo CatSper sobre los parámetros, sistemáticamente se encontró que las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ eran concomitantes con oscilaciones de pH_i , con el mismo período, aunque con diferencia de fase. Parámetros que conducen a dinámicas de protones más lentas, tales que las oscilaciones de pH_i desaparecieran, imposibilitaron soluciones numéricas periódicas que dieran lugar a trenes de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$. La dependencia diferente de los dos módulos sobre el pH_i ofrece una pauta que ayude a distinguir su posible papel experimentalmente.

Supongamos que uno puede elevar artificialmente y fijar el pH_i del flagelo. En esta situación, el módulo Ca_V+BK predeciría que las fluctuaciones de calcio no se verían afectadas, mientras que el módulo CatSper predice que la subida sostenida del pH_i

cancelaría las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ y este catión se mantendría a una concentración más alta. Este efecto se ilustra en la figura 4.8, donde también se superponen resultados del registro de la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ en presencia de cloruro de amonio (NH_4Cl) (un compuesto usado para elevar el pH_i y que podría suponerse que lo hace sin afectar ninguno de los otros canales modelados aquí). Como se observa en el trazo experimental, se da lugar a una dinámica que es cualitativamente similar a la predicha por el módulo pH -dependiente $CatSper$. Si bien las variables del pH_i y $sNHE$ no están incluidas en el módulo Ca_V+BK , sí pueden acoplarse directamente a dicho módulo debido a que, por la misma forma en cómo están modeladas, entrarían como variables pasivas, i. e. no tendrían ningún efecto en las otras variables pertenecientes al módulo (Figura 4.1).

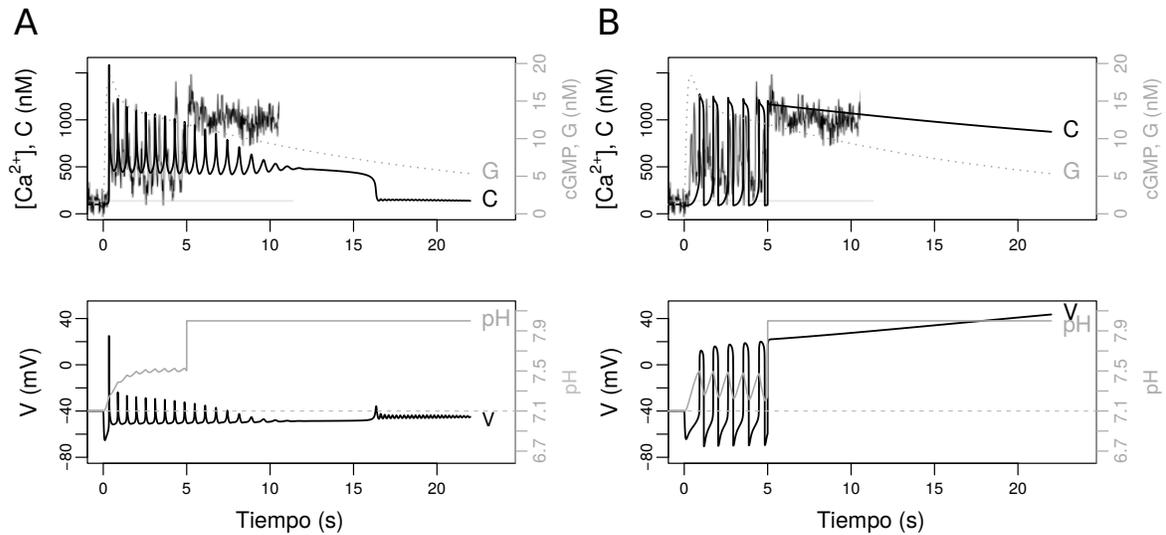


Figura 4.8: **Los módulos Ca_V+BK y $CatSper+sNHE$ predicen respuestas distintivas a la manipulación del pH intraflagelar.** Los paneles A y B muestran las soluciones numéricas de las variables indicadas como en las figuras 4.4 y 4.6, respectivamente (bajo los parámetros de referencia). En el caso de la gráfico inferior del panel A, las variables del pH_i y el $sNHE$ están acopladas con los mismos parámetros de referencia usados en el módulo de $CatSper$. Se muestra en los primeros 5 segundos una respuesta normal ante SAP, la cual se ve perturbada por un aumento artificial del pH_i a un valor constante mantenido en el tiempo. La línea gris ruidosa es una traza reescalada de la intensidad de una sonda fluorescente de pH en una célula de espermatozoide de *S. purpuratus* (obtenido como se describe en [49]).

Otra característica distintiva de los dos módulos alternativos es el hecho de que en estado de reposo el módulo $Ca_V + BK$ tiene un único equilibrio estable, mientras que el módulo alternativo con $CatSper$ predice la coexistencia de dos equilibrios estables posibles, caracterizados por $[Ca^{2+}]_i$ en niveles basales o muy por encima de éstos. Esto se ve más claro en los diagramas de bifurcación en el panel superior de las figuras 4.5 y 4.7. Un aumento transitorio en el potencial de membrana, de acuerdo con el módulo Ca_V+BK , puede conducir a un aumento transitorio en $[Ca^{2+}]_i$ que lo haría volver rápidamente a su estado estable único (figuras B.4A y 4.9A). Por el contrario, de acuerdo con el módulo $CatSper+sNHE$, una perturbación suficientemente fuerte del potencial de membrana puede forzar al sistema a pasar del estado estable basal inferior hacia el equilibrio caracterizado

por una mayor $[Ca^{2+}]_i$, donde permanecerá (figuras 4.9B y B.4B). Como consecuencia de estas propiedades, es fácil ver que el tren de oscilaciones de calcio siempre terminará en el nivel basal de acuerdo con el módulo $Ca_V + BK$, mientras que de acuerdo con el módulo $CatSper + sNHE$, después de que los trenes de oscilaciones se desvanezcan, la $[Ca^{2+}]_i$ podría permanecer en valores altos bajo dinámicas particulares que favorecieran la despolarización del potencial de membrana.

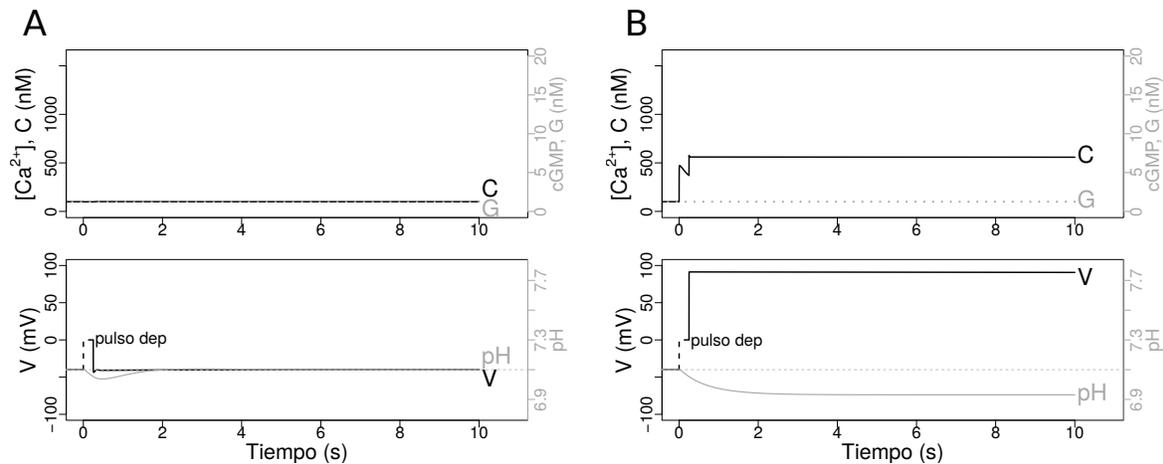


Figura 4.9: Los módulos Ca_V+BK (A) y $CatSper+sNHE$ (B) predicen respuestas distintas a la manipulación del potencial de membrana. En ausencia de SAP, y partiendo del estado de reposo, se simula un pulso de voltaje despolarizante, el cual consiste en fijar $V=0$ mV en el tiempo $t=0$, y manteniendo esta perturbación durante 0.25 s. Las dinámicas de voltaje durante el estímulo exógeno están indicadas con líneas discontinuas. Los paneles A y B muestran las soluciones numéricas de las variables indicadas como en las figuras 4.4 y 4.6, respectivamente (bajo los parámetros de referencia).

4.3.5 El módulo $CatSper + sNHE$ se complementa por el módulo Ca_V+BK en bajas estequiometrías

En las secciones anteriores, se demostró que los dos módulos, una vez acoplados con el módulo de disparo, pueden describir por sí mismos la mayoría de las características de los datos observados. Estos módulos comparten algunos rasgos en cuanto a dependencias funcionales y potencialmente podrían coexistir en el flagelo mediante el acoplamiento del potencial de membrana, pH_i y $[Ca^{2+}]_i$. Para investigar cómo el acoplamiento de los módulos afectaría la dinámica, se consideró un escenario en el que la composición real del sistema sería una combinación ponderada de los dos módulos con un peso dado por el parámetro θ . Para $\theta = 0$, uno recupera el escenario original con $CatSper$; para $\theta = 1$ se recupera el modelo que presenta solamente al módulo $Ca_V + BK$; y cuando $\theta = 0.5$ la densidad de conductancia total de los componentes en cada módulo es la mitad de sus respectivos valores de referencia. Para asegurar la recuperación de los escenarios extremos ($\theta=0$ y $\theta=1$) en este nuevo esquema ponderado, los parámetros que regulan el reposo del potencial de membrana y calcio (g_L y δ_C) se modificaron de una forma dependiente de θ (ver Ecuación 4.2.3).

La importancia que tiene la dependencia de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ sobre la dinámica del pH_i quedó recalcada en la sección anterior, por lo que para el siguiente análisis se toma como caso base el modelo que incluye al módulo responsable de dicho mecanismo regulatorio: CatSper + sNHE. Sobre éste, se añaden gradualmente los componentes del módulo Ca_V +BK, es decir, se hace una titulación (adición gradua) de las densidades de conductancia. El análisis se acotó a tres esquemas de combinación para hacerlo más tratable: a) CatSper+sNHE+ Ca_V (Figura 4.10), b) CatSper+sNHE+BK (Figura 4.11) y c) CatSper+sNHE+ Ca_V +BK (Figura 4.12).

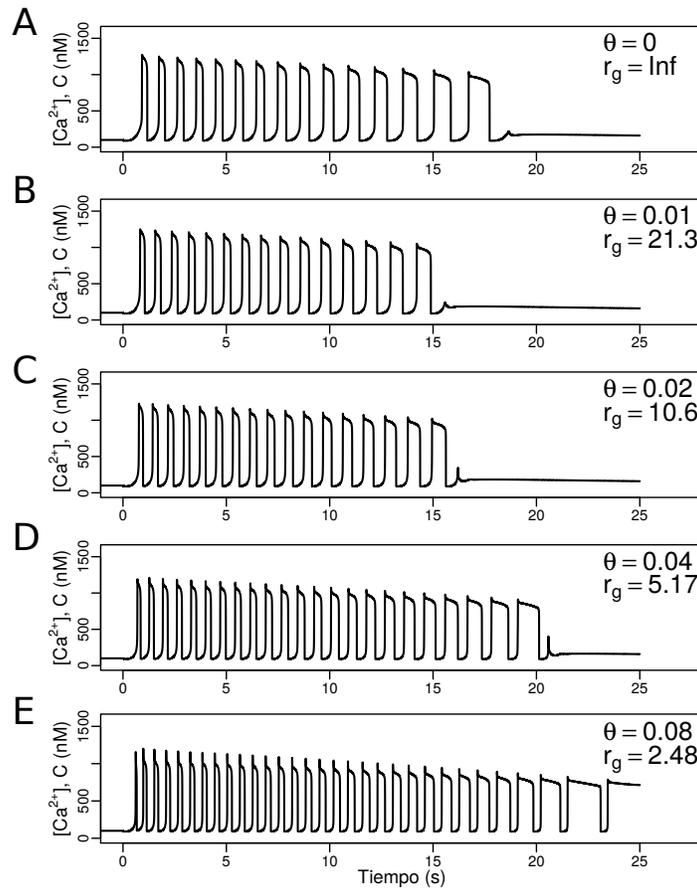


Figura 4.10: **Titulación de Ca_V sobre el módulo CatSper+sNHE.** Considerando la adición únicamente de canales Ca_V , se muestran soluciones numéricas para el calcio bajo diferentes valores del parámetro de ponderación θ , el cual en este escenario influye sobre la proporción CatSper/ Ca_V al estar multiplicando al valor de referencia de g_{cv} (la densidad de conductancia de Ca_V), mientras que $1-\theta$ multiplica al valor de referencia de conductancia de CatSper. Como caso base, se muestra en A el escenario original de sólo CatSper, i. e. $\theta=0$, mientras que las filas posteriores corresponden al aumento gradual de θ . El efecto de este parámetro sobre la razón CatSper/ Ca_V queda mejor plasmado en el coeficiente r_g , el cual expresa la estequiometría de densidades de conductancia de dichos canales; a mayor valor de r_g , mayor es el predominio por parte CatSper con respecto de Ca_V .

En la figura 4.10, se observa que el efecto más notorio de la titulación de Ca_V sobre el módulo CatSper+sNHE es el de acelerar la respuesta en general sin modificar cualitativamente la envolvente o la forma de los picos. Para los dos primeros casos (B,C), la frecuencia

aumenta pero la duración total del tren de oscilaciones disminuye un poco en comparación con el escenario del módulo original CatSper+sNHE (A). Para la tercera titulación (D), la respuesta se ve acelerada y se acompaña de una extensión de su duración antes de retornar al estado basal. Sin embargo, por lo que se observa en la cuarta titulación (E), hay un límite en el cual la respuesta comienza a alterarse de tal forma que deja de haber compatibilidad con lo observado experimentalmente, ya que el tren de oscilaciones se extiende a varias decenas de segundos y el nivel al cual retorna la respuesta tiende a niveles altos en vez de ir al basal.

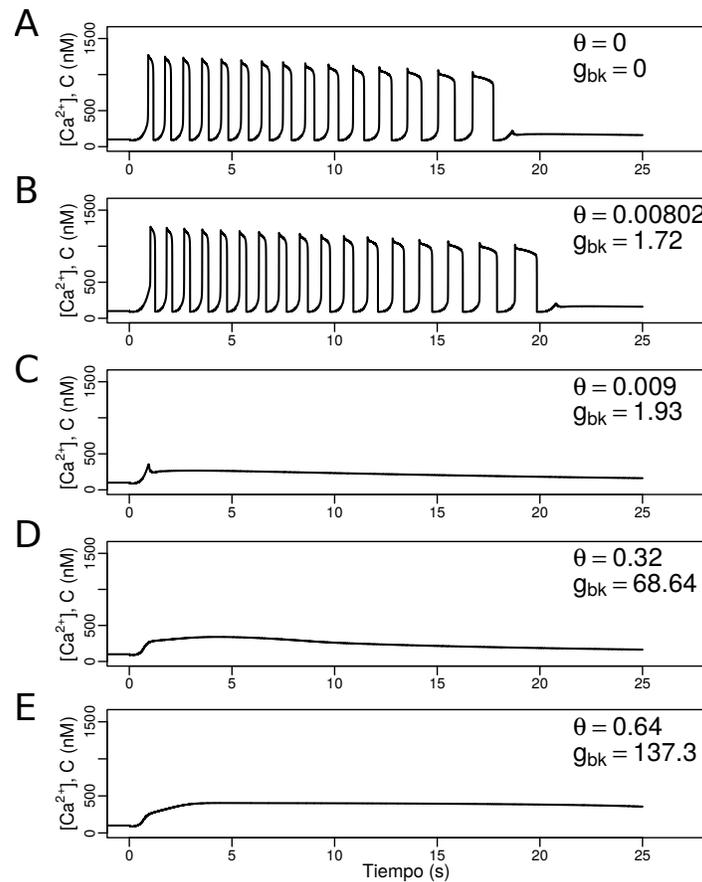


Figura 4.11: **Titulación de BK sobre el módulo CatSper+sNHE.** Considerando la adición únicamente de canales BK, se muestran soluciones numéricas para el calcio bajo diferentes valores del parámetro de ponderación θ , el cual controla el porcentaje del valor de referencia de g_{bk} , la densidad de conductancia de BK. Como referencia, se muestra arriba el escenario original de sólo CatSper (A), i. e. $\theta=0$. Las filas posteriores corresponden al aumento gradual de θ , en donde se muestra el valor resultante de g_{bk} . A diferencia del escenario anterior (4.10), la densidad de conductancia de CatSper no se ve afectada por el parámetro de ponderación θ .

El segundo esquema de combinación, CatSper+sNHE+BK, deja ver fácilmente lo extremadamente sensible que es el módulo de CatSper cuando éste último interactúa con un canal que tiene las características de BK. Desde valores muy pequeños de densidad de conductancia, g_{bk} , las oscilaciones desaparecen quedando sólo un aumento de calcio en valores intermedios sobre el nivel basal (Figura 4.11C, D y E). No obstante, en valores

notoriamente bajos de g_{bk} , la capacidad del sistema para oscilar resiste ante la adición de BK; ésto se aprecia por un cambio de escala de tiempo de la respuesta sin alterarse la forma cualitativa de los picos (Figura 4.11B). En este último caso, sólo hay un aumento sutil de la frecuencia, i. e. en los primeros 15 s se producen 13 fluctuaciones sin BK, mientras que con BK son 14; y en cuanto a la extensión del tren de oscilaciones, con BK la respuesta termina apenas 2 segundos después en comparación con el módulo CatSper+sNHE (A).

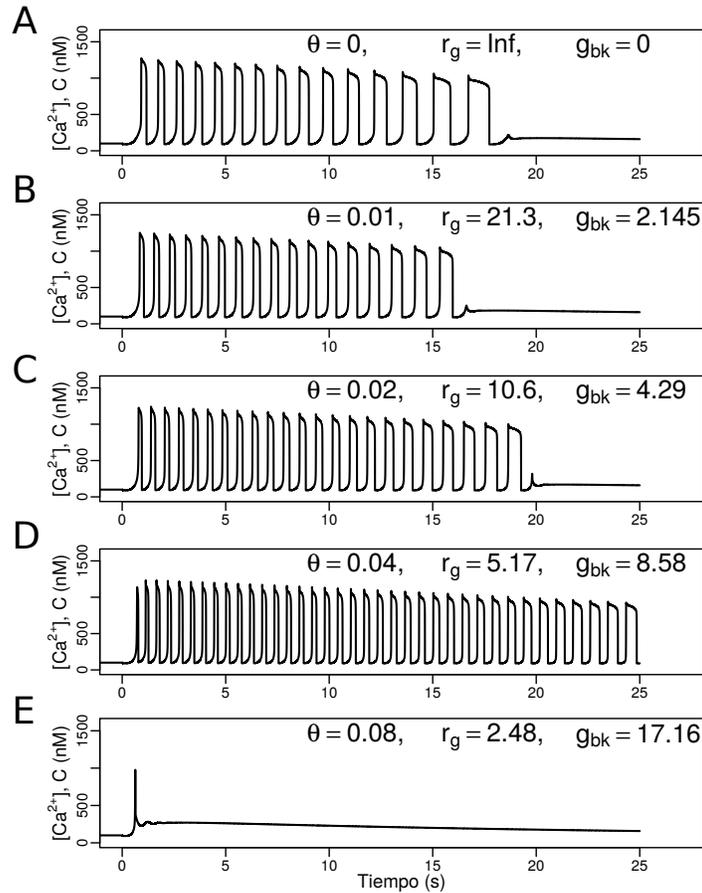


Figura 4.12: Titulación del módulo Ca_V+BK sobre el módulo $CatSper+sNHE$. Partiendo del modelo que incluye al módulo $CatSper+sNHE$, se muestran soluciones numéricas para el calcio bajo diferentes valores del parámetro de ponderación θ , el cual controla el porcentaje de módulo Ca_V+BK que se está añadiendo. θ multiplica las conductancias de referencia g_{cv} y g_{bk} , y de forma correspondiente la densidad de conductancia de $CatSper$ disminuye por el factor $1-\theta$. Como referencia, se muestra primero el escenario original de sólo $CatSper$ (A), i. e. $\theta=0$, y las filas posteriores corresponden al aumento gradual de θ . El efecto de este parámetro sobre las densidades de canales se reporta en el coeficiente r_g , que mide la razón de conductancias totales $CatSper/ Ca_V$, así como los nuevos valores g_{bk} . Al igual que en la figura 4.10, a mayor valor de r_g , mayor es la predominancia de la conductancia total por parte $CatSper$ con respecto de Ca_V .

