



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MODELACIÓN Y ANÁLISIS AUTOMATIZADO DE LA REACCIÓN  
ACROSOMAL INDUCIDA POR CAMBIOS EN EL pH ACROSOMAL

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:  
**ANDRÉS ALDANA GONZÁLEZ**

TUTOR:  
DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA - UNAM

CUERNAVACA, MORELOS, AGOSTO DE 2022



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.



*A Max, mi hermano y tutor permanente*

*A Andrea, mi amada compañera*

*A mi mamá, que me sigue cuidando*

*A mi hermana Claudia, a quien admiro desde siempre*

*A Juanita, de quien siempre aprendo*

*A Joaquín, quien me sorprende cada día más*



# Índice general

<b>Agradecimientos</b>	III
<b>Resumen</b>	v
<b>Introducción</b>	vii
<b>1. Antecedentes</b>	1
1.1. La capacitación	1
1.2. La reacción acrosomal	1
1.2.1. Inductores de la RA	5
1.2.2. Regulación de la reacción acrosomal	6
1.3. Redes de regulación bioquímica	10
1.3.1. Atractores	11
1.3.2. Régimen dinámico y mapeo de Derrida	14
<b>2. Red de regulación discreta de la reacción acrosomal</b>	17
2.1. Consideraciones preliminares	17
2.2. Variables externas	19
2.3. Implementación de la red	20
2.4. Funciones de regulación	22
2.4.1. Ejemplo de construcción de la función de regulación del nodo $IP_3R_a$	23
<b>3. Resultados</b>	25
3.1. El espacio de atractores se parte en tres sub-poblaciones funcionalmente diferentes	25
3.2. Heterogeneidad fisiológica	28
3.3. Validación del modelo	31
3.3.1. Ejemplos de comparación entre el modelo y observaciones experimentales	32
3.4. Atractores Espontáneos, Inducibles y Negativos muestran diferencias a gran escala en el estado fisiológico de la red	34
3.5. Aumento de $pH_a$ define la capacidad de la red para la RA	36
3.6. Perturbaciones transitorias de calcio y pH promueven cambios funcionales en una población de Redes	38
3.6.1. La red de regulación de la RA opera cerca del punto crítico	39
<b>4. Conclusiones</b>	43

<b>4.1. Discusión</b> .....	45
<b>4.1.1. Trabajo futuro</b> .....	47
<b>Bibliografía</b>	49

# Agradecimientos

Sin ninguna duda, esta tesis es el resultado de la contribución y participación de muchas personas que aportaron ideas, métodos, conocimiento y experiencia, pero también de aquellos que de muy diversas formas han influido en mi formación académica y personal.

Debo enfatizar que cuando decidí iniciar el doctorado en ciencias biomédicas, mi conocimiento sobre biología podía resumirse prácticamente en saber que los seres vivos se componen de células. El inicio de este camino fue pedregoso (por decir lo menos) y fue gracias al apoyo de muchas personas que pude encontrar los medios para atravesarlo. Con ellos estoy profundamente agradecido.

Agradezco a mi tutor, el Dr. Alberto Darszon Israel, quien desde el principio me ha apoyado en muchas formas diferentes, siempre dispuesto a compartir su experiencia y conocimiento e interesado sobre todo en beneficiar mi formación más que en el proyecto mismo. Es gracias a él que he aprendido el fantástico universo de la biología y que desarrollé la formación y las aptitudes para poder llevar a cabo este trabajo. Es sin duda una inspiración y un ejemplo para todo el que aspire a una carrera científica.

Quiero agradecer al Dr. Gustavo Martínez Mekler, también mi tutor, que al igual que el Dr. Darszon siempre me ha brindado su apoyo, experiencia, amistad e incluso su casa. El apoyo y la convivencia con el Dr. Martínez ha llegado en muy diversas formas que han contribuido en mi formación, no solamente académica sino personal. Es en gran medida gracias al Dr. Martínez que pude llevar a cabo mis estudios de doctorado.