Al analizar el escenario más complejo, que consiste de la combinación de los dos módulos, se recuperaron con otros valores de θ los principales efectos que se habían observado previamente en la titulación de solamente Ca_V (Figura 4.10), i. e. el incremento de la frecuencia de oscilaciones sin introducir cambios importantes en la forma de los

picos ni en su envolvente, así como una prolongación de la duración de la respuesta. Por otro lado, al comparar los dos anteriores esquemas con éste último, se sugiere que sólo cuando se añade BK junto con Ca_V , la respuesta dependiente de CatSper es tolerante a la inclusión de dicho canal en densidades de conductancia mayores (ver valores de g_{bk} en figuras 4.11 y 4.12), además de que éste último se encarga de extender la duración del tren de oscilaciones (comparar Figura 4.10 y Figura 4.12). Sin embargo, más allá de cierto nivel de g_{bk} (E), la respuesta oscilatoria se colapsa, dejando visible sólo un aumento transitorio inicial, quedando de manifiesto un efecto negativo de BK sobre los trenes de oscilaciones a altas densidades.

4.4 RESUMEN DE OBSERVACIONES SOBRESALIENTES

La dinámica del cGMP a tiempos largos se caracteriza por un decaimiento lento, en el cual su concentración sigue de cerca la dinámica de la forma del receptor con baja actividad de guanilato ciclasa (R_L) (Figura 4.2, arriba).

El módulo disparador sólo es capaz de explicar la dinámica de la hiperpolarización transitoria temprana si se considera la acción conjunta de los canales KCNG y spHCN. La configuración del conjunto de parámetros fue tal que a falta de otros canales, la repolarización iniciada por spHCN, luego de la corriente hiperpolarizante de KCNG, conduce a una recuperación parcial del potencial de membrana, permaneciendo debajo del valor de reposo (Figura 4.2).

Los dos módulos alternativos que presentan un tipo de canales de calcio voltaje dependientes, Ca_V+BK ó $CatSper+sNHE$, podría generar dinámicas de fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ con características cualitativamente similares a las observadas experimentalmente en célula individual Figura 4.3. Sin embargo, cada uno produce mejor una característica en particular: el módulo $CatSper+sNHE$ produce un espaciamiento relativo entre picos más marcado y más apegado al experimento, mientras que el módulo Ca_V+BK explica mejor el decaimiento de la envolvente de las oscilaciones.

En el módulo $Ca_V + BK$, la envolvente de las oscilaciones del potencial de membrana presenta una forma similar a la de los picos de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 4.4A y D). Por el contrario, el módulo $CatSper+sNHE$ predice que la amplitud de los picos de potencial de membrana debería aumentar hasta que cesan repentinamente (Figura 4.6D).

Del análisis de bifurcaciones, se pudo observar en ambos módulos que el régimen periódico comienza por encima de un valor definido de cGMP, situado arriba del estado de reposo; por debajo de éste nivel crítico, las oscilaciones no tendrían lugar (Figs. 4.5 y 4.7). En el caso del módulo $CatSper + sNHE$, un nivel muy alto de cGMP inhibe las oscilaciones, llevando al sistema solamente a un aumento sostenido de calcio. Por el contrario, en el módulo Ca_V+BK , el régimen periódico se mantiene para cualquier valor arriba de un nivel crítico de cGMP, sólo que a concentraciones muy altas, la amplitud y periodo se saturan.

Otra predicción comprobable del módulo $CatSper$ es la existencia de biestabilidad en valores de cGMP cercanos al reposo. En ausencia de SAP, perturbaciones como una despolarización de la membrana pueden llevar a un valor sostenido de $[Ca^{2+}]_i$ por encima del nivel de reposo normal (Figura 4.9). Esta propiedad de biestabilidad no está presente en el módulo $Ca_V + BK$ (Figura 4.5), ofreciendo así otra forma de distinguirlos.

Los dos módulos predicen respuestas muy distintas a la inducción artificial de una alcalinización sostenida. El módulo CatSper+sNHE, sin los canales Ca_V y BK, predice que una alcalinización transitoria o sostenida debería dar como resultado una elevación sostenida de $[Ca^{2+}]_i$, tal como se observa experimentalmente después de la adición de NH_4^+ a espermatozoides de *S. purpuratus* (Figura 4.8). La comparación de estos dos módulos con las mediciones experimentales sugieren que el canal principalmente responsable de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a SAP podría ser el canal pH-dependiente CatSper, y no Ca_V .

Se encontraron escenarios mixtos, donde combinaciones particulares de ambos módulos producen trenes de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ compatibles con experimentos.

Cuando se incrementa la conductancia de Ca_V sobre el módulo CatSper, la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ se acelera conservando la envolvente y el espaciamiento progresivo entre picos (Figura 4.10). Sin embargo, la duración de la respuesta se prolonga más allá de lo deseable cuando la razón de conductancias CatSper/ Ca_V , r_g , tiende a valores menores de ≈ 3 , mientras que el estado al cual retorna el sistema corresponde a la rama estable superior de la zona biestable mencionada anteriormente (Figura 4.7).

En cuanto al canal BK, éste inhibe los trenes de oscilaciones de calcio generados por el canal CatSper. Aunque desde densidades muy bajas, las oscilaciones desaparecen y únicamente queda un aumento suave del nivel de $[Ca^{2+}]_i$, existe un rango muy reducido de valores en el cual los trenes de oscilaciones no colapsan por la adición de BK, y se puede apreciar un aumento en el número de picos y en la extensión de la respuesta de calcio en general (Figura 4.11).

Cuando Ca_V y BK se añaden de forma conjunta (conservando la misma proporción entre ellos tal como en el módulo original Ca_V+BK), la respuesta de calcio dependiente de CatSper es menos tolerante a Ca_V , pero más tolerante a BK, en comparación con las correspondientes titulaciones por separado. En un escenario donde la razón de conductancias CatSper/ Ca_V es de ≈ 10 y la densidad de conductancia de BK es del 2% del valor de referencia usado en el módulo Ca_V+BK (Tabla B.1), la frecuencia general del tren de oscilaciones aumenta favorablemente, a la vez que se mantiene una duración razonable de la respuesta. Si la contribución relativa de los dos canales se lleva más allá de estos rangos, el tren de oscilaciones se prolonga más de lo observado experimentalmente, o incluso se colapsa por acción de BK (Figura 4.12). A grandes rasgos, la adición conjunta de Ca_V y BK puede mejorar la dinámica de CatSper+sNHE en comparación con su inclusión por separado.

Parte IV

RECAPITULACIÓN

DISCUSIÓN

Now it would be very remarkable if any system existing in the real world could be exactly represented by any simple model. [...] For such a model there is no need to ask the question "Is the model true?". If "truth" is to be the "whole truth" the answer must be "No". The only question of interest is "Is the model illuminating and useful?".

GEORGE BOX, *Robustness in Statistics*, 1979

La relevancia de las fluctuaciones de calcio intracelular provocadas por SAPs en el movimiento de los espermatozoides de erizo de mar se ha establecido [2, 46, 47, 86], sin embargo, la identificación de los canales que contribuyen a estos trenes de oscilaciones es un asunto de investigación en progreso [24, 49]. A pesar de que se ha demostrado la presencia del canal CatSper en *A. punctulata* y se ha propuesto su participación en la respuesta quimiotáctica de espermatozoides recientemente [24], el grado de su contribución no se ha determinado, dejando abierta la cuestión de la participación de otros canales de Ca^{2+} en este proceso, tales como los canales clásicos dependientes de voltaje, i. e. LVA y HVA.

5.1 MODELO DISCRETO

En el trabajo realizado en esta tesis, primero se abordó esta cuestión mediante una plataforma de modelación discreta. Se tomó como punto de partida un modelo planteado anteriormente para la vía de señalización activada por SAPs, el cual ha contribuido previamente a la comprensión y la predicción de algunas propiedades de los incrementos transitorios de Ca^{2+} [39]. En particular, la necesidad de un canal tal como CatSper surgió de este modelo con el fin de recuperar los resultados experimentales relacionados con la acción de la Iberiotoxina y el ácido niflúmico [35, 39]. En este caso, la exploración de las variantes de modelos, distinguidos por el conjunto de canales de Ca^{2+} que consideran, incluyó: Modelo I con cAMPCC, HVA y LVA, Modelo II con CatSper, LVA y HVA, y Modelo III, únicamente con CatSper; esto permitió poner a prueba la contribución de estos canales y así calibrar su importancia relativa guiado por criterios basados en la corroboración experimental.

En la [Tabla 3.2](#), queda de manifiesto que los mejores resultados se obtienen con el Modelo III. Vale la pena notar que las ventajas que se obtienen gracias a CatSper se ven limitadas si éste actúa acompañado de los canales Ca_V (Modelo-II), de hecho los resultados de éste último son cualitativamente similares a los del Modelo I. En cierto modo, puede interpretarse que la acción de estos canales interfiere con CatSper, esto puede apreciarse al suprimir *in silico* PDE, CaKC y pH_i .

Con respecto a los otros canales de Ca^{2+} , en la [Figura 3.2](#) se observa que la supresión de Cav_5 modifica la curva de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de una forma más sutil que el *knock-out* de CatSper. Entre los efectos que se alcanzan a notar, están el de un decaimiento más rápido desde cada pico de concentración, a la vez que se mantiene tanto el nivel promedio del calcio así como la tasa de aumento. Debido a que la quimiotaxis es fuertemente dependiente de la forma temporal de la señal de calcio (la tasa de aumento controla los giros pronunciados y la tasa de decremento la de los trayectos progresivos [5, 11]), el papel de esos canales podría ser el de intervenir en el ajuste fino necesario para un correcto movimiento de los espermatozoides en su búsqueda por el huevo.

Por lo tanto, este modelo predice que, asumiendo una estequiometría 1:1 de todos los elementos de la red, CatSper es indispensable y parece ser el principal canal de calcio. Al igual que en *A. punctulata*, en el laboratorio del grupo del Dr. Alberto Darszon, se encontró que las subunidades del complejo CatSper se expresan en flagelos de espermatozoides de *S. purpuratus*, reportadas en [52].

5.2 MODELO CONTINUO

Para superar las limitaciones que presenta la modelación discreta en el análisis de diferentes estequiometrías en los canales, se recurrió a la modelación continua de la [VSAS](#) mediante un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias. Con este enfoque alternativo e independiente del discreto, se exploró la colección de canales que pueden explicar la dinámica de los trenes de oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La forma de abordar la vía de señalización se realizó separando el sistema en módulos, los cuales están acoplados por el potencial de membrana: un módulo disparador, relacionado con todos los eventos necesarios para preparar el potencial de membrana previo a los trenes de oscilaciones de calcio; dos módulos alternativos relacionados directamente con la generación de las oscilaciones, donde uno de los dos canales, Cav o CatSper, es central en el influjo de este catión ([Figura 4.1](#)).

La gran cantidad de parámetros ([Tabla B.1](#)) de las variantes del modelo continuo estudiadas aquí disuadiría cualquier intento de este tipo si no fuera por la disponibilidad de series de tiempo cuantitativas de cGMP y potencial de membrana, con varias concentraciones de SAP. Los parámetros del módulo disparador que no se obtuvieron de la literatura se estimaron ajustando el modelo a estos datos de series de tiempo. Esto fue posible gracias a la estructura de la red de señalización, en la cual los componentes relativos al módulo de disparo son independientes de la dinámica río abajo y al hecho de que el modelo predice una dinámica suave no oscilatoria ([Figura 4.2](#)).

5.2.1 Eventos tempranos de la vía

El módulo disparador, relacionado con la señalización temprana, fue capaz de reproducir la evolución temporal de su variable de salida cGMP, y también la respuesta inicial del potencial de membrana ante diferentes concentraciones de SAP, medidas en poblaciones de células [6, 18]. Esto es notable considerando que este módulo hace suposiciones muy simples sobre la unión del ligando al receptor y la actividad de guanilato ciclasa, ya que

no se consideraron mecanismos de adaptación tal como el reajuste de la afinidad del receptor dependiendo de la concentración de SAP, ya reportado previamente [7, 75, 87]. Además, si el modelo predijera que el cGMP sufre oscilaciones en vez de una dinámica suave (surgiendo de una retroalimentación potencial del pH_i sobre la actividad de PDE [88]), se perdería el poder inferencial de ajustar el valor de cGMP predicho a los niveles medios de cGMP de la población.

En cuanto a la recuperación del potencial de membrana a cargo de spHCN, explicada por el módulo disparador (Figura 4.2), la conductancia efectiva de este canal es suficiente para poner en marcha los módulos río abajo (por ejemplo, incrementando la tasa de apertura de canales de Ca_V cerrados o de la compuerta voltaje dependiente de CatSper) pero no demasiado fuerte para evitar la dinámica oscilatoria de $[Ca^{2+}]_i$. Esta propiedad de la red de señalización es susceptible de corroboración experimental, ya que se puede evaluar si la recuperación del potencial de membrana es justamente parcial cuando el único flujo despolarizante es el de spHCN, lo que podría lograrse mediante el uso de condiciones de medio externo libres de Ca^{2+} , con lo cual se estaría inhibiendo toda entrada de calcio y con ello cualquier otra corriente que eleve el potencial de membrana.

5.2.2 Dinámica general de la señal de calcio

El análisis de los módulos alternativos por separado, muestra que las características típicas de las fluctuaciones de calcio pueden explicarse por ambos canales de calcio voltaje dependientes. Es importante notar que la escala temporal en general de la respuesta de calcio producida por el módulo CatSper+sNHE es más lenta en comparación con los trazos experimentales (en términos de unidades de tiempo reales), bajo los parámetros de referencia utilizados; no obstante, si se contrasta el aumento progresivo relativo entre picos de calcio, éste sigue la misma tendencia que el módulo $Ca_V + BK$ (Figura 4.3). En las soluciones numéricas del módulo de CatSper, el intervalo entre los últimos picos del tren puede ser hasta dos veces más grande que el intervalo entre los primeros, como se observa en las mediciones de calcio en célula única. Por el contrario, la disminución progresiva de la amplitud observada experimentalmente se explica mejor por el módulo Ca_V+BK , bajo los parámetros de referencia utilizados aquí.

En el primer módulo, los Ca_V atraviesan irreversiblemente por transiciones secuenciales, dependientes de voltaje: se encuentran predominantemente inactivados en el potencial de reposo, se liberan de la inactivación ante una hiperpolarización transitoria, posteriormente se abren cuando la actividad de los canales de spHCN aumenta el potencial de membrana, y por último, la misma despolarización por la corriente de calcio regresa a los Ca_V s al estado inactivo. Esta secuencia origina un ciclo límite con un período constante y una amplitud controlada por la actividad de cGMP. En este módulo, las oscilaciones están fuertemente moduladas en amplitud y ritmo por el canal dependiente de Ca^{2+} , BK. Sólo con el acoplamiento de Ca_V y este canal, se logra reproducir el incremento progresivo entre picos de $[Ca^{2+}]_i$, observado experimentalmente en flagelos. Esto se debe a un segundo ciclo límite, introducido por este canal (Figura 4.5).

El segundo módulo capaz de explicar la organización de las fluctuaciones $[Ca^{2+}]_i$ presenta un solo canal, CatSper, el cuál es dependiente del voltaje y del pH_i , e inactivado

reversiblemente por los iones Ca^+ intracelulares. En contraste con el módulo anterior, que se pone en marcha directamente por la hiperpolarización transitoria que remueve la inactivación de los canales Ca_V , la apertura inicial de los canales CatSper se logra indirectamente por la alcalinización del citoplasma provocada por la activación de sNHE, el cual a su vez depende de la hiperpolarización. Bajo los parámetros de referencia, el régimen oscilatorio producido por CatSper requiere oscilaciones en el flujo de protones, y por lo tanto en pH_i (Figura 4.6). En lugar de la inactivación de CatSper por $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el ciclo de retroalimentación efectiva que explica las oscilaciones de calcio es la misma inhibición de la actividad sNHE por la despolarización de la membrana a cargo del influjo de calcio. En otras palabras, la observación de oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependientes de CatSper implica necesariamente oscilaciones concomitantes de pH_i con el mismo período, pero con fase diferente (ver activación de sNHE y CatSper en Figura 4.6B).

5.2.3 Criterios basados en otras variables del modelo para distinguir módulos de calcio

5.2.3.1 Potencial de membrana

Los dos módulos alternativos confieren algunas propiedades distinguibles a la red de señalización cuando se acoplan al módulo disparador. Una de esas propiedades es la envolvente de las oscilaciones del potencial de membrana. En el módulo que presenta canales Ca_V y BK, la forma de dicha envolvente guarda similitud con la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 4.4). En contraste, el módulo CatSper predice que la amplitud en los picos de V aumentan con el tiempo, hasta que cesa repentinamente, marcando así una tendencia contraria a la dinámica del calcio (Figura 4.6). Esta tendencia ascendente se asemeja más a lo observado en mediciones de potencial de membrana realizadas en poblaciones de espermatozoides estimulados con altas dosis de SAP [18].

5.2.3.2 cGMP

Del análisis de bifurcaciones, se pudo observar en ambos módulos que las oscilaciones predichas desaparecen cuando cGMP cae por debajo de un valor crítico (Figs. 4.5 y 4.7). En el caso del módulo Ca_V +BK, esto se da por una bifurcación tipo Hopf. Una diferencia con respecto al rango de valores de cGMP que permiten oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, es que en el módulo CatSper + sNHE, éstas sólo se pueden observar dentro de un intervalo definido de actividad cGMP. En concentraciones de GMP intracelulares muy bajas (cercas a la de reposo) o muy altas, el modelo predice un aumento sostenido $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sin oscilaciones perceptibles. No así el módulo Ca_V +BK, donde el régimen periódico se mantiene para cualquier valor arriba de un nivel crítico de cGMP, estacionándose la amplitud y el periodo en valores constantes para niveles muy elevados de cGMP.

Estas propiedades del modelo podrían abordarse experimentalmente mediante inhibidores de PDE o elevando el cGMP a concentraciones saturantes al liberar un análogo fotoactivable. Con respecto al bloqueo de la PDE, es interesante notar algunas similitudes entre los modelos discretos y continuos. Las variantes Modelo I y II predicen oscilaciones situadas en niveles similares a sus respectivas redes WT (Figura 3.4); de igual forma, en la contraparte del modelo continuo, con el módulo Ca_V +BK (el más cercano al Modelo I) se

puede apreciar que en niveles altos de cGMP (lo que se espera de un bloqueo de la PDE), se sigue observando un régimen periódico (Figura 4.5A). En el caso de la variante del Modelo III, que sería la más cercana al escenario planteado por el módulo CatSper+sNHE, ante el bloqueo de PDE persiste un aumento de calcio sobre el nivel basal (Figura 3.4), aunque con una amplitud menor con respecto de la correspondiente red WT; mientras que en el continuo, se vería un aumento sostenido de calcio bajo concentraciones saturantes de cGMP, pero con una amplitud menor que la dada por el régimen periódico que tiene lugar en el rango de niveles fisiológicos de cGMP (Figura 4.7, arriba).

Adicionalmente, vale la pena mencionar que la liberación intracelular de análogo de cGMP en espermatozoides conduce a un tren de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ en el caso de *A. punctulata* [9] (ver Figura 1.3B), mientras que en el caso de *S. purpuratus*, sólo se observa un aumento transitorio inicial [10] (ver Figura 1.3C), cuyo nivel decae lentamente. Esta discrepancia entre especies de erizo de mar podría conciliarse si existen diferencias específicas en sus respectivos sistemas de señalización con respecto a los límites de intervalos de cGMP generadores de oscilaciones (lo cual podría darse por una modificación cualitativa del espacio fase variando más de un parámetro), o alternativamente por diferencias experimentales en la concentración de nucleótido cíclico que se logra liberar por luz UV.

5.2.3.3 pH_i

Al analizar los escenarios resultantes de inducir una alcalinización constante, los dos módulos predicen respuestas muy distintas. Solamente el módulo CatSper+sNHE predice que se alcanzaría un nivel de $[Ca^{2+}]_i$ sostenido, lo cual es comparable con lo observado en experimentos de adición de cloruro de amonio (NH_4Cl) a espermatozoides de *S. purpuratus* (Figura 4.8). El contraste entre los módulos a fin de recuperar la observación experimental sugiere que el canal responsable de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ producidas por SAP sería CatSper, en lugar de los Ca_{vS} . Hay que notar que la alcalinización inducida por NH_4Cl , que es mayor que la causada por el SAP speract y que produce una despolarización de la membrana [78], da como resultado una afluencia de calcio menor, en comparación con la que podría desencadenar speract solo [49]. Una interpretación previa fue que se requiere la participación de otra vía de influjo de calcio en la VSAS [49]. Sin embargo, de acuerdo con las predicciones del modelo, existe una dependencia fuerte de la respuesta oscilatoria de calcio con las oscilaciones de pH_i (Figura 4.8). Por otra parte, así como el atractor periódico que origina las oscilaciones de calcio tiene lugar sólo bajo un rango definido de cGMP (Figura 4.7), de una forma similar éstas oscilaciones podrían darse sólo dentro de un intervalo de pH_i . Estos requerimientos basados más en la forma de la dinámica misma del flujo de protones o en la posible existencia de un rango de pH_i permisivo para oscilaciones de calcio (en vez de un mero umbral), ofrecen una explicación alternativa.

Es importante mencionar que a la fecha no se ha detectado experimentalmente un patrón oscilatorio de pH_i con la misma periodicidad que la señal $[Ca^{2+}]_i$, esto evaluado en células individuales ([49]; observaciones del laboratorio no publicadas). Esto podría reflejar limitaciones propias del sistema de medición experimental, e. g. una relación de señal/ruido muy baja de la sonda fluorescente utilizada para medir el pH_i en comparación con la sonda de Ca^{2+} ; de forma alternativa, esto puede significar que el pH intraflagelar en efecto no es oscilante periódicamente. En el último caso, la hipótesis de que CatSper es

el principal responsable de las fluctuaciones en las corrientes de Ca^{2+} , al menos de acuerdo con la forma en que se modeló aquí, sería cuestionable y sujeta de ser reexaminada.

La observación de que un aumento en el pH_i precede al primer pico de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espermatozoide de erizo de mar estimulado por SAP, ha llevado a la interpretación de que las corrientes de Ca^{2+} son una consecuencia de esta alcalinización temprana [24, 48, 49]. Esta interpretación se ha convertido en la piedra angular de la hipótesis de que el canal CatSper sensible al pH_i es responsable de la señal de calcio. Sin embargo, hay que resaltar que la misma precedencia de la señal de pH_i al primer pico de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se puede recuperar en el modelo que presenta Ca_V y BK (Figura 4.8A). En este escenario, se acoplaron sNHE y la variable de concentración de protones, parametrizados tal como en el módulo CatSper. En esa variante del modelo, por construcción, el pH_i no es el agente causal de las oscilaciones, pues las corrientes de calcio dependen en última instancia sólo del voltaje (por Ca_V) y del calcio mismo (a través de BK); es decir, sNHE y la $[\text{H}^+]_i$ juegan un rol pasivo, siendo éste último una variable de salida. Esto ilustra las deficiencias de inferir causalidad de series de tiempo experimentales en general y da una advertencia sobre las interpretaciones previas de experimentos, en las que naturalmente se argumentaba que un canal de Ca^{2+} sensible al pH_i debía estar involucrado en la respuestas activada por SAP.

5.2.4 Biestabilidad

Una predicción que llama la atención, es la existencia de biestabilidad en los valores cercanos al reposo de cGMP, de acuerdo con el módulo de CatSper (Figura 4.9). Esto implica que existen perturbaciones que pueden llevar a un valor sostenido de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por encima del reposo normal, en ausencia completa de SAP. Se ilustra esto mediante un aumento transitorio en el potencial de membrana que ancla al sistema en el estado estable caracterizado por un nivel mayor de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figuras 4.9 y B.4).

Otra perturbación con efectos comparables sería un agotamiento transitorio del cGMP, lo cual empujaría al sistema más allá del otro punto de bifurcación (hacia la extrema izquierda del diagrama, Figura 4.7) en el cual el equilibrio inferior desaparece; alrededor del cGMP basal se predice que el sistema tiene histéresis y con dicha perturbación, el sistema permanecería en el estado de equilibrio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mayor. Una implicación de esta propiedad del módulo CatSper es que luego de que un tren de oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ llega a su fin, el sistema puede o no volver al nivel de reposo fisiológico. Estas características de biestabilidad e histéresis no están presentes en el módulo Ca_V +BK, ofreciendo otra forma de separar las dos hipótesis.

Es interesante notar que este estado de equilibrio alternativo, que coexiste con el basal, conlleva además un pH_i bajo y una membrana despolarizada (Figura 4.9B, abajo). Si dicho estado existiera, el significado fisiológico de éste se asociaría con un estado de quiescencia, ya que la acidificación del citoplasma por debajo del pH_i basal inhibe al metabolismo y a las dineínas, que son los motores moleculares que impulsan el batido flagelar [84, 89]. Por otra parte, en este equilibrio posiblemente se vea afectada la viabilidad del espermatozoide, ya que niveles de calcio elevados de una forma sostenida representan una señal universal que desencadena muerte celular en la mayoría de células eucariotas [90-92].

5.2.5 Escenarios mixtos

Aunque los dos módulos candidatos reproducen cualitativamente las respuestas de calcio observadas bajo regímenes de parámetros particulares, se encontraron escenarios mixtos que producen trenes de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ compatibles con experimentos. Introduciendo un parámetro de ponderación que controla la contribución relativa de los módulos, las propiedades cualitativas de las dinámicas de calcio generadas por CatSper+sNHE se conservan cuando el módulo Ca_V+BK se añade dentro de un rango de valores donde su contribución es pequeña; incluso, hay un intervalo intermedio en el que los resultados mejoran en términos de la temporalidad de las oscilaciones. Por el contrario, si el factor de peso para este último módulo se lleva más allá de cierto nivel, las propiedades de los trenes de oscilaciones que son compatibles con experimentos se destruyen.

5.2.5.1 *CatSper+sNHE+Ca_V*

Cuando se titula únicamente Ca_V sobre el módulo CatSper, la respuesta se acelera conservando la envolvente y el espaciamiento progresivo entre picos (Figura 4.10). Hay que recordar que la frecuencia de oscilaciones asociada a Ca_V , es alta (ver caso $g_{bk} = 0$, en Figura 4.5B), por lo que se explica que la incorporación de Ca_V incremente la cantidad de picos. Sin embargo, la duración de la respuesta se prolonga más allá de lo deseable cuando la razón de conductancias $CatSper/Ca_V$, r_g , tiende a valores menores de ≈ 3 ; además, el sistema no retorna al nivel basal luego de las oscilaciones, sino que más bien se acerca al segundo equilibrio estable, mencionada anteriormente (Figura 4.7), caracterizado por una concentración alta de $[Ca^{2+}]_i$.

5.2.5.2 *CatSper+sNHE+BK*

En cuanto al canal BK, si bien su adición resulta indispensable en el contexto de Ca_V , éste muestra un papel más bien inhibitorio para los trenes de oscilaciones de calcio generados por el canal CatSper. Este efecto se puede notar desde densidades casi insignificantes, donde sólo es visible un aumento suave del nivel de $[Ca^{2+}]_i$. A niveles muy altos, dicho incremento es casi sostenido y se puede asociar al estado de equilibrio superior que alberga el ciclo límite principal proveniente del acoplamiento de BK con Ca_V (ver la zona biestable en Figura 4.5A, arriba). No obstante, existe un rango muy reducido de valores en el cual los trenes de oscilaciones no colapsan por la adición de este canal, y se alcanza apreciar un ligero aumento tanto del número de picos como de la extensión de la respuesta de calcio (Figura 4.11B).

Si se considera que la conductancia unitaria de los canales BK en invertebrados marinos es del orden de $\approx 70 \text{ pS}^1$, y tomando en cuenta el área de la membrana (Tabla B.1), las densidades de conductancia de BK permisivas para trenes de oscilaciones (Figura 4.11B) implican un conteo de menos de 1 canal por flagelo. Por lo tanto, aunque se espera que BK desempeñe un papel clave cuando los canales Ca_V son los que impulsan la dinámica

¹ Esta aseveración se basa en un estimado de la conductancia unitaria de BK medida en células de moluscos y crustáceos [93-95], bajo condiciones asimétricas que se acercan a los gradientes fisiológicos. En contraste, los valores de conductancia de BK ampliamente reportados para la contraparte en mamíferos, rondan en $>200 \text{ pS}$, bajo condiciones simétricas de alto K^+ [96]

del calcio, el papel de este canal, si lo hay, debe ser mínimo si CatSper resulta ser el canal predominante.

5.2.5.3 *CatSper+sNHE+Ca_v+BK*

Para este escenario, se añadieron los dos canales manteniendo la misma proporción entre éstos tal como se usó en el módulo original Ca_v+BK. De esta forma, a un incremento del parámetro de ponderación, θ , le corresponde una disminución de la razón de conductancias CatSper/Ca_v (r_g), y un aumento de la densidad de BK. En comparación con los análisis donde se añadieron por separado, la respuesta de calcio dependiente de CatSper se tornó menos tolerante a la adición de Ca_v, pero más tolerante a la incorporación de BK, esto en términos de la duración del tren de oscilaciones. En un escenario donde esta razón es de ≈ 10 y la densidad de conductancia de BK es del 2% del valor de referencia usado en el módulo Ca_v+BK, la frecuencia general del tren de oscilaciones aumenta dentro de rangos compatibles con experimentos, a la vez que se mantiene una duración razonable de la respuesta; todo esto preservando la forma de los picos de $[Ca^{2+}]_i$ dependientes de CatSper (Figura 4.12C). Sin embargo, la incorporación de ambos canales en densidades más altas, el tren de oscilaciones se prolonga mucho más de lo observado experimentalmente (D) o incluso colapsa (E), tal como sucede con la adición de BK solo (Figura 4.11).

El papel de BK en las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ a SAP se ha inferido indirectamente por las alteraciones del período de estas oscilaciones por fármacos como el ácido niflúmico [36, 38] y la Iberiotoxina [39], tratamientos que se contrastaron con simulaciones del modelo discreto (Figura 3.6). Hay que recordar que en éste último modelo, la estequiometría implicada es de 1:1 para todos los canales. No obstante, de acuerdo con el escenario continuo, si el módulo CatSper es el dominante, los trenes de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ serían altamente sensibles a la presencia de BK, bajo los parámetros de referencia. A pesar de esta última predicción, si uno supone que el escenario de referencia corresponde a uno de los escenarios mixtos en vez del módulo original CatSper+sNHE (e.g. Figura 4.12B y C), es de notar que el efecto de bloquear BK sería el de disminuir el número de picos de calcio, lo que es cualitativamente congruente con el experimento de Iberiotoxina y los resultados del modelo discreto (Figura 3.6F, Modelo III).

De acuerdo con el resultado de que BK o Ca_v solos pueden alterar las propiedades del módulo CatSper, y que la adición conjunta de éstos puede dar mejores resultados que su adición por separado, se infiere entonces que la estequiometría de los canales en los espermatozoides de erizo de mar tendría que estar finamente regulada. Hay que recordar los espermatozoides son células transcripcional y traduccionalmente inactivas, por lo que los procesos que proveerían a los espermatozoides maduros con el número de copias de canales dentro de rangos estrechos, estarían operando desde las células precursoras de estos gametos.

Sobre la posible existencia de Ca_v y BK en el flagelo, es de interés notar que análisis de proteómica recientes [52] apuntan en la misma dirección que la predicción de los escenarios mixtos. En dichas evidencias experimentales, a partir de preparados de proteínas de membrana de flagelos, se pudo detectar la presencia de BK (por espectrometría de masas) y de Ca_vs (sólo por inmunodetección). El que no se haya podido recuperar péptidos

específicos de Ca_V por espectrometría de masas, sugiere que si estos canales se encontraran expresados en la membrana del flagelo, estarían debajo del límite de detección de la técnica.

Por último, cabe mencionar que bloqueadores discutiblemente específicos de CatSper (e. g. NNC y mibefradil) se reportaron inicialmente como bloqueadores de canales Ca_V tipo T. Estos fármacos inhiben de forma parcial la respuesta del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por SAPs [24, 52], lo cual podría sugerir la coexistencia de un sistema de transporte de Ca^{2+} adicional a la vía de entrada de calcio pH_i -dependiente.

CONSIDERACIONES FINALES

Ideas do not have to be correct in order to be good; it's only necessary that, if they do fail, they do so in an interesting way.

ROBERT ROSEN, *Life Itself*, 1991 [97]

The job of theorists, especially in biology, is to suggest new experiments. A good theory makes not only predictions, but surprising predictions that then turn out to be true.

FRANCIS CRICK, *What Mad Pursuit*, 1988 [98]

Hay que resaltar que aprovechando las ventajas particulares que puede dar un enfoque teórico de dinámica discreta y uno de dinámica continua, fue posible proponer y analizar modelos que reprodujeron observaciones experimentales y generaron predicciones comprobables, todo esto con una visión actualizada por evidencia reciente con respecto a un canal de suma importancia para la fertilización: CatSper. Por un lado, la exploración de hipótesis mediante modelos discretos ofrece una plataforma de fácil manejabilidad para entender, con una aproximación de grano grueso, la función que podrían tener elementos particulares de la red de señalización en el contexto sistémico. Por otra parte, la modelación continua hizo posible caracterizar de forma más detallada rasgos particulares de las predicciones hechas por el modelo discreto: la contribución relativa de dos tipos de canales de calcio, Ca_V y CatSper, y el posible papel de un canal de potasio activado por calcio (BK ó CaKC). Lo anterior permitió tomar en consideración las estequiometrías relativas de los canales, así como relacionar el tiempo de las simulaciones con el de las series de tiempo experimentales de una forma más directa.

Más allá de ofrecer una plataforma para caracterizar mecanismos que supera las limitaciones experimentales, y contribuir a identificar los principales elementos que controlan el sistema, los estudios cualitativos y cuantitativos realizados por medio de redes lógicas discretas y análisis de bifurcación de sistemas de ecuaciones diferenciales, permiten definir líneas para futuros experimentos para evaluar predicciones teóricas, identificar propiedades clave y priorizarlas de acuerdo con su impacto e importancia para el sistema.

Dada la falta de especificidad de bloqueadores de CatSper, como NNC y mibefradil, los experimentos farmacológicos existentes [24, 52] por sí mismos no son suficientes para demostrar que CatSper es el componente clave para la quimiotaxis del espermatozoide de erizo de mar, por lo que se requiere de una confirmación experimental alternativa. Esta necesidad se ve acrecentada por nuestras revelaciones teóricas de que: 1) CatSper domina en la regulación de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ desencadenadas por SAPs, y 2) los canales Ca_V y BK aparentemente juegan un papel secundario en la vía.

Cabe enfatizar que la exploración aquí realizada sobre cómo la respuesta de calcio se ve afectada por las diferentes estequiometrías de canales iónicos, da para reflexionar sobre el posible impacto que tendrían variaciones en el número de proteínas, producto de fluctuaciones en expresión genética, sobre los fenotipos generados por otros sistemas de señalización.

Se utilizó el análisis de bifurcación de un subconjunto de las ecuaciones diferenciales del sistema íntegro como una herramienta heurística para comprender cómo la evolución temporal de la actividad del cGMP controla la envolvente y los intervalos entre picos de $[Ca^{2+}]_i$. Es importante tener en cuenta que el presente análisis implica una aproximación asintótica, para valores fijos de G , vista como un parámetro y así proceder a cuantificar la amplitud y el período de los ciclos límite estables. La corroboración experimental de dicho análisis requeriría del desarrollo de una técnica de fijación de cGMP, de forma análoga a los experimentos clásicos de fijación de potencial de membrana [99]. Un ejemplo de estas técnicas, se ha reportado para espermatozoides de ratón gracias a los avances recientes de optogenética [100], sin embargo, actualmente queda por probarse su viabilidad en el caso de erizo de mar.

Hay que hacer hincapié en que los modelos aquí presentados tienen la finalidad de explicar observaciones experimentales relacionadas con el esquema de estimulación por SAP más sencillo: células pegadas recibiendo una cantidad fija de ligando, debido a que resulta más fácil de caracterizar y reproducir en el laboratorio. En condiciones que son relevantes para la exploración de gradientes quimiotácticos, el espermatozoide pasa por un estímulo cambiante en el tiempo. A pesar de lo anterior, la calibración aquí lograda provee una aportación hacia la elaboración de modelos integrativos del fenómeno de la quimiotaxis de espermatozoides de erizo de mar con miras a entender el acoplamiento del movimiento flagelar con la señal de $[Ca^{2+}]_i$ de una forma más realista, ya que se podrían introducir las fluctuaciones de calcio generadas por una vía de señalización en lugar de recurrir sólo a una descripción fenomenológica de éstas.

Por otro lado, durante el proceso de simplificación para el modelo continuo no se consideraron algunos mecanismos de retroalimentación potenciales, cuya inclusión requeriría información experimental adicional más detallada: la posible acción de cAMP sobre sNHE [31], la regulación dinámica de spHCN por cAMP (en el modelo se consideró constante, ver Sec. B.1.3), la desensibilización de la respuesta de cGMP por cambios en la afinidad de receptores [75, 87] y el aumento de la actividad de PDE por pH_i [88]. Estos, si bien aparentemente no representaron un impedimento para reproducir resultados de células pegadas, podrían ser cuestiones a explorar para mejorar el modelo en el contexto de estímulos cambiantes de SAP.

Sobre las limitaciones de los modelos aquí presentados, vale la pena mencionar que éstos presentan mayor congruencia con experimentos bajo esquemas de estimulación de SAP a concentraciones saturantes (orden de nM) (Figura B.1). Hay que recordar que un modelo basado en ecuaciones diferenciales ordinarias es más acorde con regímenes de altos números de moléculas. Si bien el orden de la cantidad de receptores de SAP es de 10^5 , existe un cuello de botella determinado por el bajo conteo de canales y moléculas de segundos mensajeros por espermatozoide, los cuales rondan entre decenas hasta miles de cada tipo (Tabla B.1). Dados los volúmenes y concentraciones implicados en un compartimento tan pequeño como lo es el flagelo (≈ 1.6 fL), es de esperarse que el poder predictivo se

vea comprometido cuando se realizan simulaciones con estímulos de bajo número de moléculas de SAP (órdenes de fm a pM), tal como sucedería en la frontera de un gradiente de SAP. Bajo estas situaciones fisiológicamente más relevantes, sería necesario echar mano de enfoques estocásticos tomando como punto de partida el modelo continuo propuesto.

Finalmente, no está por demás puntualizar que los modelos aquí planteados suponen una distribución homogénea de todos los componentes de la red. Sin embargo, en los últimos años, se ha desarrollado un creciente interés dentro del campo de estudio por abordar a detalle aspectos de la organización espacial de componentes fundamentales en la señalización de espermatozoides de mamíferos; en dichos estudios, queda de manifiesto el papel preponderante que juega la disposición espacial de enzimas y canales iónicos (como CatSper) en forma de patrones radiales bien definidos a lo largo del flagelo [101-103]. Si bien el flagelo del espermatozoide de erizo de mar es relativamente menos complejo que su contraparte en mamíferos, no sería de extrañar que un principio de esta naturaleza operara también en la señalización activada por SAPs, lo cual haría necesario recurrir a formalismos multi-compartimento, extendidos espacialmente y ecuaciones diferenciales parciales para mejorar el poder predictivo de los modelos.