Agradezco a mi hermano, el Dr. Maximino Aldana que ha sido mi tutor no oficial desde mi infancia. Es gracias a él que desde muy temprana edad despertó mi interés en la ciencia. De él he aprendido qué es un átomo, cómo resolver una ecuación, programar una computadora, calcular un atractor y ahora emprender la vida de postdoc, entre muchas e innumerables cosas más, pero sobre todo, he aprendido lo que significa ser un científico entregado y apasionado. El conocimiento, el apoyo y el ejemplo que he recibido de él dentro y fuera de la academia han sido invaluable y siempre estaré agradecido por haber tenido la fortuna de ser su hermano.

Estoy muy agradecido con el Dr. Jorge Carneiro, a quien considero también un tutor no oficial dentro de mis estudios de doctorado, por todas las horas de ayuda, pláticas y recomendaciones que sin duda mejoraron esta tesis. Trabajar con él ha sido una experiencia muy gratificante y enriquecedora de aprendizaje y auto crítica. Sin lugar a dudas, este



trabajo no habría sido posible sin su participación.

Agradezco a la Dra. Andrea Falcón, mi fantástica compañera de vida, que después de todas las pláticas, revisiones, comentarios y sobremesas discutiendo mis resultados con ella, probablemente sabe de memoria el contenido de este trabajo. Agradezco profundamente su paciencia y apoyo en cada día de mi vida. Gracias por elegirme, por seguir eligiéndome y por hacerme un hombre mejor.

Estoy profundamente agradecido con el Consorcio de Fisiología del Espermatozoide, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. La interacción con mis compañeros de laboratorio a través de seminarios, reuniones, pláticas de pasillo y correos electrónicos ha sido fundamental en mi formación. Es sin duda un privilegio convivir con uno de los mejores grupos de investigación en espermatozoide a nivel mundial y espero continuar la convivencia y colaboración con este destacado grupo.

Agradezco a mis sinodales y al resto de mi comité tutorial, el Dr. Arturo Hernández Cruz, el Dr. Froylan Miguel Gómez Lagunas, la Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos, el Dr. Osbaldo Resendis Antonio y el Dr. Carlos Villareal Luján, cuyos comentarios y sugerencias no solamente mejoraron la calidad de este trabajo, sino también me permitieron incrementar mis conocimientos sobre los temas relacionados con esta tesis.

Siempre me sentiré agradecido con toda mi familia, que siempre ha estado presente apoyándome en cada paso. A mi mamá, que con su amor y dedicación siempre me dio los medios para realizar mis estudios, desde el jardín de niños hasta el doctorado. Siempre ha representado un faro y una guía, un ejemplo de trabajo duro y de éxito profesional que me motiva a seguir adelante.

Gracias a mi hermana Claudia Aldana, por siempre cuidarme y nunca dejar de creer en mi. En momentos complicados, ha sido su ejemplo y apoyo lo que me da fuerzas para avanzar y superar la adversidad en cualquier circunstancia.

Gracias a Juanita y Joaquín, que me han brindado su cariño y momentos inolvidables, pero además me han acompañado en cada paso de este camino.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM y a la UNAM misma, que me ha brindado una experiencia fantástica para formarme como profesionista y como persona. Es un orgullo pertenecer a esta universidad que considero mi casa.

Finalmente agradezco a CONACyT por el financiamiento que me permitió dedicarme de tiempo completo al doctorado. De igual forma, agradezco al NIH por el apoyo financiero que me ha permitido realizar mi tesis y a la UNAM por el financiamiento para realizar una estancia en el extranjero.

A todos ustedes: ¡MUCHAS GRACIAS!