Parte V

APÉNDICES

MODELO DISCRETO

A.1 EVALUACIÓN DE LA ROBUSTEZ DE CATSPER

Con el fin de evaluar la estabilidad de los modelos de red que incluyen al canal CatSper (modelos II y III), se realizó un análisis de robustez. El tipo de prueba de robustez que se abordó consistió en hacer pequeñas modificaciones a la función reguladora del nodo CatSper: el resultado de cada renglón de la tabla de verdad es invertido, i. e. o se cambia por 1 y viceversa. Esto es una prueba de estabilidad estructural. Por cada cambio en la regla de evolución de CatSper, se obtiene una serie de tiempo de Ca^{2+}_i luego de promediar sobre 10^5 condiciones iniciales. Se determinó un coeficiente de correlación de Pearson entre todos los pares de series de tiempo. El conjunto de escenarios a explorar consistió del tipo silvestre (WT) y cada una de las 18 mutantes que resultan de modificar un renglón de la función regulatoria a la vez. Series de tiempo altamente correlacionadas presentan un coeficiente de correlación cercano a 1, mientras que un comportamiento no correlacionado conduce a valores cercanos a 0. Vale la pena mencionar que para ambos casos, modelos II y III, la gran mayoría de los coeficientes de correlación de Pearson están cerca de 1, lo que indica que ambos sistemas son robustos a la mayoría de las perturbaciones sobre renglones individuales de la tabla regulatoria en cuestión (Figura A.1). Al analizar los casos de baja correlación, uno ve que corresponden a comportamientos muy poco probables e incompatibles con las evidencias experimentales, e. g. el caso de la mutación 2, donde uno tendría que suponer que CatSper es capaz de pasar del estado cerrado al abierto luego de una hiperpolarización ($V = 0$) bajo pH_i basal ($pH = 0$)

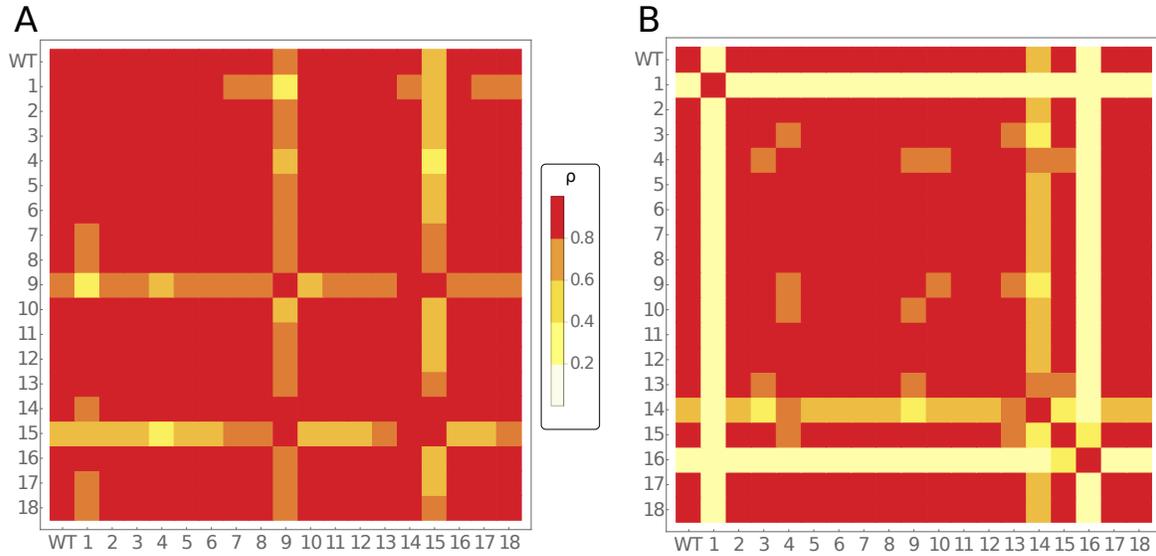


Figura A.1: Matrices de correlación de las redes mutantes que resultan de perturbar la función reguladora de CatSper, en el modelo II (A) y III (B). Se muestra el efecto de perturbaciones individuales en cada una de las salidas de dicha regla reguladora. Los ejes indican el resultado de haber modificado el valor de salida de la fila correspondiente. Cada cuadrado representa la correlación de Pearson entre dinámicas de nodo calcio, con extensión de 1000 iteraciones luego de alcanzar el estado estacionario. Los cuadrados rojos corresponden a altas correlaciones (cerca de 1), mientras que los amarillos son valores de baja correlación (cerca de 0). Hay que notar que la mayoría del área en ambas matrices está cubierta por cuadrados rojos, lo cual da una idea de la robustez de los resultados con respecto a pequeñas desviaciones en la construcción de la tabla regulatoria propuesta para CatSper

MODELO CONTINUO

B.1 MODELACIÓN DE LOS COMPONENTES DE SEÑALIZACIÓN Y CANALES

En la siguiente sección, se presenta la descripción de los componentes moleculares y canales implicados en el proceso de transducción de señales de SAP y que son relevantes en este estudio. Para cada uno de estos componentes se reporta:

- i la evidencia de su papel en la VSAS,
- ii un modelo matemático para su dinámica,
- iii los valores de los parámetros de referencia y cómo se obtuvieron.

B.1.1 Receptores de SAP y guanilato ciclasa

La cinética de unión de SAP a su receptor se ha estudiado en especies de erizos de mar como *L. pictus* [104] y *S. purpuratus* [105], cuyos espermatozoides responden al SAP *speract*. Dados los valores reportados para las constantes de velocidad de asociación y disociación de *speract*, se hace natural la suposición de que la formación de los complejos ligando-receptor es esencialmente irreversible durante una respuesta típica de nado quimiotáctico, alcanzando éstos un tiempo de vida promedio de varias horas. Dado que la escala de tiempo de la respuesta de SAP es del orden de segundos, por mantener simplicidad la tasa de disociación se ignora. Para explicar las características cinéticas de los datos experimentales de cGMP [6], se propone el siguiente mecanismo:

Una vez que los receptores libres (R) se unen a las moléculas de SAP (S), atraviesan varios estados de forma irreversible, cada una con actividad decreciente de guanilato ciclasa, las cuales son, R_H (alto), R_L (bajo) y R_I (inactivo). En el contexto de trabajo experimental previo, R_H y R_L pueden considerarse equivalentes a las formas fosforiladas y desfosforiladas de la guanilato ciclasa, respectivamente [75, 106-108]. La activación del receptor se modela mediante el siguiente diagrama cinético:



sujeto a las relaciones de conservación de masa:

$$R_T = R + R_H + R_L + R_I, \quad (\text{B.1.2a})$$

$$S_T = S + \theta_R(R + R_H + R_L + R_I), \quad (\text{B.1.2b})$$

siendo R_T y S_T valores constantes que denotan las cantidades totales de receptores y SAP, respectivamente. Las densidades de cada forma del receptor (R_T , R , R_H , R_L , R_I) se dan en

unidades de moléculas por célula, y las concentraciones de SAP (S_T , S) se miden en molar (M), que se traducen a las mismas dimensiones por el factor de conversión θ_R . Al comparar el modelo con mediciones cuantitativas en poblaciones de células, se tiene que $\theta_R = s/N_A$, donde s es la concentración de espermatozoides por litro y N_A es la constante de Avogadro. La dinámica de estas formas de receptores se describe mediante las siguientes ecuaciones diferenciales ordinarias:

$$\frac{dS}{dt} = -r_1\theta_R SR, \quad (\text{B.1.3a})$$

$$\frac{dR}{dt} = -r_1 SR, \quad (\text{B.1.3b})$$

$$\frac{dR_H}{dt} = r_1 SR - r_2 R_H, \quad (\text{B.1.3c})$$

$$\frac{dR_L}{dt} = r_2 R_H - r_3 R_L. \quad (\text{B.1.3d})$$

En cuanto a la activación de las guanilato ciclasas estimuladas por SAPs, existen pequeñas diferencias a nivel molecular entre los órdenes taxonómicos de erizos. En los espermatozoides de *S. purpuratus* y *L. pictus*, que pertenecen al orden Echinoida, los dominios con función de receptor y guanilato ciclasa se encuentran en proteínas separadas pero presuntamente acopladas estrechamente en la membrana; en este escenario, se plantea que una vez que una molécula de SAP se une al receptor [14], éste último estimula a su vez la actividad de la guanilato ciclasa [109]. En el caso de *A. punctulata*, otra especie comúnmente usada en trabajo experimental y que pertenece al orden Arbacioida, una sola proteína tiene las funciones de receptor del ligando y de guanilato ciclasa [13, 110]. Para capturar los puntos comunes en un solo modelo, únicamente se tomó en cuenta el último y más simple caso, ignorando así cualquier posible retraso entre la unión de SAP y la activación de la guanilato ciclasa. Por lo tanto, el término correspondiente a la síntesis de cGMP dependiente de SAP, ρ_G , en la sección 4.2.4 se define como:

$$\rho_G = k_H R_H + k_L R_L, \quad (\text{B.1.4})$$

donde las constantes k_H y k_L denotan las actividades de guanilato ciclasa de los receptores SAP de alta (R_H) y baja actividad (R_L), respectivamente.

B.1.2 Canal de K^+ dependiente de nucleótidos cíclicos

Este es un canal de potasio (KCNG) regulado principalmente por GMP cíclico cGMP; se distingue de otros canales de K^+ por ser pseudotetramérico, es decir, las 4 subunidades que componen su estructura principal están codificadas en tándem en una sola secuencia proteínica. Si bien, cada una de estas subunidades cuenta con un dominio de unión a nucleótidos cíclicos [16, 17], se ha demostrado que realmente sólo uno de esos cuatro es el responsable de abrir el canal ante la unión de una molécula de cGMP. Su regulación dista mucho de la mayoría de los canales controlados por nucleótidos cíclicos, ya que opera en un rango de sensibilidad de nM y su mecanismo de compuerta carece de cooperatividad

[16, 111]. Dado lo anterior, para este modelo se supone que la fracción de canales abiertos, denotados como f_{kn}^o , aumenta con una tasa directamente proporcional a la actividad cGMP (G) y disminuye con cinética de primer orden.

$$\frac{df_{\text{kn}}^o}{dt} = \alpha_{\text{kn}}G(1 - f_{\text{kn}}^o) - \beta_{\text{kn}}f_{\text{kn}}^o. \quad (\text{B.1.1})$$

La expresión tanto para la fracción de los canales abiertos en estado estacionario, \hat{f}_{kn}^o , como para el tiempo característico, τ_{kn} , puede derivarse de las tasas de apertura y cierre:

$$\hat{f}_{\text{kn}}^o = \frac{\alpha_{\text{kn}}G}{\alpha_{\text{kn}}G + \beta_{\text{kn}}} = \frac{G}{G + K_{\text{kn}}}, \quad (\text{B.1.2a})$$

$$\tau_{\text{kn}} = \frac{1}{\alpha_{\text{kn}}G + \beta_{\text{kn}}} = \frac{1}{\alpha_{\text{kn}}(G + K_{\text{kn}})}, \quad (\text{B.1.2b})$$

con $K_{\text{kn}} = \frac{\beta_{\text{kn}}}{\alpha_{\text{kn}}}$. La densidad de corriente iónica a través de estos canales se modela como:

$$I_{\text{kn}} = g_{\text{kn}}f_{\text{kn}}^o(V - E_K), \quad (\text{B.1.3})$$

donde E_K es el potencial de Nernst del K^+ y g_{kn} denota la conductancia efectiva de los canales **KCN**, dada por el producto de la conductancia unitaria del canal por la densidad de canales en la membrana del flagelo.

B.1.3 Canal activado por hiperpolarización y modulado por nucleótidos cíclicos

El tipo de canal considerado en este modelo es la variante específica de espermatozoides de erizo de mar (**spHCN**). Este tipo de canales catiónicos tienen selectividad débil y llevar una corriente mixta de Na^+ y K^+ con una relación de permeabilidad P_K/P_{Na} de ~ 4 a 5 y cuenta con un potencial de inversión, E_{hc} , entre -30 mV y -10 mV. Dadas estas propiedades, cuando este canal se abre bajo gradientes fisiológicos de Na^+ y K^+ , permitiría una corriente entrante de sodio y por consiguiente despolariza la membrana [58, 59, 81]. A diferencia de los canales HCN típicos, en los cuales su voltaje de activación media es desplazado por la concentración de cAMP, la corriente de **spHCN** se inactiva en ausencia de éste nucleótido cíclico y su nivel máximo de apertura incrementa con la concentración de éste último [59, 112]. No obstante, para la ecuación de la corriente iónica asociada con este canal, en el modelo se supone que el cAMP está siempre presente en niveles suficientes ($\sim 50 \mu\text{M}$, estimado de [6]) para impedir la inactivación del canal ($K_{1/2}$ de cAMP en **spHCN** es $0.72 \mu\text{M}$ [113]); de ahí que no se haya incluido ninguna ecuación para la dinámica del cAMP ni se haya considerado la inactivación del canal [59, 113]. Siguiendo el esquema clásico de un modelo tipo **HH**, se propone que la apertura de **spHCN** depende de la activación simultánea de tres compuertas idénticas, indicadas por m_{hc} , de modo que la fracción de canales abiertos es $f_{\text{hc}}^o = m_{\text{hc}}^3$. La dinámica de apertura de compuerta está descrita como:

$$\frac{dm_{\text{hc}}}{dt} = \frac{1}{\tau_{\text{hc}}} (\hat{m}_{\text{hc}} - m_{\text{hc}}), \quad (\text{B.1.1})$$

donde la fracción de compuertas activas en estado estacionario, \hat{m}_{hc} , se modela como una ecuación de Boltzmann, mientras que el tiempo característico, τ_{hc} , se modela con una función gaussiana voltaje-dependiente:

$$\hat{m}_{hc} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V-h_1}{h_2}}}, \quad (\text{B.1.2a})$$

$$\tau_{hc} = h_3 + h_4 e^{-\left(\frac{V-h_5}{h_6}\right)^2}. \quad (\text{B.1.2b})$$

La corriente a través de los canales *spHCN*, I_{hc} , está dada por:

$$I_{hc} = g_{hc} f_{hc}^o (V - E_{hc}) = g_{hc} m_{hc}^3 (V - E_{hc}). \quad (\text{B.1.3})$$

B.1.4 Intercambiador sodio/protón electroneutral de espermatozoide

Este tipo de intercambiador es específico de espermatozoides (*sNHE*) y se expresa en la membrana de su flagelo [114]. Su actividad incrementa cuando el potencial de membrana alcanza niveles hiperpolarizados y disminuye por despolarización. Cuando está activo, hace uso del gradiente de concentración de Na^+ para expulsar protones por medio de un mecanismo de intercambio electroneutral Na^+/H^+ con una estequiometría 1:1 [115], lo cual provoca una alcalinización del citosol. Si bien el *sNHE* no es un canal iónico, se distingue del resto de la familia NHE por tener un dominio sensor de voltaje que es homólogo al de los canales voltaje-dependientes [31] (ver Figura 1.5); esto podría explicar que el incremento de pH_i sodio-dependiente observado en el espermatozoide de erizo de mar requiera una hiperpolarización [57, 115-117], a pesar de que la distribución de cargas neta en cada evento de intercambio es neutral. Por lo tanto, se modela esta dependencia de la activación sobre el voltaje como un mecanismo de compuerta similar al de las ecuaciones tipo *HH*. La fracción de moléculas activas de *sNHE*, denotada f_{nh}^a , se describe como:

$$\frac{df_{nh}^a}{dt} = \alpha_{nh}(1 - f_{nh}^a) - \beta_{nh}f_{nh}^a, \quad (\text{B.1.1})$$

donde las tasas de activación e inactivación son a su vez funciones que dependen del potencial de membrana:

$$\alpha_{nh} = n_1 \frac{V - n_2}{e^{\frac{V-n_2}{n_3}} - 1}, \quad (\text{B.1.2a})$$

$$\beta_{nh} = -n_4 \frac{V - n_5}{e^{-\frac{V-n_5}{n_6}} - 1}. \quad (\text{B.1.2b})$$

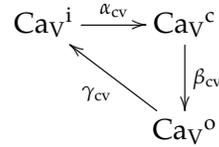
El flujo de protones debido a la actividad de *sNHE*, designado J_H (mol s^{-1}), se modela como un mecanismo reversible, de equilibrio rápido, orden de unión aleatorio, cinética bi-bi, tal cómo se propuso en intercambiadores electroneutrales de mitocondria [118]:

$$J_H = f_{nh}^a J_{max} \frac{H[Na^+]_o - 10^{-pH_o}[Na^+]_i}{H[Na^+]_o + K_{Na}(H + 10^{-pH_o}) + 10^{-pH_o}[Na^+]_i}, \quad (B.1.3)$$

donde J_{max} (mols^{-1}) es la velocidad de intercambio máxima; $[Na^+]_o$ y $[Na^+]_i$ son las concentraciones extracelulares e intraflagelares, respectivamente; pH_o es el pH extracelular; y K_{Na} es la constante de equilibrio de disociación para el sodio.

B.1.5 Canales de calcio voltaje-dependientes

Existe evidencia que sugiere la participación de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes clásicos (Ca_V) en la respuesta activada por SAP, i. e. los canales activados por bajo [8, 18] y alto umbral [19]. Para este modelo sólo se incluyeron los canales tipo T, que pertenecen a la primera clase y son conocidos por estar asociados con actividad oscilatoria de calcio en otros tipos celulares. Como se puede observar en el siguiente diagrama, su dinámica se modela con el esquema más sencillo, en el cual los canales adquieren uno de tres estados: inactivo (Ca_V^i), cerrado (Ca_V^c) y abierto (Ca_V^o), y las transiciones entre éstos son irreversibles a manera de simplificar el modelo:



Las tasas de activación son funciones exponenciales dependientes de voltaje similares a las de los modelos tipo HH:

$$\alpha_{cv} = v_1 \frac{V - v_2}{e^{-\frac{V-v_2}{v_3}} - 1}, \quad (B.1.1a)$$

$$\beta_{cv} = -v_4 \frac{V - v_5}{e^{-\frac{V-v_5}{v_6}} - 1}, \quad (B.1.1b)$$

$$\gamma_{cv} = -v_7 \frac{V - v_8}{e^{-\frac{V-v_8}{v_9}} - 1}. \quad (B.1.1c)$$

Cada velocidad de transición está definida para que sea favorecida dentro de diferentes rangos de voltaje: la recuperación de la inactivación (de Ca_V^i a Ca_V^c) se ve favorecida por la hiperpolarización, la inactivación (de Ca_V^o a Ca_V^i) tiene lugar bajo despolarización y la apertura de canales cerrados (Ca_V^c a Ca_V^o) se ve favorecida por potenciales que caen dentro de un rango más estrecho entre los dos primeros rangos.