Andrés Aldana González

# Resumen

*La reacción acrosomal (RA) es un evento exocitótico del espermatozoide, esencial para la fecundación en los mamíferos. Este proceso involucra diversos cambios fisiológicos (bioquímicos, biofísicos y morfológicos) que culminan en la liberación del contenido acrosomal al medio extracelular, así como reorganización de la membrana plasmática (MP), lo que permite al espermatozoide interactuar y fusionarse con el ovocito. A pesar de muchos esfuerzos, aún quedan pendientes preguntas importantes sobre los mecanismos moleculares que regulan a la RA. Particularmente, no es clara la contribución que tiene la alcalinización acrosomal durante la RA en condiciones fisiológicas. Además, no se ha estudiado la relación de dependencia entre la proporción de espermatozoides capaces de realizar la RA y la heterogeneidad fisiológica en una población de espermatozoides. En esta tesis, presentamos un modelo matemático discreto de la RA en humano, basado en las interacciones fisiológicas entre algunos de los principales componentes de este complejo proceso exocitótico. Mostramos que este modelo reproduce de forma cualitativa diversos resultados experimentales y que puede utilizarse para analizar cómo el pH acrosomal ( $pH_a$ ) y la heterogeneidad celular regulan a la RA. Los resultados presentados confirman que el incremento de  $pH_a$  puede, por sí solo, disparar la RA en una subpoblación de espermatozoides e indican que es un paso necesario para inducir la exocitosis acrosomal por medio de progesterona, un conocido inductor natural de la RA. También mostramos que en una población de espermatozoides, la proporción de células capaces de realizar la RA está directamente relacionada con la estructura detallada de la heterogeneidad fisiológica presente en la población. Finalmente, mostramos que la RA es un fenómeno que opera cerca de la criticalidad, un régimen dinámico caracterizado por la presencia simultánea de robustez y adaptabilidad ante perturbaciones.*



# Introducción

En esta tesis doctoral abordamos algunos aspectos sobre la fisiología del espermatozoide de mamífero. Al inicio de su trayecto en el tracto genital femenino, los espermatozoides de diversas especies, incluido el humano, son infértiles, muchos de ellos inmóviles y deben atravesar por diversos procesos fisiológicos (biofísicos, bioquímicos y morfológicos) que les confieren la capacidad de fecundar al ovocito. El primero de estos, conocido como capacitación, involucra la maduración del espermatozoide que se caracteriza por diversos cambios bioquímicos y biofísicos que resultan, entre otros eventos que se describirán posteriormente, en una disminución en la frecuencia del batido flagelar y un incremento en su amplitud y velocidad de nado [Chang, 1951; Darszon et al., 2011; Stival et al., 2016; Visconti et al., 2011]. La capacitación es necesaria para que ocurra la reacción acrosomal (RA), un segundo evento fundamental requerido para que el espermatozoide pueda fecundar al óvulo. Esta reacción es el objeto de estudio de esta tesis.

La RA es un evento excitotóxico único del espermatozoide, esencial para la fecundación en diversas especies, incluido el humano, durante el cual el gameto masculino libera al medio extracelular diversas enzimas hidrolíticas alojadas en el acrosoma, una vesícula ácida contenida en la parte apical de la cabeza. Como consecuencia, el espermatozoide remodela su membrana plasmática expresando y relocalizando diversas proteínas capaces de interactuar y fusionarse con el ovocito.

El estudio de la RA no solamente nos permite entender mejor la fecundación, que es uno de los procesos evolutivos más conservados y estudiados en biología. Debido a su fundamental importancia, entender los procesos fisiológicos involucrados en la RA puede llevar eventualmente al desarrollo de tratamientos para regular la fertilidad masculina.

A pesar de los diversos esfuerzos por comprender los procesos involucrados en la RA, todavía no se entienden a cabalidad. No es claro dónde inicia la RA, qué ligandos fisiológicos la promueven y cuáles son exactamente los actores bioquímicos que participan en ella. Además, existen preguntas pendientes sobre en qué especie la liberación de enzimas hidrolíticas al medio extracelular facilita el paso de los espermatozoides a través de la zona pelúcida (ZP) [Darszon et al., 1999; Florman and Ducibella, 2006; Jin et al., 2011; Okabe, 2016; Wassarman and Litscher, 2009]. Sabemos que en el curso de este proceso hay un incremento en las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) [Darszon et al., 1999; Sánchez-Cárdenas et al., 2014; Stival et al., 2016], así como de pH ( $\text{pH}_i$ ) [Nishigaki et al., 2014; Stival et al., 2016]. La regulación del  $\text{pH}_i$  es importante para el funcionamiento de diversas proteínas. El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  exclusivo del espermatozoide (CatSper) y el canal de