Denotando la fracción de canales abiertos, cerrados e inactivos como f_{cv}^o , f_{cv}^c y f_{cv}^i , respectivamente, se tienen dos ecuaciones diferenciales para la cinética de los primeros dos estados, mientras que la última se calcula a partir de la ecuación de conservación $f_{cv}^o + f_{cv}^c + f_{cv}^i = 1$.

$$\frac{df_{cv}^o}{dt} = \beta_{cv}f_{cv}^c - \gamma_{cv}f_{cv}^o, \quad (\text{B.1.2a})$$

$$\frac{df_{cv}^c}{dt} = \alpha_{cv}(1 - f_{cv}^c - f_{cv}^o) - \beta_{cv}f_{cv}^c. \quad (\text{B.1.2b})$$

Después de resolver las ecuaciones para el equilibrio, se obtiene:

$$\begin{aligned} \hat{f}_{cv}^o &= \frac{\alpha_{cv}\beta_{cv}}{\beta_{cv}\gamma_{cv} + \alpha_{cv}\beta_{cv} + \gamma_{cv}\alpha_{cv}} \\ &= \frac{1}{1 + \gamma_{cv}\left(\frac{1}{\alpha_{cv}} + \frac{1}{\beta_{cv}}\right)}. \end{aligned} \quad (\text{B.1.3a})$$

La densidad de corriente iónica a través de estos canales se modela como:

$$I_{cv} = g_{cv}f_{cv}^o(V - E_{Ca}). \quad (\text{B.1.4})$$

B.1.6 Canales CatSper

El genoma de erizo de mar contiene el conjunto de genes necesario para la expresión de las cuatro subunidades centrales y tres auxiliares que constituyen el complejo CatSper [22]. Además, la expresión de estas subunidades se ha demostrado en flagelos de espermatozoides de las especies de erizo de mar *A. punctulata* [24] y *S.purpuratus* [52]. Con el fin de modelar la apertura de CatSper, se consideraron tres mecanismos reguladores reportados en la literatura en espermatozoides de ratón, de humano y de erizo de mar [24, 25, 119, 120]:

- i apertura por despolarización
- ii modulación de la sensibilidad al voltaje por pH_i
- iii inactivación por calcio intracelular

Estas formas de regulación se modelaron mediante dos variables de compuerta independientes, m_{cs} y h_{cs} , que representan respectivamente la fracción de canales con su compuerta modulada por voltaje y pH_i abierta, y la fracción de canales con su compuerta Ca^{2+} -dependiente sin inactivar por el calcio. De esta forma, la fracción de canales CatSper abiertos, f_{cs}^o , capaces de conducir corriente Ca^{2+} , está dado por el producto de estas dos variables de compuerta:

$$f_{cs}^o = m_{cs}h_{cs}, \quad (\text{B.1.1})$$

cuya dinámica se describe mediante las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dm_{cs}}{dt} = \alpha_m(1 - m_{cs}) - \beta_m m_{cs}, \quad (\text{B.1.2a})$$

$$\frac{dh_{cs}}{dt} = \alpha_h(1 - h_{cs}) - \beta_h h_{cs}. \quad (\text{B.1.2b})$$

Las velocidades de apertura y cierre de la compuerta dependiente de voltaje y pH_i se describieron con las siguientes funciones simétricas:

$$\alpha_m = s_1 e^{-\frac{v_{cs}-V}{2s_2}}, \quad (\text{B.1.3a})$$

$$\beta_m = s_1 e^{\frac{v_{cs}-V}{2s_2}}, \quad (\text{B.1.3b})$$

tal que la curva de apertura de compuerta en el equilibrio es una función de Boltzmann dependiente de voltaje:

$$\hat{m}_{cs} = \frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m} = \frac{1}{1 + e^{\frac{v_{cs}-V}{s_2}}}. \quad (\text{B.1.4})$$

La modulación por pH_i se incluye de tal forma que el voltaje de activación media, v_{cs} , sea a su vez una función dependiente de la concentración de protones H :

$$v_{cs} = s_3 \frac{s_4^{s_5}}{(-\log_{10} H)^{s_5} + s_4^{s_5}} + s_6, \quad (\text{B.1.5})$$

con el fin de producir un desplazamiento de la curva de activación hacia potenciales de membrana más negativos tras la alcalinización del citosol, tal como se ha observado en [24, 25, 119]. Vale la pena mencionar que la identidad global entre las subunidades CatSper de erizo de mar y sus homólogas en mamífero es pequeña (25-35%) [24], y más aún la secuencia del dominio sensor de voltaje (ubicado en la región transmembranal S_4) en erizo de mar [24] contiene más residuos cargados positivamente en las subunidades CatSper 3 y 4 en comparación con sus respectivos homólogo en mamíferos [30], lo cual sugiere que la apertura de este canal podría tener una mayor dependencia de voltaje.

Se propone que la segunda compuerta, inactivada por $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cambia entre estados abierto y cerrado con las siguientes velocidades:

$$\alpha_h = s_{10}(s_8/s_7)^{s_9}, \quad (\text{B.1.6a})$$

$$\beta_h = s_{10}(C/s_7)^{s_9}, \quad (\text{B.1.6b})$$

cuyas formas de función fueron elegidas de modo que al resolver la fracción de compuerta abierta en el equilibrio, \hat{h}_{cs} , se obtenga una función de Hill

$$\hat{h}_{cs} = \frac{\alpha_h}{\alpha_h + \beta_h} = \frac{s_8^{s_9}}{s_8^{s_9} + C^{s_9}}. \quad (\text{B.1.7})$$

La densidad de corriente iónica a través de CatSper se modela como:

$$I_{cs} = g_{cs} f_{cs}^o(V - E_{Ca}). \quad (\text{B.1.8})$$

B.1.7 Canales de potasio de alta conductancia

Estos canales, también conocidos como BK, se activan por $[Ca^{2+}]_i$, y se ha considerado su participación en la VSAS por experimentos de bloqueo farmacológico (AN [8, 36] e Iberiotoxina [39]); además, se han incluido en modelos discretos [39]. Para su dinámica se plantea la existencia de dos estados, abierto o cerrado, donde la fracción de canales abiertos, denotada por f_{bk}^o , se describe por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{df_{bk}^o}{dt} = \alpha_{bk}(1 - f_{bk}^o) - \beta_{bk}f_{bk}^o, \quad (B.1.1)$$

con la tasa de cierre constante β_{bk} constante y la tasa de apertura es la siguiente función dependiente de Ca_{2+} :

$$\alpha_{bk} = b_1 \frac{b_2 - C}{e^{\frac{b_2 - C}{b_3}} - 1}. \quad (B.1.2)$$

La densidad de corriente iónica a través de estos canales se expresa como:

$$I_{bk} = g_{bk}f_{bk}^o(V - E_K). \quad (B.1.3)$$

B.2 COMPENDIO DE ECUACIONES

La modelación para cada uno de los módulos esquematizados en la Figura 4.1 se resume en los siguientes sistemas de ecuaciones diferenciales:

B.2.1 Módulo disparador

$$\frac{dS}{dt} = -r_1\theta_R SR, \quad (B.2.1)$$

$$\frac{dR}{dt} = -r_1 SR, \quad (B.2.2)$$

$$\frac{dR_H}{dt} = r_1 SR - r_2 R_H, \quad (B.2.3)$$

$$\frac{dR_L}{dt} = r_2 R_H - r_3 R_L, \quad (B.2.4)$$

$$\frac{dG}{dt} = \sigma_G - \delta_G G + \theta_G(k_H R_H + k_L R_L), \quad (B.2.5)$$

$$\frac{df_{kn}^o}{dt} = \alpha_{kn} G(1 - f_{kn}^o) - \beta_{kn} f_{kn}^o, \quad (B.2.6)$$

$$\frac{dm_{hc}}{dt} = \frac{1}{\tau_{hc}} (\hat{m}_{hc} - m_{hc}), \quad (B.2.7)$$

$$I_{kn} = g_{kn} f_{kn}^o (V - E_K), \quad (B.2.8)$$

$$I_{hc} = g_{hc} m_{hc}^3 (V - E_{hc}). \quad (B.2.9)$$

B.2.2 Módulo Ca_V+BK

$$\frac{df_{cv}^o}{dt} = \beta_{cv}f_{cv}^c - \gamma_{cv}f_{cv}^o, \quad (B.2.1)$$

$$\frac{df_{cv}^c}{dt} = \alpha_{cv}(1 - f_{cv}^c - f_{cv}^o) - \beta_{cv}f_{cv}^c, \quad (B.2.2)$$

$$\frac{df_{bk}^o}{dt} = \alpha_{bk}(1 - f_{bk}^o) - \beta_{bk}f_{bk}^o, \quad (B.2.3)$$

$$I_{cv} = g_{cv}f_{cv}^o(V - E_{Ca}), \quad (B.2.4)$$

$$I_{bk} = g_{bk}f_{bk}^o(V - E_K). \quad (B.2.5)$$

B.2.3 Módulo $CatSper+sNHE$

$$\frac{dm_{cs}}{dt} = \alpha_m(1 - m_{cs}) - \beta_m m_{cs}, \quad (B.2.1)$$

$$\frac{dh_{cs}}{dt} = \alpha_h(1 - h_{cs}) - \beta_h h_{cs}, \quad (B.2.2)$$

$$\frac{df_{nh}^a}{dt} = \alpha_{nh}(1 - f_{nh}^a) - \beta_{nh}f_{nh}^a, \quad (B.2.3)$$

$$\frac{dH}{dt} = \sigma_H - \delta_H H - \frac{J_H}{v_f}, \quad (B.2.4)$$

$$I_{cs} = g_{cs}f_{cs}^o(V - E_{Ca}). \quad (B.2.5)$$

B.2.4 Ecuaciones de acoplamiento de módulos

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{1}{C_m} \left(I_L + \sum_i I_i \right), \quad (B.2.1)$$

$$\frac{dC}{dt} = \sigma_C - \delta_C C - \frac{s_f}{2v_f F} \sum_j I_j, \quad (B.2.2)$$

$$I_L = g_L \left(V - E_m \left(1 + \sum_i \frac{g_i}{g_L} \hat{f}_i E_i \right) \right), \quad (B.2.3)$$

con $i \in \{kn, hc, cv, bk, cs\}$, y $j \in \{cv, cs\}$; de estos últimos conjuntos, se elige el subconjunto de corrientes correspondiente según el escenario a explorarse.

B.3 VARIABLES, FUNCIONES INTERMEDIAS Y VALORES DE PARÁMETROS

En la tabla B.1 se concentra de forma sistemática toda la información concerniente a las cantidades utilizadas en el modelo. Dependiendo de la naturaleza de cada una de éstas, la cuarta columna puede especificar un valor numérico si es un parámetro, o la indicación de si se trata de una variable ó una función. La última columna podrá contener, según sea el caso:

- El número de referencia bibliográfica si se utilizaron los valores tal como están reportados en la literatura.
- La letra A si se trata de un parámetro ajustado con funciones del software especificado en la sección 4.2.2, así como el número de referencia bibliográfica de donde fueron extraídos los datos experimentales para el ajuste.
- Las letras E si es un parámetro que fue estimado dentro de rangos fisiológicamente razonables, siguiendo criterios como la generación de oscilaciones de calcio cuya amplitud y duración fueran compatibles con lo observado experimentalmente; de igual forma, se reporta el número de referencia bibliográfica si se usaron observaciones experimentales como guía.
- La letra D si se trata de un parámetro derivado mediante una ecuación, acompañado de la referencia a la sección donde se explica su derivación.
- Una referencia a una ecuación cuando sea una variable o una función.

Tabla B.1: **VARIABLES, FUNCIONES INTERMEDIAS Y VALORES DE PARÁMETROS.** A=parámetro ajustado a datos, E=parámetro estimados manualmente, D=parámetro derivado

| Símbolo | Descripción | Unidades | Valor de referencia | Referencias |
|---|--|--------------------------------|-----------------------|-----------------|
| Módulo disparador: Receptores de SAP y señal de cGMP | | | | |
| SAP y su receptor | | | | |
| S | Concentración extracelular de SAP | nM | Variable | ec. B.1.3 |
| R | Número de receptores libres por flagelo | | Variable | ec. B.1.3 |
| R_H | Número de receptores con alta actividad por flagelo | | Variable | ec. B.1.3 |
| R_L | Número de receptores con baja actividad por flagelo | | Variable | ec. B.1.3 |
| R_T | Número total de receptores por flagelo | | 7.36×10^5 | A [6],Fig.B.1 |
| θ_R | Factor de conversión, número de receptores a concentración | nM | 6.14×10^{-5} | D (sec.4.2.1.2) |
| s | Número de células por volumen en la cámara de medición | mL^{-1} | 3.70×10^7 | A [6],Fig.B.1 |
| r_1 | Constante de velocidad de asociación SAP-receptor | $\text{nM}^{-1} \text{s}^{-1}$ | 2.70×10^{-2} | [105] |
| r_2 | Constante de velocidad de conversión R_H a R_L | s^{-1} | 8.70 | A [6],Fig.B.1 |
| r_3 | Constante de inactivación de R_L | s^{-1} | 5.70×10^{-2} | A [6],Fig.B.1 |
| cGMP | | | | |
| G | Concentración intraflagelar de cGMP | nM | Variable | ec. 4.2.4 |
| G_r | Concentración en reposo | nM | 1.25 | A [6] |
| σ_G | Tasa de síntesis independiente de receptores | nM s^{-1} | 23.65 | A [6],Fig.B.1 |
| δ_G | Constante de degradación | s^{-1} | 18.92 | A [6],Fig.B.1 |
| ρ_G | Tasa de síntesis dependiente de receptores | s^{-1} | Función | ec. B.1.4 |
| k_L | Constante de velocidad de síntesis por R_L | s^{-1} | 3.25 | A [6],Fig.B.1 |
| k_H | Constante de velocidad de síntesis por R_H | s^{-1} | 40.20 | A [6],Fig.B.1 |
| B_G | Capacidad de amortiguamiento de cGMP | | 5.49×10^3 | A [18] |

Continúa en la siguiente página

Tabla B.1 – viene de la página anterior

| Símbolo | Descripción | Unidades | Valor de referencia | Referencias |
|----------------|--|------------------|-----------------------|--|
| θ_G | Factor para convertir número de moléculas a concentración efectiva intraflagelar | nM | 1.89×10^{-4} | D 4.2.1.2 |
| Canales KCNG | | | | |
| f_{kn}^o | Fracción de canales abiertos | | Variable | ec. B.1.1 |
| α_{kn} | Constante de velocidad de apertura | $nM^{-1} s^{-1}$ | 10 | A [18] |
| β_{kn} | Constante de velocidad de cierre | s^{-1} | 257 | [16] |
| g_{kn} | Densidad de conductancia | $pS \mu m^{-2}$ | 135.30 | A ^a [18] |
| I_{kn} | Densidad de corriente | $fA \mu m^{-2}$ | Función | ec. B.1.3 |
| Canales spHCN | | | | |
| m_{hc} | Fracción de compuertas abiertas | | Variable | ec. B.1.1 |
| f_{hc}^o | Fracción de canales abiertos | | Función | m_{hc}^3 |
| \hat{m}_{hc} | Fracción de canales abiertos en estado estacionario | | Función | ec. B.1.2 |
| τ_{hc} | Tiempo característico de apertura | s | Función | ec. B.1.2 |
| h_1 | Voltaje de activación media | mV | -50.80 | [59, 82] |
| h_2 | Sensibilidad de activación | mV | 6.60 | [59, 82] |
| h_3 | Valor basal del tiempo característico τ_{hc} | s | 9.18×10^{-2} | A [59] ,Fig. B.2 |
| h_4 | Amplitud del tiempo característico τ_{hc} | s | 1.10 | A [59] ,Fig. B.2 |
| h_5 | Voltaje donde es máximo τ_{hc} | mV | -42 | A [59] ,Fig. B.2 |
| h_6 | Ancho característico de τ_{hc} | mV | 18.50 | A [59] ,Fig. B.2 |
| g_{hc} | Densidad de conductancia | $pS \mu m^{-2}$ | 193.50 | A ^b [18] |
| I_{hc} | Densidad de corriente | $fA \mu m^{-2}$ | Función | ec. B.1.3 |

Continúa en la siguiente página

a Tomando en cuenta la superficie de membrana del flagelo s_f , y la conductancia unitaria de 110 pS [\[17\]](#), esto implicaría ~ 37 canales por flagelo

b Tomando en cuenta la superficie de membrana del flagelo s_f , y la conductancia unitaria (43 pS [\[81\]](#)), esto implicaría ~ 135 canales por flagelo

Tabla B.1 – viene de la página anterior

| Símbolo | Descripción | Unidades | Valor de referencia | Referencias |
|---|--|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| Módulo Cav + BK | | | | |
| Parámetros de equilibrio para V y C | | | | |
| g_L | Densidad de conductancia de fuga | $\text{pS } \mu\text{m}^{-2}$ | 1.94 | A [18] ^c |
| E_L | Potencial de inversión de la corriente de fuga | mV | 80.05 | D (ec.4.2.3) |
| σ_C | Velocidad de flujo basal de Ca^{2+} , independiente de Cav | nm s^{-1} | 1.14×10^8 | D (sec. 4.2.4) |
| δ_C | Constante de extrusión de Ca^{2+} | s^{-1} | 1.16×10^6 | E |
| Canales Cav | | | | |
| f_{cv}^o | Fracción de canales abiertos | | Variable | ec. B.1.2 |
| f_{cv}^c | Fracción de canales cerrados | | Variable | ec. B.1.2 |
| α_{cv} | Velocidad de recuperación de la inactivación | s^{-1} | Función | ec. B.1.1 |
| β_{cv} | Velocidad de apertura | s^{-1} | Función | ec. B.1.1 |
| γ_{cv} | Velocidad de inactivación | s^{-1} | Función | ec. B.1.1 |
| v_1 | Constante de velocidad de recuperación de la inactivación | $\text{mV}^{-1} \text{s}^{-1}$ | 10.10 | E |
| v_2 | Voltaje de inflexión de recuperación de la inactivación | mV | -55 | E |
| v_3 | Sensibilidad de recuperación de la inactivación al voltaje | mV | 1.42 | E |
| v_4 | Constante de velocidad de la apertura | $\text{mV}^{-1} \text{s}^{-1}$ | 33.80 | E |
| v_5 | Voltaje de inflexión de la apertura | mV | -39 | E |
| v_6 | Sensibilidad de apertura al voltaje | mV | 2.10 | E |
| v_7 | Constante de velocidad de la inactivación | $\text{mV}^{-1} \text{s}^{-1}$ | 8.10 | E |
| v_8 | Voltaje de inflexión de la inactivación | mV | -18 | E |
| v_9 | Sensibilidad de la inactivación al voltaje | mV | 7.50 | E |

Continúa en la siguiente página

c Ajustado en el módulo disparador

Tabla B.1 – viene de la página anterior

| Símbolo | Descripción | Unidades | Valor de referencia | Referencias |
|---|---|--------------------------------|---------------------|----------------|
| g_{cv} | Densidad de conductancia | $\text{pS } \mu\text{m}^{-2}$ | 185.16 | E ^d |
| I_{cv} | Densidad de corriente | $\text{fA } \mu\text{m}^{-2}$ | Función | ec. B.1.4 |
| Canales BK | | | | |
| f_{bk}^o | Fracción de canales abiertos | | Variable | ec. B.1.1 |
| α_{bk} | Velocidad de apertura | s^{-1} | Función | ec. B.1.2 |
| β_{bk} | Constante de velocidad de cierre | s^{-1} | 97 | E |
| b_1 | Constante de velocidad de apertura | $\text{nM}^{-1} \text{s}^{-1}$ | 0.97 | E |
| b_2 | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de inflexión de α_{bk} | nM | 316 | E |
| b_3 | Sensibilidad de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de α_{bk} | nM | 30 | E |
| g_{bk} | Densidad de conductancia | $\text{pS } \mu\text{m}^{-2}$ | 214.50 | E ^e |
| I_{bk} | Densidad de corriente | $\text{fA } \mu\text{m}^{-2}$ | Función | ec. B.1.3 |
| Módulo CatSper + sNHE | | | | |
| Parámetros de equilibrio para V y C | | | | |
| g_L | Densidad de conductancia de fuga | $\text{pS } \mu\text{m}^{-2}$ | 9 | E ^f |
| E_L | Potencial de inversión de la corriente de fuga | mV | -20.40 | D (ec. 4.2.3) |
| σ_C | Velocidad de flujo basal de Ca^{2+} , independiente de CatSper | nM s^{-1} | 3.72×10^7 | D (sec. 4.2.4) |
| δ_C | Constante de extrusión de Ca^{2+} | s^{-1} | 4.27×10^5 | E |
| Intercambiadores sNHE | | | | |
| f_{nh}^a | Fracción de intercambiadores activos | | Variable | ec. B.1.1 |

Continúa en la siguiente página

d Tomando en cuenta la superficie de membrana del flagelo s_f , y la conductancia unitaria (4.70 pS [121]), esto implicaría ~ 1182 canales por flagelo

e Tomando en cuenta la superficie de membrana del flagelo s_f , y la conductancia unitaria (70 pS [95]), esto implicaría ~ 92 canales por flagelo

f Ajustado en el módulo completo CatSper+sNHE para conservar la caída del potencial temprano, y permitir que al término de las oscilaciones se retorne a niveles cercanos al basal