$K^+$  (Slo3) son fuertemente dependientes de  $pH_i$  [Chávez et al., 2014; Nishigaki et al., 2014; Zhang et al., 2006]. Se sabe que la progesterona (Pg), una hormona presente naturalmente en las inmediaciones del ovocito, promueve la RA mediada por elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  al estimular CatSper en humano  $[Ca^{2+}]_i$  [Kirichok et al., 2006; Lishko et al., 2011; Mannowetz et al., 2017; Miller et al., 2016; Strünker et al., 2011]. Se sabe también que el aumento del pH intra acrosomal ( $pH_a$ ) puede producir un incremento en el  $[Ca^{2+}]_i$  y la RA en espermatozoides de ratón y humano [Chávez et al., 2018; Nakanishi et al., 2001]. Sin embargo, la relevancia de la alcalinización acrosomal durante el proceso de exocitosis inducido en condiciones naturales no está establecida por completo.

Por otro lado, estudios en poblaciones indican que solamente una fracción de espermatozoides capacitados es capaz de presentar RA, ya sea de forma espontánea o inducida con Pg. En muestras de espermatozoides de humano y ratón, aproximadamente 15-20 % de las células realizan la RA de forma espontánea [Nakanishi et al., 2001], mientras que solamente 20-30 % de ellas presentan RA inducida por Pg [Stival et al., 2016]. Aunque este hecho sugiere que la heterogeneidad fisiológica juega un papel importante en determinar la proporción de espermatozoides capaces de realizar la RA, espontánea o inducida por Pg, esta heterogeneidad no se ha estudiado. Además, la RA se desarrolla progresivamente en el tiempo [Sánchez-Cárdenas et al., 2014], lo que implica que en un momento determinado, el estado fisiológico de los espermatozoides es heterogéneo. Esta hipótesis está fundamentada en reportes de la literatura que muestran amplios rangos no uniformes de valores para las concentraciones de diferentes componentes intracelulares en poblaciones de espermatozoides de diferentes especies [Balbach et al., 2020; Luque et al., 2018; Molina et al., 2020].

En este trabajo, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Determinar cuál es el papel de cambios en el  $pH_a$  durante la RA espontánea e inducida por Pg.
- Establecer la relevancia de la heterogeneidad fisiológica en la proporción de espermatozoides capaces de realizar la RA, de forma espontánea o inducida por Pg

El estudio experimental de estos objetivos es difícil debido a diversas limitaciones, tales como el tamaño del espermatozoide, su incapacidad para sintetizar proteínas, su movilidad y la promiscuidad con la que algunos de sus canales como el CatSper responden a distintos fármacos.

En este trabajo proponemos una generalización de las Redes de Regulación Genética, propuestas por Kauffman en 1969 [Kauffman, 1969] y utilizadas en diversos sistemas [Espinal et al., 2011; Mendoza and Alvarez-Buylla, 1998, 2000; Yang et al., 2018], para construir la *red de regulación discreta de la reacción acrosomal*, un modelo matemático y computacional que representa las interacciones fisiológicas más relevantes involucradas en la RA. Este modelo puede reproducir cualitativamente muchos de los experimentos reportados en la literatura y lo utilizamos para caracterizar cómo es que la heterogeneidad fisiológica en una población de espermatozoides afecta a la proporción de células capaces de presentar RA espontánea e inducida por Pg.

Nuestro modelo también corrobora que la alcalinización acrosomal puede disparar la

RA por si misma en una fracción de la población de espermatozoides y sugiere que es importante para la RA inducida por Pg en otra fracción de la población.

Adicionalmente, nuestro estudio reveló que las vías de señalización de la RA operan muy cerca del punto crítico, un régimen dinámico particular en donde la robustez ante perturbaciones y la adaptabilidad coexisten al mismo tiempo.

En conjunto, nuestros resultados indican que la heterogeneidad fisiológica está estrechamente relacionada con la proporción de espermatozoides que reaccionan y que el incremento de  $\text{pH}_a$  es esencial durante el proceso de RA.