Tabla B.1 – viene de la página anterior

| Símbolo | Descripción | Unidades | Valor de referencia | Referencias |
|-----------------|---|------------------|---------------------|----------------------|
| α_{nh} | Velocidad de activación | s^{-1} | Función | ec. B.1.2 |
| β_{nh} | Velocidad de inactivación | s^{-1} | Función | ec. B.1.2 |
| n_1 | Constante de velocidad de activación | $mV^{-1} s^{-1}$ | 1.51 | E |
| n_2 | Voltaje de inflexión de activación | mV | -65 | E |
| n_3 | Sensibilidad de activación a voltaje | mV | 7 | E |
| n_4 | Constante de velocidad de inactivación | $mV^{-1} s^{-1}$ | 0.90 | E |
| n_5 | Voltaje de inflexión de inactivación | mV | -30 | E |
| n_6 | Sensibilidad de inactivación a voltaje | mV | 7 | E |
| J_{max} | Velocidad de intercambio máxima | $fmol s^{-1}$ | 3×10^{-7} | E |
| K_{Na} | Constante de disociación de Na^+ | mM | 25 | E [57] ^g |
| Canales CatSper | | | | |
| f_{cs}^o | Fracción de canales abiertos | | Función | ec. B.1.1 |
| m_{cs} | Fracción de canales con compuertas voltaje- y pH-dependiente abiertas | | Variable | ec. B.1.2 |
| h_{cs} | Fracción de canales con la compuerta Ca^{2+} -dependiente sin inactivar | | Variable | ec. B.1.2 |
| v_{cs} | Voltaje dependiente de pH que lleva al 50% de activación de m_{cs} en el equilibrio | mV | Función | ec. B.1.5 |
| s_1 | Constante de velocidad de apertura de m_{cs} | s^{-1} | 270 | E |
| s_2 | Sensibilidad de compuerta al voltaje | mV | 10 | E [24, 30], Fig. B.3 |
| s_3 | Amplitud de la respuesta de v_{cs} a pH_i | mV | 79.70 | A [25], Fig. B.3 |
| s_4 | pH_i de activación media de v_{cs} | | 7.20 | E [25], Fig. B.3 |
| s_5 | Coficiente de Hill de v_{cs} | | 35.52 | A [25] |

Continúa en la siguiente página

g Basado en la figura 1 de [57]

Tabla B.1 – viene de la página anterior

| Símbolo | Descripción | Unidades | Valor de referencia | Referencias |
|--------------------------------|--|--------------------------------|-----------------------|---------------------|
| s_6 | Valor basal de v_{cs} , independiente de pH_i | mV | -41 | E, Fig. B.3 |
| s_7 | Factor de escalamiento | nM | 1 | E |
| s_8 | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que lleva a una inactivación de h_{cs} en un 50 % | nM | 700 | E |
| s_9 | Coefficiente de Hill de la curva de inactivación por Ca^{2+} | | 2.50 | E |
| s_{10} | Constante de velocidad de inactivación por Ca^{2+} | $\text{nM}^{-1} \text{s}^{-1}$ | 1.40×10^{-4} | E |
| g_{cs} | Densidad de conductancia a calcio | $\text{pS } \mu\text{m}^{-2}$ | 39.90 | E ^h [25] |
| I_{cs} | Densidad de corriente | $\text{fA } \mu\text{m}^{-2}$ | Función | ec. B.1.8 |
| Variables y parámetros comunes | | | | |
| V | Potencial de membrana | mV | Variable | ec. 4.2.1 |
| E_m | Potencial de membrana en reposo | mV | -40 | [18, 32, 76, 78] |
| C_m | Capacitancia específica de la membrana del flagelo | $\text{pF } \mu\text{m}^{-2}$ | 1×10^{-2} | [122] ⁱ |
| v_f | Volume intraflagelar | fL | 1.60 | [16] |
| s_f | Area de la membrana del flagelo | μm^2 | 30 | D ^j |
| $[\text{K}^+]_o$ | Concentración extracelular de potasio | mM | 9 | [123] ^k |
| $[\text{K}^+]_i$ | Concentración intraflagelar de potasio en reposo | mM | 219 | [115] |
| $[\text{Na}^+]_o$ | Concentración extracelular de sodio | mM | 423 | [123] ^k |
| $[\text{Na}^+]_i$ | Concentración intraflagelar de sodio en reposo | mM | 20 | [56] |
| pH_o | pH extracelular | | 8 | [123] ^k |
| pH_r | pH intracelular en reposo | | 7.10 | [56] |
| $[\text{Ca}^{2+}]_o$ | Concentración extracelular de calcio | mM | 10 | [123] ^k |

Continúa en la siguiente página

h Tomando en cuenta la superficie de membrana del flagelo s_f , y suponiendo que la conductancia unitaria a Ca^{2+} sea de 1 pS, esto implicaría ~ 1200 canales por flagelo

i Valor convencional para la mayoría de membranas citoplasmáticas eucariotas

j Modelando el flagelo como un cilindro de longitud $40 \mu\text{m}$ y un diámetro de base 240nm , viene como la superficie lateral de éste

k Concentración típica en agua de mar artificial utilizada para experimentos de embriología de organismos marinos

Tabla B.1 – viene de la página anterior

| Símbolo | Descripción | Unidades | Valor de referencia | Referencias |
|------------|---|------------|-----------------------|----------------|
| C_r | Concentración intraflagelar de calcio en reposo | nM | 100 | [8, 56] |
| C | Concentración intraflagelar de calcio | nM | Variable | ec. 4.2.6 |
| H | Concentración intraflagelar de protones | M | Variable | ec. 4.2.5 |
| σ_H | Velocidad de flujo basal de H^+ , independiente de sNHE | $M s^{-1}$ | 1.50×10^{-7} | D (sec.4.2.4) |
| δ_H | Constante de extrusión o consumo de H^+ | s^{-1} | 1.28 | D (ec.4.2.5) |
| E_K | Potencial de equilibrio de K^+ | mV | -80 | D ^l |
| E_{hc} | Potencial de inversión de I_{hc} | mV | -18 | [58, 59, 81] |
| E_{Ca} | Potencial de equilibrio de Ca^{2+} | mV | 144 | D ^m |

^l Calculado con la ecuación de Nernst, $E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i}$, con temperatura $T=17^\circ C$

^m Calculado con la ecuación de Nernst con temperatura $T=17^\circ C$, y usando como concentración interior el parámetro C_r

B.4 CALIBRACIÓN

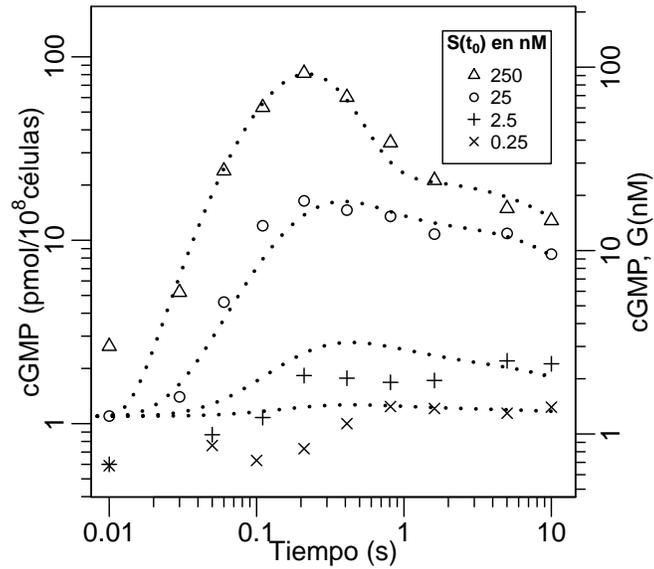


Figura B.1: Cinética de la concentración intracelular de cGMP medida en poblaciones de espermatozoides en solución, estimulados con diferentes concentraciones de SAP. Se muestra en escala log-log, datos provenientes de diferentes estímulos iniciales de SAP (extraídos de [6]); para diferenciarlos tienen asignados un tipo de símbolo particular, y en la leyenda de la figura se muestran los valores de SAP en nM. Las líneas punteadas corresponden a simulaciones de célula única resultantes de ajustar los componentes del módulo disparador (S , R_H , R_L , G), las cuales fueron re-escaladas de acuerdo con la Sección 4.2.1.2

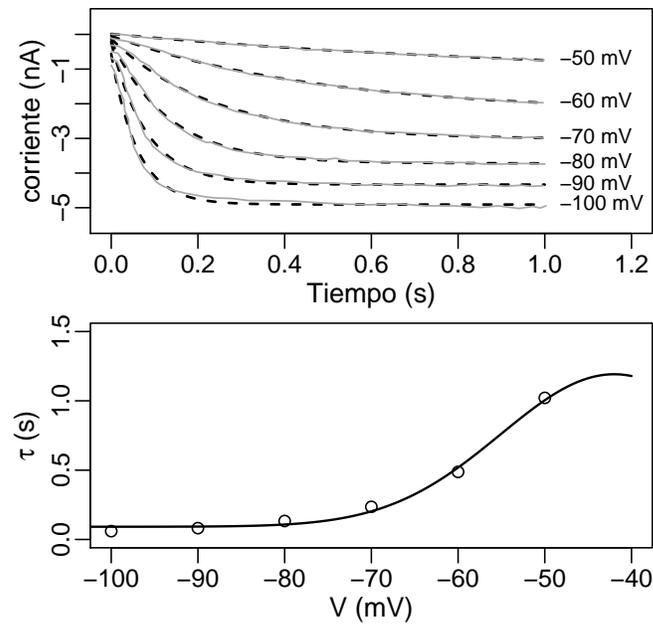


Figura B.2: **Calibración de los parámetros de compuerta de spHCN.** En el panel superior se muestran trazos experimentales de corrientes iónicas medidas en esquema de célula completa, en células HEK expresando heterológicamente spHCN, cargadas con análogo de cAMP desenjaulable por luz UV. La familia de corrientes se generó por diferentes pulsos de voltaje, indicados al final del trazo. Datos extraídos de la figura 4a de [59] (líneas grises). Se hizo un ajuste de una función exponencial a cada trazo (líneas discontinuas negras), con el fin de estimar el tiempo característico de activación (τ). Tomando como entrada la serie de tiempos característicos obtenidos, en el panel inferior se muestra el ajuste resultante de éstos a una función Gaussiana, forma propuesta para el tiempo característico voltaje-dependiente de spHCN (Sec.B.1.3)

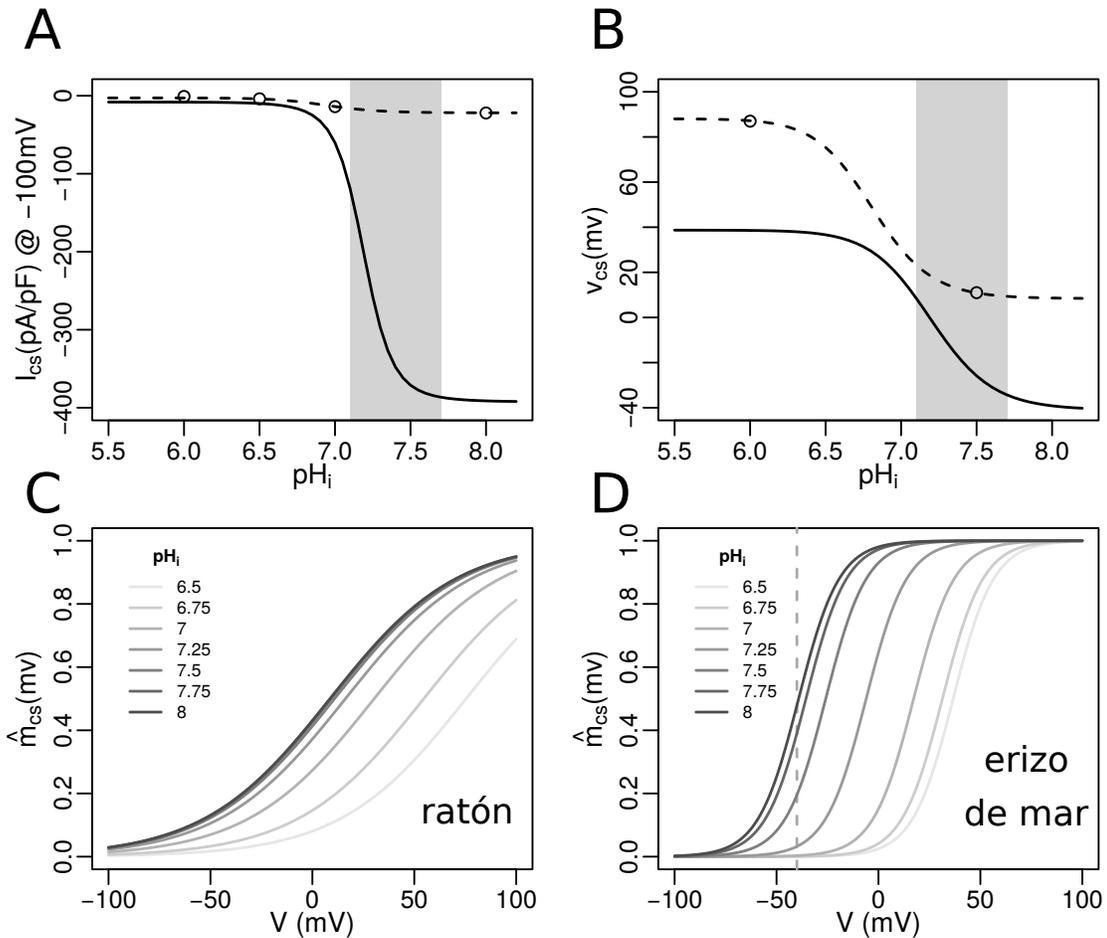


Figura B.3: **Calibración de la compuerta pH- y voltaje-dependiente de CatSper.** En A y B se muestran datos experimentales de espermatozoide de ratón (círculos), junto con ajustes (líneas) relacionados con la variable de compuerta dependiente de voltaje y pH_i en el equilibrio, \hat{m}_{cs} . Las líneas discontinuas corresponden al caso de ratón, mientras que las continuas, a erizo de mar. Partiendo de los parámetros obtenidos con los datos de ratón, éstos se adaptaron al contexto de la *VSAS* buscando que la sensibilidad de CatSper al pH_i estuviera dentro de los rangos de variación reportados para la respuesta fisiológica del pH_i en espermatozoides de erizo de mar (zona marcada en gris). Los datos experimentales de A corresponden a la amplitud de corriente de iones divalentes (Ba^{2+} simétrico) producidas al llevar el voltaje de mantenimiento de 0 mV a -100 mV, bajo diferentes pH_i , y medidas por patch-clamp de célula completa en espermatozoides de ratón (datos extraídos de la figura 4c de [25]). Las líneas discontinuas de los paneles A y B, corresponden al ajuste simultáneo de las ecuaciones B.1.8 y B.1.5 con los dos conjuntos de datos. C y D corresponden a las curvas G/V (conductancia/voltaje) de los casos de ratón y erizo de mar, respectivamente, usando la ecuación B.1.4. En C, se usaron los parámetros reportados en [25]). En D, se indica el potencial de membrana en reposo con una línea discontinua gris a manera de referencia. Como una propuesta inicial, el parámetro de sensibilidad a voltaje, s_2 , se disminuyó en comparación con el reportado para ratón por un factor de 3 veces, a fin de reflejar el hecho de que el dominio sensor de voltaje S_4 en CatSper de erizo de mar tiene más cargas positivas que el homólogo de ratón y humano, probablemente haciendo la compuerta más sensible a los cambios de voltaje. Este último parámetro no se ha estimado en erizo de mar, pues aún no existen medidas de patch-clamp reportadas

B.5 SIMULACIÓN DE UN PULSO DESPOLARIZANTE ANTECEDIDO POR UN PULSO HIPERPOLARIZANTE

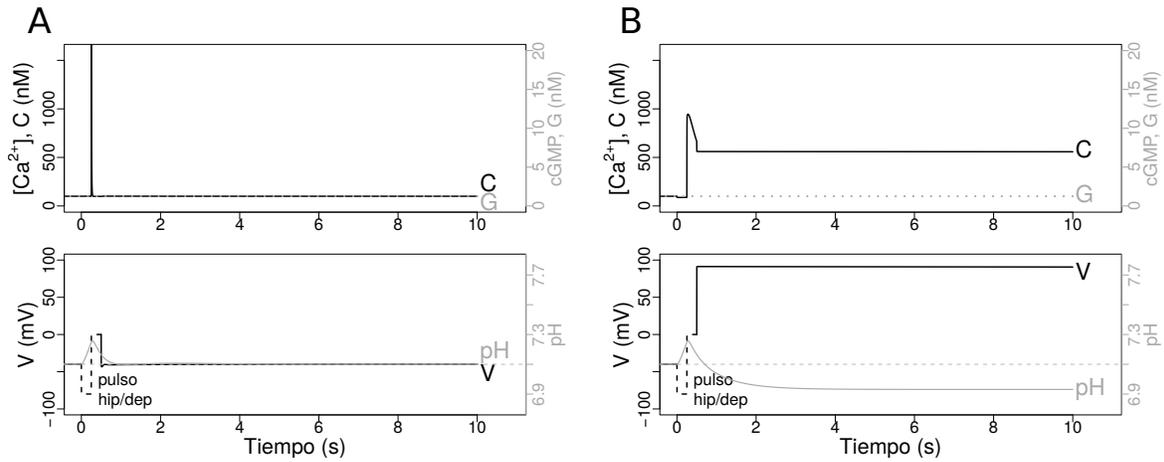


Figura B.4: **Simulación de un pulso hiperpolarizante seguido de un pulso despolarizante.** En ausencia de SAP, y partiendo del estado de reposo, se simula en el tiempo $t=0$, un pulso de voltaje hiperpolarizante seguido inmediatamente de un pulso despolarizante, con una duración de 0.25 s, cada uno. Las dinámicas de voltaje durante el estímulo exógeno están indicadas con líneas discontinuas. En los paneles A y B, se muestran los escenarios Ca_v+BK y $\text{CatSper}+\text{sNHE}$, respectivamente. De arriba a abajo, las figuras corresponden a las dinámicas de C junto con G re-escalada, y el potencial de membrana junto con pH_i .

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Marah J. Hardt. *Sex in the Sea: Our Intimate Connection with Sex-Changing Fish, Romantic Lobsters, Kinky Squid, and Other Salty Erotica of the Deep*. New York, NY: St. Martin's Press, 2016, pág. 288. ISBN: 1137279974 (citado en pág. 3).
- [2] Alberto Darszon, Adán Guerrero, Blanca E. Galindo, Takuya Nishigaki y Christopher D. Wood. «Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility.» En: *The International journal of developmental biology* 52.5-6 (ene. de 2008), págs. 595-606. ISSN: 0214-6282. DOI: [10.1387/ijdb.072550ad](https://doi.org/10.1387/ijdb.072550ad) (citado en págs. 4, 15, 65).
- [3] N Suzuki. «Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs.» En: *Zoological science* 12.1 (feb. de 1995), págs. 13-27. ISSN: 0289-0003 (citado en pág. 4).
- [4] Norio Suzuki, Motonori Hoshi, Kohji Nomura y Saburo Isaka. «Respiratory stimulation of sea urchin spermatozoa by egg extracts, egg jelly extracts and egg jelly peptides from various species of sea urchins: Taxonomical significance». En: *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 72.3 (ene. de 1982), págs. 489-495. ISSN: 03009629. DOI: [10.1016/0300-9629\(82\)90113-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90113-X) (citado en pág. 4).
- [5] Adán Guerrero, Takuya Nishigaki, Jorge Carneiro, Tatsu Yoshiro, Christopher D Wood y Alberto Darszon. «Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing». En: *Developmental Biology* 344.1 (ago. de 2010), págs. 52-65. ISSN: 00121606. DOI: [10.1016/j.ydbio.2010.04.013](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.04.013) (citado en págs. 5, 6, 15, 66).
- [6] U Benjamin Kaupp, Johannes Solzin, Eilo Hildebrand, Joel E Brown, Annika Helbig, Volker Hagen, Michael Beyermann, Francesco Pampaloni e Ingo Weyand. «The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm.» En: *Nature cell biology* 5.2 (feb. de 2003), págs. 109-117. ISSN: 1465-7392. DOI: [10.1038/ncb915](https://doi.org/10.1038/ncb915) (citado en págs. 5, 6, 15, 29, 39-41, 43, 45, 46, 66, 83, 85, 93, 100).
- [7] Jan F. Jikeli, Luis Alvarez, Benjamin M. Friedrich, Laurence G. Wilson, René Pascal, Remy Colin, Magdalena Pichlo, Andreas Rennhack, Christoph Brenker y U. Benjamin Kaupp. «Sperm navigation along helical paths in 3D chemoattractant landscapes.» En: *Nature communications* 6 (ago. de 2015), pág. 7985. ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/ncomms8985](https://doi.org/10.1038/ncomms8985) (citado en págs. 5, 67).
- [8] Chris D Wood, Alberto Darszon y Michael Whitaker. «Speract induces calcium oscillations in the sperm tail.» En: *The Journal of cell biology* 161.1 (abr. de 2003), págs. 89-101. ISSN: 0021-9525. DOI: [10.1083/jcb.200212053](https://doi.org/10.1083/jcb.200212053) (citado en págs. 5, 7, 10, 11, 16, 28, 29, 40, 42, 87, 90, 99).