Esta tesis está organizada en cuatro capítulos principales. El primero contiene una descripción de los antecedentes biológicos, matemáticos y computacionales necesarios para desarrollar la red de regulación de la reacción acrosomal. Específicamente, este capítulo contiene una introducción a la fenomenología de la RA, su importancia para la fecundación y los procesos fisiológicos conocidos que la integran. Este conocimiento servirá como base para construir las interacciones y funciones de regulación que conforman la red de regulación de la RA. Además, este capítulo provee una descripción de las redes de regulación genética propuestas por Kauffman así como su importancia en el estudio de diversos sistemas biológicos.

El segundo capítulo se enfoca en abordar la implementación de la red de reacción acrosomal del espermatozoide humano. Esto incluye las hipótesis que tomamos para su construcción y los lineamientos generales que utilizamos para definir los nodos, interacciones y la lógica de regulación entre ellos.

En el tercer capítulo presentamos los resultados obtenidos del análisis de la red. Calculamos y caracterizamos los comportamientos estables de este sistema (atractores), corroboramos nuestro modelo comparando su comportamiento con resultados experimentales reportados en la literatura, caracterizamos la variabilidad fisiológica existente en los diversos atractores, analizamos la capacidad de la red para realizar la RA ante perturbaciones del  $\text{pH}_a$  y estudiamos el régimen dinámico del modelo.

El cuarto y último capítulo de esta tesis presenta sus conclusiones, en donde también discutimos los resultados obtenidos en el tercer capítulo y proporcionamos perspectivas de trabajo futuro para expandir este trabajo.



# Capítulo 1

## Antecedentes

### 1.1. La capacitación

En el proceso de fecundación en los mamíferos, los espermatozoides recién eyaculados y depositados en el tracto genital femenino son inmóviles, carecen de la capacidad de fecundar al ovocito y deben atravesar por un proceso de maduración, conocido como capacitación, que les confiere la motilidad y la competencia para fecundar [Austin, 1951, 1952; Chang, 1951]. Uno de los efectos visibles de este proceso es un cambio en el batido flagelar. Los espermatozoides recién eyaculados muestran un patrón de batido simétrico, de alta frecuencia y baja amplitud. Durante la capacitación el batido del flagelo se vuelve asimétrico, disminuyendo la frecuencia y aumentando la amplitud. Estos cambios, llamados en conjunto hiperactivación, confieren al espermatozoide la capacidad para nadar en medios de alta viscosidad, tales como el oviducto [Suarez, 2008].

La capacitación es un proceso complejo que involucra remodelamiento de la membrana plasmática, remoción de colesterol, extensos cambios en los patrones de fosforilación de proteínas e incrementos en  $pH_i$  y  $[Ca^{2+}]_i$  [Bianchi and Wright, 2016], así como hiperpolarización de la membrana plasmática [Chávez et al., 2013; De La Vega-Beltrán et al., 2012; Stival et al., 2016]. Solamente una sub-población de espermatozoides (20-40 %) tiene la capacidad de capacitarse y no son claros los 6 mecanismos moleculares involucrados en esta capacitación selectiva”, ni en los cambios celulares antes mencionados.

Además de ser indispensable para la motilidad del espermatozoide, la capacitación es una precondition necesaria para la RA natural en el espermatozoide de mamífero.

### 1.2. La reacción acrosomal

El acrosoma es una vesícula ácida, derivada del Golgi, que se encuentra en la parte apical de la cabeza del espermatozoide de diversas especies, incluidos los mamíferos (Figura 1.1), y contiene  $Ca^{2+}$  y enzimas hidrolíticas, principalmente acrosina e hidrolasas que se liberan al medio extracelular por medio de fusión vesicular en un evento de exocitosis único del espermatozoide conocido como la reacción acrosomal (RA) [Dan, 1952, 1954;



[Darszon et al., 2011]. Este evento ocurre una sola vez en la vida del espermatozoide y es fundamental para la fecundación. En este trabajo, nos referimos de forma diferente a dos secciones de la membrana que contiene al lumen acrosomal: la membrana acrosomal interna (MAI) próxima al núcleo y la membrana acrosomal externa (MAE), próxima a la membrana plasmática del espermatozoide (MP). La Figura 1.3 muestra un esquema de la distribución de estos elementos dentro de la célula.