- [9] Martin Böhmer, Qui Van, Ingo Weyand, Volker Hagen, Michael Beyermann, Midori Matsumoto, Motonori Hoshi, Eilo Hildebrand y Ulrich Benjamin Kaupp. «Ca²⁺ spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm.» En: *The EMBO journal* 24.15 (ago. de 2005), págs. 2741-52. ISSN: 0261-4189. DOI: [10.1038/sj.emboj.7600744](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600744) (citado en págs. 5, 7, 10, 40, 69).
- [10] Christopher D Wood, Takuya Nishigaki, Toshiaki Furuta, Shoji A Baba y Alberto Darszon. «Real-time analysis of the role of Ca(2+) in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm.» En: *The Journal of cell biology* 169.5 (jun. de 2005), págs. 725-31. ISSN: 0021-9525. DOI: [10.1083/jcb.200411001](https://doi.org/10.1083/jcb.200411001) (citado en págs. 6, 7, 15, 16, 69).
- [11] Luis Alvarez, Luru Dai, Benjamin M Friedrich, Nachiket D Kashikar, Ingo Gregor, René Pascal y U Benjamin Kaupp. «The rate of change in Ca²⁺ concentration controls sperm chemotaxis.» En: *The Journal of cell biology* 196.5 (mar. de 2012), págs. 653-63. ISSN: 1540-8140. DOI: [10.1083/jcb.201106096](https://doi.org/10.1083/jcb.201106096) (citado en págs. 6, 10, 66).
- [12] Christopher Wood, Adan Guerrero, Daniel Priego-Espinosa, Gustavo Martínez-Mekler, Jorge Carneiro y Alberto Darszon. «Sea Urchin Sperm Chemotaxis». En: *Flagellar Mechanics and Sperm Guidance*. Ed. por Jacky Cosson. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2015. Cap. 2, págs. 135-182. ISBN: 978-1-68108-129-8. DOI: [10.2174/9781681081281115010007](https://doi.org/10.2174/9781681081281115010007) (citado en págs. 8, 15).
- [13] S Singh, D G Lowe, D S Thorpe, H Rodriguez, W J Kuang, L J Dangott, M Chinkers, D V Goeddel y D L Garbers. «Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases.» En: *Nature* 334.6184 (ago. de 1988), págs. 708-12. ISSN: 0028-0836. DOI: [10.1038/334708a0](https://doi.org/10.1038/334708a0) (citado en págs. 6, 84).
- [14] L J Dangott y D L Garbers. «Identification and partial characterization of the receptor for speract.» En: *The Journal of biological chemistry* 259.22 (nov. de 1984), págs. 13712-6. ISSN: 0021-9258 (citado en págs. 6, 84).
- [15] L J Dangott, J E Jordan, R a Bellet y D L Garbers. «Cloning of the mRNA for the protein that crosslinks to the egg peptide speract.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86.7 (abr. de 1989), págs. 2128-32. ISSN: 0027-8424 (citado en pág. 6).
- [16] Wolfgang Bönigk, Astrid Loogen, Reinhard Seifert, Nachiket Kashikar, Clementine Klemm, Eberhard Krause, Volker Hagen, Elisabeth Kremmer, Timo Strünker y U Benjamin Kaupp. «An atypical CNG channel activated by a single cGMP molecule controls sperm chemotaxis.» En: *Science signaling* 2.94 (ene. de 2009), ra68. ISSN: 1937-9145. DOI: [10.1126/scisignal.2000516](https://doi.org/10.1126/scisignal.2000516) (citado en págs. 6, 40, 41, 84, 85, 94, 98).
- [17] BE Blanca E Galindo, JL de la Vega-Beltrán, José Luis de la Vega-Beltrán, Pedro Labarca, Victor D Vacquier y Alberto Darszon. «Sp-tetraKCNG: A novel cyclic nucleotide gated K⁺ channel.» En: *Biochemical and ...* 354.3 (mar. de 2007), págs. 668-675. ISSN: 0006-291X. DOI: [10.1016/j.bbrc.2007.01.035](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.035) (citado en págs. 6, 41, 84, 94).

- [18] Timo Strünker, Ingo Weyand, Wolfgang Bönigk, Qui Van, Astrid Loogen, Joel E Brown, Nachiket Kashikar, Volker Hagen, Eberhard Krause y U Benjamin Kaupp. «A K⁺-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm.» En: *Nature cell biology* 8.10 (oct. de 2006), págs. 1149-54. ISSN: 1465-7392. DOI: [10.1038/ncb1473](https://doi.org/10.1038/ncb1473) (citado en págs. [6](#), [7](#), [15](#), [16](#), [41-43](#), [45](#), [46](#), [66](#), [68](#), [87](#), [93-95](#), [98](#)).
- [19] G Granados-Gonzalez, I Mendoza-Lujambio, E Rodriguez, B E Galindo, C Beltrán y A Darszon. «Identification of voltage-dependent Ca²⁺ channels in sea urchin sperm.» En: *FEBS letters* 579.29 (dic. de 2005), págs. 6667-72. ISSN: 0014-5793. DOI: [10.1016/j.febslet.2005.10.035](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.035) (citado en págs. [7](#), [15](#), [16](#), [87](#)).
- [20] James F Smith, Olga Syrityna, Marc Fellous, Catherine Serres, Nadja Mannowetz, Yuriy Kirichok y Polina V Lishko. «Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.17 (mar. de 2013), págs. 6823-8. ISSN: 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.1216588110](https://doi.org/10.1073/pnas.1216588110) (citado en pág. [7](#)).
- [21] Dejian Ren, Betsy Navarro, Gloria Perez, Alexander C Jackson, Shyuefang Hsu, Qing Shi, Jonathan L Tilly y David E Clapham. «A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility.» En: *Nature* 413.6856 (oct. de 2001), págs. 603-9. ISSN: 0028-0836. DOI: [10.1038/35098027](https://doi.org/10.1038/35098027) (citado en págs. [7](#), [15](#)).
- [22] Xinjiang Cai y David E Clapham. «Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSper and CatSperbeta.» En: *PloS one* 3.10 (ene. de 2008), e3569. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0003569](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003569) (citado en págs. [7](#), [11](#), [88](#)).
- [23] Xinjiang Cai, Xiangbing Wang y David E Clapham. «Early evolution of the eukaryotic Ca²⁺ signaling machinery: Conservation of the CatSper channel complex.» En: *Molecular biology and evolution* (jul. de 2014), págs. 1-6. ISSN: 1537-1719. DOI: [10.1093/molbev/msu218](https://doi.org/10.1093/molbev/msu218) (citado en págs. [7](#), [11](#)).
- [24] Reinhard Seifert et al. «The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm.» En: *The EMBO Journal* 34 (dic. de 2014), págs. 379-392. ISSN: 0261-4189. DOI: [10.15252/embj.201489376](https://doi.org/10.15252/embj.201489376) (citado en págs. [7-11](#), [13](#), [15](#), [16](#), [65](#), [70](#), [73](#), [75](#), [88](#), [89](#), [97](#)).
- [25] Yuriy Kirichok, Betsy Navarro y David E Clapham. «Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel.» En: *Nature* 439.7077 (feb. de 2006), págs. 737-40. ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/nature04417](https://doi.org/10.1038/nature04417) (citado en págs. [8](#), [88](#), [89](#), [97](#), [98](#), [102](#)).
- [26] Annette C. Dolphin. «Calcium channel auxiliary $\alpha 2\delta$ and β subunits: Trafficking and one step beyond.» En: *Nature Reviews Neuroscience* 13.8 (2012), págs. 542-555. ISSN: 1471003X. DOI: [10.1038/nrn3311](https://doi.org/10.1038/nrn3311) (citado en pág. [9](#)).
- [27] Marta Campiglio y Bernhard E. Flucher. «The Role of Auxiliary Subunits for the Functional Diversity of Voltage-Gated Calcium Channels.» En: *Journal of Cellular Physiology* 230.9 (2015), págs. 2019-2031. ISSN: 10974652. DOI: [10.1002/jcp.24998](https://doi.org/10.1002/jcp.24998) (citado en pág. [9](#)).

- [28] Anna Lobley, Valerie Pierron, Lindsey Reynolds, Liz Allen y David Michalovich. «Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis.» En: *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 1 (2003), pág. 53. ISSN: 1477-7827. DOI: [10.1186/1477-7827-1-53](https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-53) (citado en pág. 9).
- [29] Mamoru Nomura, Carmen Beltrán, Alberto Darszon y Victor D Vacquier. «A soluble adenylyl cyclase from sea urchin spermatozoa.» En: *Gene* 353.2 (jul. de 2005), págs. 231-8. ISSN: 0378-1119. DOI: [10.1016/j.gene.2005.04.034](https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.04.034) (citado en pág. 8).
- [30] Takuya Nishigaki y Ana Laura González-cota. *Pathologies of Calcium Channels*. Ed. por Norbert Weiss y Alexandra Koschak. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, págs. 713-728. ISBN: 978-3-642-40281-4. DOI: [10.1007/978-3-642-40282-1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-40282-1) (citado en págs. 8, 89, 97).
- [31] Dan Wang, Shelby M King, Timothy a Quill, Lynda K Doolittle y David L Garbers. «A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility.» En: *Nature cell biology* 5.12 (dic. de 2003), págs. 1117-22. ISSN: 1465-7392. DOI: [10.1038/ncb1072](https://doi.org/10.1038/ncb1072) (citado en págs. 10, 15, 16, 76, 86).
- [32] C Beltrán, O Zapata y a Darszon. «Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase.» En: *Biochemistry* 35.23 (jun. de 1996), págs. 7591-8. ISSN: 0006-2960. DOI: [10.1021/bi952806v](https://doi.org/10.1021/bi952806v) (citado en págs. 10, 21, 98).
- [33] J García-Soto, M González-Martínez, L de De la Torre y a Darszon. «Internal pH can regulate Ca²⁺ uptake and the acrosome reaction in sea urchin sperm.» En: *Developmental biology* 120.1 (mar. de 1987), págs. 112-20. ISSN: 0012-1606 (citado en pág. 10).
- [34] a. Guerrero y A. Darszon. «Evidence for the activation of two different Ca²⁺ channels during the egg jelly-induced acrosome reaction of sea urchin sperm.» En: *Journal of Biological Chemistry* 264.33 (1989), págs. 19593-19599. ISSN: 00219258 (citado en pág. 10).
- [35] Jesús Espinal-Enríquez, Alberto Darszon, Adán Guerrero y Gustavo Martínez-Mekler. «In silico determination of the effect of multi-target drugs on calcium dynamics signaling network underlying sea urchin spermatozoa motility.» En: *PloS one* 9.8 (ene. de 2014), e104451. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0104451](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104451) (citado en págs. 10-13, 15, 22, 25, 33, 65).
- [36] Christopher D Wood, Takuya Nishigaki, Yoshiro Tatsu, Noboru Yumoto, Shoji a Baba, Michael Whitaker y Alberto Darszon. «Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca²⁺ spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility.» En: *Developmental Biology* 306.2 (jun. de 2007), págs. 525-537. ISSN: 00121606. DOI: [10.1016/j.ydbio.2007.03.036](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.036) (citado en págs. 10, 13, 21, 22, 72, 90).

- [37] Adán Guerrero, Jorge Carneiro, Arturo Pimentel, Christopher D. Wood, Gabriel Corkidi y Alberto Darszon. «Strategies for locating the female gamete: the importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions.» En: *Molecular human reproduction* 17.8 (ago. de 2011), págs. 511-23. ISSN: 1460-2407. DOI: [10.1093/molehr/gar042](https://doi.org/10.1093/molehr/gar042) (citado en pág. 10).
- [38] Adán Guerrero, Jesús Espinal, Christopher D. Wood, Juan M Rendón, Jorge Carneiro, Gustavo Martínez-Mekler y Alberto Darszon. «Niflumic acid disrupts marine spermatozoan chemotaxis without impairing the spatiotemporal detection of chemoattractant gradients.» En: *Journal of cell science* 126.6 (mar. de 2013), págs. 1477-87. ISSN: 1477-9137. DOI: [10.1242/jcs.121442](https://doi.org/10.1242/jcs.121442) (citado en págs. 10-12, 15, 22, 72).
- [39] Jesús Espinal, Maximino Aldana, Adán Guerrero, Christopher Wood, Alberto Darszon y Gustavo Martínez-Mekler. «Discrete dynamics model for the speract-activated Ca²⁺ signaling network relevant to sperm motility.» En: *PloS one* 6.8 (ene. de 2011), e22619. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0022619](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022619) (citado en págs. 10-12, 16, 19, 21-23, 25, 30-32, 37, 65, 72, 90).
- [40] Luis U Aguilera, Blanca E Galindo, Daniel Sánchez y Moisés Santillán. «What is the core oscillator in the speract-activated pathway of the *Strongylocentrotus purpuratus* sperm flagellum?» En: *Biophysical journal* 102.11 (jun. de 2012), págs. 2481-2488. ISSN: 1542-0086. DOI: [10.1016/j.bpj.2012.03.075](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.075) (citado en págs. 10, 11, 37, 38).
- [41] Benjamin M Friedrich y F. Jülicher. «Chemotaxis of sperm cells». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.33 (ago. de 2007), págs. 13256-13261. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.0703530104](https://doi.org/10.1073/pnas.0703530104) (citado en pág. 10).
- [42] B M Friedrich y F Jülicher. «The stochastic dance of circling sperm cells: sperm chemotaxis in the plane». En: *New Journal of Physics* 10.12 (dic. de 2008), pág. 123025. ISSN: 1367-2630. DOI: [10.1088/1367-2630/10/12/123025](https://doi.org/10.1088/1367-2630/10/12/123025) (citado en pág. 10).
- [43] Benjamin M. Friedrich y Frank Jülicher. «Steering chiral swimmers along noisy helical paths». En: *Physical Review Letters* 103.6 (mar. de 2009), pág. 068102. ISSN: 0031-9007. DOI: [10.1103/PhysRevLett.103.068102](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.103.068102) (citado en pág. 10).
- [44] Sarah D Olson. «Fluid dynamic model of invertebrate sperm chemotactic motility with varying calcium inputs.» En: *Journal of biomechanics* 46.2 (ene. de 2013), págs. 329-37. ISSN: 1873-2380. DOI: [10.1016/j.jbiomech.2012.11.025](https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.11.025) (citado en pág. 10).
- [45] Joel E. Cohen. «Mathematics is biology's next microscope, only better; biology is mathematics' next physics, only better». En: *PLoS Biology* 2.12 (2004). ISSN: 15449173. DOI: [10.1371/journal.pbio.0020439](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020439) (citado en pág. 15).
- [46] U Benjamin Kaupp, Nachiket D Kashikar e Ingo Weyand. «Mechanisms of sperm chemotaxis.» En: *Annual review of physiology* 70 (ene. de 2008), págs. 93-117. ISSN: 0066-4278. DOI: [10.1146/annurev.physiol.70.113006.100654](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100654) (citado en págs. 15, 65).
- [47] Luis Alvarez, Benjamin M Friedrich, Gerhard Gompper y U Benjamin Kaupp. «The computational sperm cell.» En: *Trends in cell biology* (dic. de 2013), págs. 1-10. ISSN: 1879-3088. DOI: [10.1016/j.tcb.2013.10.004](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.10.004) (citado en págs. 15, 65).

- [48] Takuya Nishigaki, Christopher D Wood, Yoshiro Tatsu, Noboru Yumoto, Toshiaki Furuta, David Elias, Kogiku Shiba, Shoji a Baba y Alberto Darszon. «A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca²⁺ before its increase». En: *Developmental Biology* 272.2 (ago. de 2004), págs. 376-388. ISSN: 00121606. DOI: [10.1016/j.ydbio.2004.04.035](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.035) (citado en págs. [15](#), [21](#), [40](#), [70](#)).
- [49] Ana Laura González-Cota, Pedro Ângelo Silva, Jorge Carneiro y Alberto Darszon. «Single cell imaging reveals that the motility regulator speract induces a flagellar alkalinization that precedes and is independent of Ca²⁺ influx in sea urchin spermatozoa». En: *FEBS Letters* 589.16 (jul. de 2015), págs. 2146-2154. ISSN: 00145793. DOI: [10.1016/j.febslet.2015.06.024](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.024) (citado en págs. [15](#), [30](#), [40](#), [56](#), [65](#), [69](#), [70](#)).
- [50] Dejian Ren y Jingsheng Xia. «Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization.» En: *Physiology (Bethesda, Md.)* 25.3 (jun. de 2010), págs. 165-75. ISSN: 1548-9221. DOI: [10.1152/physiol.00049.2009](https://doi.org/10.1152/physiol.00049.2009) (citado en pág. [15](#)).
- [51] Polina V Lishko, Yuriy Kirichok, Dejian Ren, Betsy Navarro, Jean-Ju Chung y David E Clapham. «The control of male fertility by spermatozoan ion channels.» En: *Annual review of physiology* 74.October (mar. de 2012), págs. 453-75. ISSN: 1545-1585. DOI: [10.1146/annurev-physiol-020911-153258](https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153258) (citado en pág. [15](#)).
- [52] Jesús Espinal-Enríquez, Daniel Alejandro Priego-Espinosa, Alberto Darszon, Carmen Beltrán y Gustavo Martínez-Mekler. «Network model predicts that CatSper is the main Ca²⁺ channel in the regulation of sea urchin sperm motility.» En: *Scientific reports* 7.1 (2017), pág. 4236. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/s41598-017-03857-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-03857-9) (citado en págs. [16](#), [66](#), [72](#), [73](#), [75](#), [88](#)).
- [53] Polina V. Lishko y Nadja Mannowetz. «CatSper: a unique calcium channel of the sperm flagellum». En: *Current Opinion in Physiology* 2 (2018), págs. 109-113. ISSN: 24688673. DOI: [10.1016/j.cophys.2018.02.004](https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.02.004) (citado en pág. [16](#)).
- [54] John A. Ball. «Memes as replicators». En: *Ethology and Sociobiology* 5.3 (1984), págs. 145-161. ISSN: 01623095. DOI: [10.1016/0162-3095\(84\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0162-3095(84)90020-7) (citado en pág. [21](#)).
- [55] Yi-Hsien Su y Victor D Vacquier. «A flagellar K(+)-dependent Na(+)/Ca(2+) exchanger keeps Ca(2+) low in sea urchin spermatozoa.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99.10 (mayo de 2002), págs. 6743-8. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.102186699](https://doi.org/10.1073/pnas.102186699) (citado en pág. [21](#)).
- [56] Esmeralda Rodríguez y Alberto Darszon. «Intracellular sodium changes during the speract response and the acrosome reaction in sea urchin sperm.» En: *The Journal of physiology* 546.Pt 1 (ene. de 2003), págs. 89-100. ISSN: 0022-3751. DOI: [10.1113/jphysiol.2002.030510](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.030510) (citado en págs. [21](#), [43](#), [98](#), [99](#)).
- [57] H C Lee y D L Garbers. «Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract.» En: *The Journal of biological chemistry* 261.34 (dic. de 1986), págs. 16026-32. ISSN: 0021-9258 (citado en págs. [21](#), [86](#), [97](#)).

- [58] P Labarca, C Santi, O Zapata, E Morales, C Beltr'an, a Li'evano y a Darszon. «A cAMP regulated K⁺-selective channel from the sea urchin sperm plasma membrane.» En: *Developmental biology* 174.2 (mar. de 1996), págs. 271-80. ISSN: 0012-1606 (citado en págs. 21, 41, 85, 99).
- [59] Renate Gauss, Reinhard Seifert y U Benjamin Kaupp. «Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm.» En: *Nature* 393.6685 (jun. de 1998), págs. 583-7. ISSN: 0028-0836. DOI: [10.1038/31248](https://doi.org/10.1038/31248) (citado en págs. 21, 41, 85, 94, 99, 101).
- [60] Maria L. Garcia, Antonio Galvez, Margarita Garcia-Calvo, V. Frank King, Jesus Vazquez y Gregory J. Kaczorowski. «Use of toxins to study potassium channels.» En: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 23.4 (ago. de 1991), págs. 615-46. ISSN: 0145-479X. DOI: [10.1007/BF00785814](https://doi.org/10.1007/BF00785814) (citado en pág. 22).
- [61] P Pacaud, G Loirand, J L Lavie, C Mironneau y J Mironneau. «Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture.» En: *Pflugers. Arch.* 413.6 (abr. de 1989), págs. 629-636 (citado en pág. 22).
- [62] L J Janssen y S M Sims. «Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes.» En: *J Physiol.* 453 (1992), págs. 197-218 (citado en pág. 22).
- [63] H I Akbarali y W R Giles. «Ca₂⁺ and Ca(2⁺)-activated Cl⁻ currents in rabbit oesophageal smooth muscle.» En: *J Physiol.* 460 (ene. de 1993), págs. 117-133 (citado en pág. 22).
- [64] F Espinosa, J L de la Vega-Beltrán, I López-González, R Delgado, P Labarca y A Darszon. «Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl⁻ channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction.» En: *FEBS Lett.* 426.1 (abr. de 1998), págs. 47-51 (citado en pág. 22).
- [65] I A Greenwood y W A Large. «Comparison of the effects of fenamates on Ca-activated chloride and potassium currents in rabbit portal vein smooth muscle cells.» En: *Br J Pharmacol.* 116.7 (dic. de 1995), págs. 2939-2948 (citado en pág. 22).
- [66] Valentin K Gribkoff et al. «Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels.» En: *Mol. Pharmacol.* 50.1 (1996), págs. 206-217 (citado en pág. 22).
- [67] E A Accili y D DiFrancesco. «Inhibition of the hyperpolarization-activated current (i f) of rabbit SA node myocytes by niflumic acid.» En: *Pflügers Archiv.* 431.5 (1996), págs. 757-762 (citado en pág. 22).
- [68] T O Satoh y M Yamada. «Niflumic acid reduces the hyperpolarization-activated current (I_h) in rod photoreceptor cells.» En: *Neurosci. Res.* 40.4 (ago. de 2001), págs. 375-381 (citado en pág. 22).
- [69] Lan Cheng y Michael C Sanguinetti. «Niflumic acid alters gating of HCN₂ pacemaker channels by interaction with the outer region of S₄ voltage sensing domains.» En: *Molecular pharmacology* 75.5 (mayo de 2009), págs. 1210-21. ISSN: 1521-0111. DOI: [10.1124/mol.108.054437](https://doi.org/10.1124/mol.108.054437) (citado en pág. 22).

- [70] Rui-Sheng Wang, Assieh Saadatpour y Réka Albert. «Boolean modeling in systems biology: an overview of methodology and applications.» En: *Physical biology* 9.5 (oct. de 2012), pág. 055001. ISSN: 1478-3975. DOI: [10.1088/1478-3975/9/5/055001](https://doi.org/10.1088/1478-3975/9/5/055001) (citado en pág. 22).
- [71] Assieh Saadatpour y Réka Albert. «Boolean modeling of biological regulatory networks: a methodology tutorial». En: *Methods*. 62.1 (2013), págs. 3-12 (citado en pág. 22).
- [72] Desheng Zheng, Guowu Yang, Xiaoyu Li, Zhicai Wang, Feng Liu y Lei He. «An efficient algorithm for computing attractors of synchronous and asynchronous Boolean networks». En: *PloS one*. 8.4 (2013), e60593 (citado en pág. 22).
- [73] Carlos Espinosa-Soto, Pablo Padilla-Longoria y Elena R Alvarez-Buylla. «A gene regulatory network model for cell-fate determination during Arabidopsis thaliana flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles.» En: *Plant Cell*. 16.11 (nov. de 2004), págs. 2923-2939. ISSN: 1040-4651 (citado en pág. 22).
- [74] R Albert y Hans G Othmer. «The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in Drosophila melanogaster.» En: *J Theor Biol*. 223.1 (jul. de 2003), págs. 1-18. ISSN: 0022-5193 (citado en pág. 22).
- [75] Magdalena Pichlo et al. «High density and ligand affinity confer ultrasensitive signal detection by a guanylyl cyclase chemoreceptor.» En: *The Journal of cell biology* 206.4 (ago. de 2014), págs. 541-57. ISSN: 1540-8140. DOI: [10.1083/jcb.201402027](https://doi.org/10.1083/jcb.201402027) (citado en págs. 29, 67, 76, 83).
- [76] D F Babcock, M M Bosma, D E Battaglia y A Darszon. «Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89.13 (jul. de 1992), págs. 6001-5. ISSN: 0027-8424 (citado en págs. 30, 43, 98).
- [77] S P Cook y D F Babcock. «Activation of Ca²⁺ permeability by cAMP is coordinated through the pHi increase induced by speract.» En: *The Journal of biological chemistry* 268.30 (oct. de 1993), págs. 22408-13. ISSN: 0021-9258 (citado en pág. 30).
- [78] M T González-Martínez, a Guerrero, E Morales, L de De La Torre y a Darszon. «A depolarization can trigger Ca²⁺ uptake and the acrosome reaction when preceded by a hyperpolarization in L. pictus sea urchin sperm.» En: *Developmental biology* 150.1 (mar. de 1992), págs. 193-202. ISSN: 0012-1606 (citado en págs. 30, 69, 98).
- [79] John H. Holland. «Simulating Echo». En: *Hidden order: how adaptation builds complexity*. 1.^a ed. Reading, Massachusetts: Addison-Wesley, 1995. Cap. 4, pág. 146. ISBN: 0201407930 (citado en pág. 37).
- [80] A L HODGKIN y A F HUXLEY. «A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.» En: *The Journal of physiology* 117.4 (ago. de 1952), págs. 500-44. ISSN: 0022-3751 (citado en pág. 38).
- [81] D Sánchez, Pedro Labarca, Alberto Darszon y Daniel Sa. «Sea urchin sperm cation-selective channels directly modulated by cAMP.» En: *FEBS letters* 503.1 (ago. de 2001), págs. 111-5. ISSN: 0014-5793 (citado en págs. 41, 85, 94, 99).

- [82] K S Shin, B S Rothberg y G Yellen. «Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate.» En: *The Journal of general physiology* 117.2 (feb. de 2001), págs. 91-101. ISSN: 0022-1295 (citado en págs. 41, 94).
- [83] Karel Talavera y Bernd Nilius. «Biophysics and structure-function relationship of T-type Ca²⁺ channels». En: *Cell Calcium* 40.2 (ago. de 2006), págs. 97-114. ISSN: 01434160. DOI: [10.1016/j.ceca.2006.04.013](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.04.013) (citado en pág. 42).
- [84] R Christen, R W Schackmann y B M Shapiro. «Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*.» En: *The Journal of biological chemistry* 257.24 (dic. de 1982), págs. 14881-90. ISSN: 0021-9258 (citado en págs. 43, 70).
- [85] H C Lee, C Johnson y D Epel. «Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm.» En: *Developmental biology* 95.1 (ene. de 1983), págs. 31-45. ISSN: 0012-1606 (citado en pág. 43).
- [86] Takuya Nishigaki, Omar José, Ana Laura González-Cota, Francisco Romero, Claudia L Treviño y Alberto Darszon. «Intracellular pH in sperm physiology.» En: *Biochemical and biophysical research communications* 450.3 (ago. de 2014), págs. 1149-1158. ISSN: 1090-2104. DOI: [10.1016/j.bbrc.2014.05.100](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.100) (citado en pág. 65).
- [87] Nachiket D Kashikar, Luis Alvarez, Reinhard Seifert, Ingo Gregor, Oliver Jäckle, Michael Beyermann, Eberhard Krause y U Benjamin Kaupp. «Temporal sampling, resetting, and adaptation orchestrate gradient sensing in sperm.» En: *The Journal of cell biology* 198.6 (sep. de 2012), págs. 1075-91. ISSN: 1540-8140. DOI: [10.1083/jcb.201204024](https://doi.org/10.1083/jcb.201204024) (citado en págs. 67, 76).
- [88] Yi-Hsien Su y Victor D Vacquier. «Cyclic GMP-specific phosphodiesterase-5 regulates motility of sea urchin spermatozoa.» En: *Molecular biology of the cell* 17.1 (ene. de 2006), págs. 114-21. ISSN: 1059-1524. DOI: [10.1091/mbc.E05-08-0820](https://doi.org/10.1091/mbc.E05-08-0820) (citado en págs. 67, 76).
- [89] Richard Christen, R W Schackmann y B M Shapiro. «Metabolism of sea urchin sperm. Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity, and mitochondrial respiration.» En: *The Journal of biological chemistry* 258.9 (mayo de 1983), págs. 5392-9. ISSN: 0021-9258 (citado en pág. 70).
- [90] Nicolas Demaurex y Clark Distelhorst. «Cell biology. Apoptosis—the calcium connection.» En: *Science (New York, N.Y.)* 300.5616 (abr. de 2003), págs. 65-7. ISSN: 1095-9203. DOI: [10.1126/science.1083628](https://doi.org/10.1126/science.1083628) (citado en pág. 70).
- [91] Uwe Paasch, Sonja Grunewald, Sylvia Dathe y Hans Juergen Glander. «Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis.» En: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1030 (2004), págs. 403-409. ISSN: 00778923. DOI: [10.1196/annals.1329.050](https://doi.org/10.1196/annals.1329.050) (citado en pág. 70).

- [92] Cheryl E. Bender, Patrick Fitzgerald, Stephen W. G. Tait, Fabien Llambi, Gavin P. McStay, Douglas O. Tupper, Jason Pellettieri, Alejandro Sánchez Alvarado, Guy S. Salvesen y Douglas R. Green. «Mitochondrial pathway of apoptosis is ancestral in metazoans.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109.13 (mar. de 2012), págs. 4904-9. ISSN: 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.1120680109](https://doi.org/10.1073/pnas.1120680109) (citado en pág. 70).
- [93] F Belardetti, S Schacher y Steven A Siegelbaum. «Action potentials, macroscopic and single channel currents recorded from growth cones of *Aplysia* neurones in culture.» En: *The Journal of physiology* 374 (mayo de 1986), págs. 289-313. ISSN: 0022-3751 (citado en pág. 71).
- [94] M Crest y M Gola. «Large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels are involved in both spike shaping and firing regulation in *Helix* neurones.» En: *The Journal of physiology* 465 (jun. de 1993), págs. 265-87. ISSN: 0022-3751 (citado en pág. 71).
- [95] Alfonso Araque y Washington Buño. «Fast BK-type channel mediates the Ca(2+)-activated K(+) current in crayfish muscle.» En: *Journal of neurophysiology* 82.4 (1999), págs. 1655-1661. ISSN: 00223077 (citado en págs. 71, 96).
- [96] Ramon Latorre y Christopher Miller. «Conduction and selectivity in potassium channels». En: *The Journal of Membrane Biology* 71.1-2 (1983), págs. 11-30. ISSN: 00222631. DOI: [10.1007/BF01870671](https://doi.org/10.1007/BF01870671) (citado en pág. 71).
- [97] Robert Rosen. *Life Itself: A Comprehensive Inquiry Into the Nature, Origin, and Fabrication of Life*. New York, NY: Columbia University Press, 1991, pág. 285. ISBN: 9780231075640 (citado en pág. 75).
- [98] Francis Crick. *What Mad Pursuit: A Personal View of Scientific Discovery*. New York, NY: Basic Books, 1988, pág. 182. ISBN: 0465091377 (citado en pág. 75).
- [99] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley y B. Katz. «Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*». En: *The Journal of Physiology* 116.4 (abr. de 1952), págs. 424-448. ISSN: 00223751. DOI: [10.1113/jphysiol.1952.sp004716](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004716) (citado en pág. 76).
- [100] Vera Jansen, Luis Alvarez, Melanie Balbach, Timo Strünker, Peter Hegemann, U Benjamin Kaupp y Dagmar Wachten. «Controlling fertilization and cAMP signaling in sperm by optogenetics». En: *eLIFE* 4 (2015), págs. 1-15. ISSN: 2050-084X. DOI: [10.7554/eLife.05161.001](https://doi.org/10.7554/eLife.05161.001) (citado en pág. 76).
- [101] Jean Ju Chung, Sang Hee Shim, Robert a. Everley, Steven P. Gygi, Xiaowei Zhuang y David E. Clapham. «Structurally distinct Ca²⁺ signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility». En: *Cell* 157.4 (mayo de 2014), págs. 808-822. ISSN: 10974172. DOI: [10.1016/j.cell.2014.02.056](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.056) (citado en pág. 77).
- [102] Jean-Ju Chung, Kiyoshi Miki, Doory Kim, Sang-Hee Shim, Huanan F Shi, Jae Yeon Hwang, Xinjiang Cai, Yusuf Iseri, Xiaowei Zhuang y David E Clapham. «CatSper ζ regulates the structural continuity of sperm Ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility». En: *eLife* 6 (2017), págs. 1-25. ISSN: 2050-084X. DOI: [10.7554/eLife.23082](https://doi.org/10.7554/eLife.23082) (citado en pág. 77).

- [103] Melissa Miller, Samuel Kenny, Nadja Mannowetz, Steven Mansell, Michal Wojcik, Sarah Mendoza, Robert Zucker, Ke Xu y Polina V Lishko. «Asymmetrically Positioned Flagellar Control Units Regulate Human Sperm Rotation». En: *bioRxiv* (2018). DOI: [10.1101/290122](https://doi.org/10.1101/290122) (citado en pág. 77).
- [104] T Nishigaki y a Darszon. «Real-time measurements of the interactions between fluorescent speract and its sperm receptor.» En: *Developmental biology* 223.1 (jul. de 2000), págs. 17-26. ISSN: 00121606. DOI: [10.1006/dbio.2000.9734](https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9734) (citado en pág. 83).
- [105] Takuya Nishigaki, F Z Zamudio, L D Possani y A Darszon. «Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry.» En: *Biochemical and biophysical research communications* 284.2 (jun. de 2001), págs. 531-535. ISSN: 0006-291X. DOI: [10.1006/bbrc.2001.5000](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5000) (citado en págs. 83, 93).
- [106] J K Bentley y D L Garbers. «Receptor-mediated responses of plasma membranes isolated from *Lytechinus pictus* spermatozoa.» En: *Biology of reproduction* 35.5 (dic. de 1986), págs. 1249-59. ISSN: 0006-3363 (citado en pág. 83).
- [107] G E Ward, G W Moy y V D Vacquier. «Phosphorylation of membrane-bound guanylate cyclase of sea urchin spermatozoa.» En: *The Journal of cell biology* 103.1 (jul. de 1986), págs. 95-101. ISSN: 0021-9525 (citado en pág. 83).
- [108] C S Ramarao y D L Garbers. «Purification and properties of the phosphorylated form of guanylate cyclase.» En: *The Journal of biological chemistry* 263.3 (ene. de 1988), págs. 1524-9. ISSN: 0021-9258 (citado en pág. 83).
- [109] J K Bentley, D J Tubb, D L Garbers y David L Garberssgll. «Receptor-mediated activation of spermatozoan guanylate cyclase.» En: *The Journal of biological chemistry* 261.32 (nov. de 1986), págs. 14859-62. ISSN: 0021-9258 (citado en pág. 84).
- [110] H Shimomura, L J Dangott, D L Garbers, Hiromi Shimomurass, Lawrence J Dangotts, David L Garberssq, H Shimomura, L J Dangott y D L Garbers. «Covalent coupling of a resact analogue to guanylate cyclase.» En: *The Journal of biological chemistry* 261.33 (nov. de 1986), págs. 15778-82. ISSN: 0021-9258 (citado en pág. 84).
- [111] Abhishek Cukkemane, Reinhard Seifert y U Benjamin Kaupp. «Cooperative and uncooperative cyclic-nucleotide-gated ion channels.» En: *Trends in biochemical sciences* 36.1 (ene. de 2011), págs. 55-64. ISSN: 0968-0004. DOI: [10.1016/j.tibs.2010.07.004](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.004) (citado en pág. 85).
- [112] Ki Soon Shin, Chantal Maertens, Catherine Proenza, Brad S Rothberg y Gary Yellen. «Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: desensitization to voltage.» En: *Neuron* 41.5 (mar. de 2004), págs. 737-44. ISSN: 0896-6273 (citado en pág. 85).
- [113] Galen E Flynn, Kevin D Black, Leon D Islas, Banumathi Sankaran y William N Zagotta. «Structure and rearrangements in the carboxy-terminal region of SpIH channels.» En: *Structure (London, England : 1993)* 15.6 (jun. de 2007), págs. 671-82. ISSN: 0969-2126. DOI: [10.1016/j.str.2007.04.008](https://doi.org/10.1016/j.str.2007.04.008) (citado en pág. 85).
- [114] Mamoru Nomura y Victor D Vacquier. «Proteins associated with soluble adenylyl cyclase in sea urchin sperm flagella.» En: *Cell motility and the cytoskeleton* 63.9 (sep. de 2006), págs. 582-90. ISSN: 0886-1544. DOI: [10.1002/cm.20147](https://doi.org/10.1002/cm.20147) (citado en pág. 86).

- [115] H C Lee. «A membrane potential-sensitive Na⁺-H⁺ exchange system in flagella isolated from sea urchin spermatozoa.» En: *The Journal of biological chemistry* 259.24 (dic. de 1984), págs. 15315-9. ISSN: 0021-9258 (citado en págs. 86, 98).
- [116] H C Lee. «Sodium and proton transport in flagella isolated from sea urchin spermatozoa.» En: *The Journal of biological chemistry* 259.8 (abr. de 1984), págs. 4957-63. ISSN: 0021-9258 (citado en pág. 86).
- [117] E Reynaud, L De de La Torre, O Zapata, a Liévano y A Darszon. «Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm.» En: *FEBS letters* 329.1-2 (ago. de 1993), págs. 210-4. ISSN: 0014-5793 (citado en pág. 86).
- [118] Ranjan K Dash y Daniel a Beard. «Analysis of cardiac mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger kinetics with a biophysical model of mitochondrial Ca²⁺ handling suggests a 3:1 stoichiometry.» En: *The Journal of physiology* 586.13 (jul. de 2008), págs. 3267-85. ISSN: 1469-7793. DOI: [10.1113/jphysiol.2008.151977](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.151977) (citado en pág. 86).
- [119] Polina V Lishko, Inna L Botchkina y Yuriy Kirichok. «Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm.» En: *Nature* 471.7338 (mar. de 2011), págs. 387-91. ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/nature09767](https://doi.org/10.1038/nature09767) (citado en págs. 88, 89).
- [120] Timo Strünker, Normann Goodwin, Christoph Brenker, Nachiket D Kashikar, Ingo Weyand, Reinhard Seifert y U Benjamin Kaupp. «The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm.» En: *Nature* 471.7338 (mar. de 2011), págs. 382-6. ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/nature09769](https://doi.org/10.1038/nature09769) (citado en pág. 88).
- [121] C. W. Balke, W. C. Rose, E. Marban y W. G. Wier. «Macroscopic and unitary properties of physiological ion flux through T-type Ca²⁺ channels in guinea-pig heart cells.» En: *The Journal of Physiology* 456.1 (1992), págs. 247-265. ISSN: 14697793. DOI: [10.1113/jphysiol.1992.sp019335](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019335) (citado en pág. 96).
- [122] Bertil Hille. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3.^a ed. Sinauer Associates Inc 2001-07, jul. de 2001. ISBN: 0878933212 (citado en pág. 98).
- [123] G. M. Cavanaugh. *Formulae and Methods VI of the Marine Biological Laboratory Chemical Room*. Woodshole, Massachusetts: Marine Biological Laboratory, 1956, págs. 62-69 (citado en pág. 98).