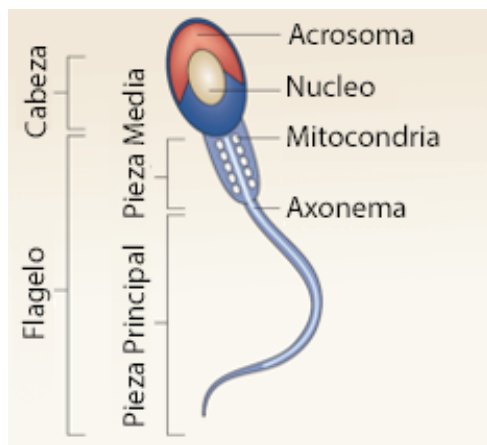


Figura 1.1: Esquema morfológico del espermatozoide de mamífero. En la parte apical de la cabeza se encuentra el acrosoma, una vesícula ácida derivada del Golgi que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  y enzimas hidrolíticas que se liberan al medio extracelular por exocitosis. Figura obtenida y traducida de [Eisenbach and Giojalas, 2006]

Aunque no se conoce dónde se inicia la RA en varias especies de mamífero, esta se da durante el trayecto en el tracto genital femenino, después de la capacitación y está asociada con los eventos siguientes [Darszon et al., 2011; del Río et al., 2007; Mayorga et al., 2007; Sosa et al., 2014]:

1. La concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumenta, debido a la actividad de receptores de  $\text{IP}_3$  que liberan  $\text{Ca}^{2+}$  del acrosoma, así como por actividad de diversos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática.
2. El incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  estimula la producción de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) e inositol 3-fosfato ( $\text{IP}_3$ ) y activa fosfodiesterasas (PDE) y sinaptotagmina (Synap).
3. El acrosoma aumenta su volumen y la MAE se deforma (Figura 1.2 F-G).
4. Esta deformación produce puntos de contacto entre la MAE y la MP que después se convierten en poros (Figura 1.2 H) producidos por actividad de proteínas SNARE.
5. Los poros aumentan su tamaño y se forman vesículas híbridas constituidas por la MAE y por la MP (Figuras 1.2-I y 1.3-II).
6. Como consecuencia de la vesiculación, el contenido acrosomal se expone al medio extracelular generando así exocitosis. Por otra parte, la pérdida de la MAE, la MP y la matriz acrosomal permiten que la ahora ex-membrana acrosomal interna también quede expuesta al medio extracelular, convirtiéndose en la nueva membrana plasmática del espermatozoide (Figura 1.3) [del Río et al., 2007; Sosa et al., 2016].

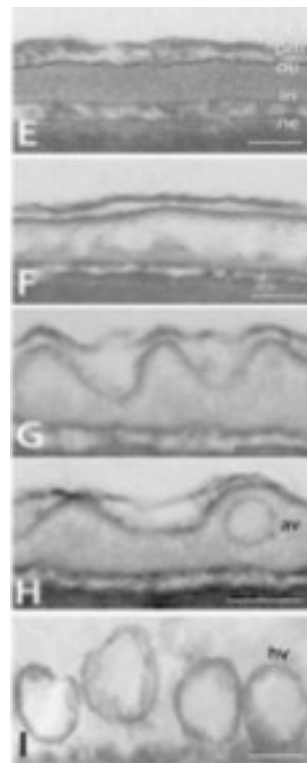


Figura 1.2: . Micrografía electrónica que muestra las diferentes etapas de la reacción acrosomal: El acrosoma aumenta su volumen y la membrana acrosomal interna se aproxima a la membrana plasmática (E-F). La membrana acrosomal externa se deforma (G). La deformación crea puntos de fusión entre ambas membranas (H). Los puntos de fusión se expanden y forman vesículas híbridas conformadas por la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática (I). Figura obtenida de [Sosa et al., 2014](#)

De esta forma, la reacción acrosomal es un evento "todo o nada" donde una sola vesícula se fusiona en varios puntos con la membrana plasmática y no existe reciclamiento de proteínas de fusión o de elementos de la membrana, tal como sucede en otros esquemas de exocitosis [Darszon et al., 2011](#); [Mayorga et al., 2007](#).

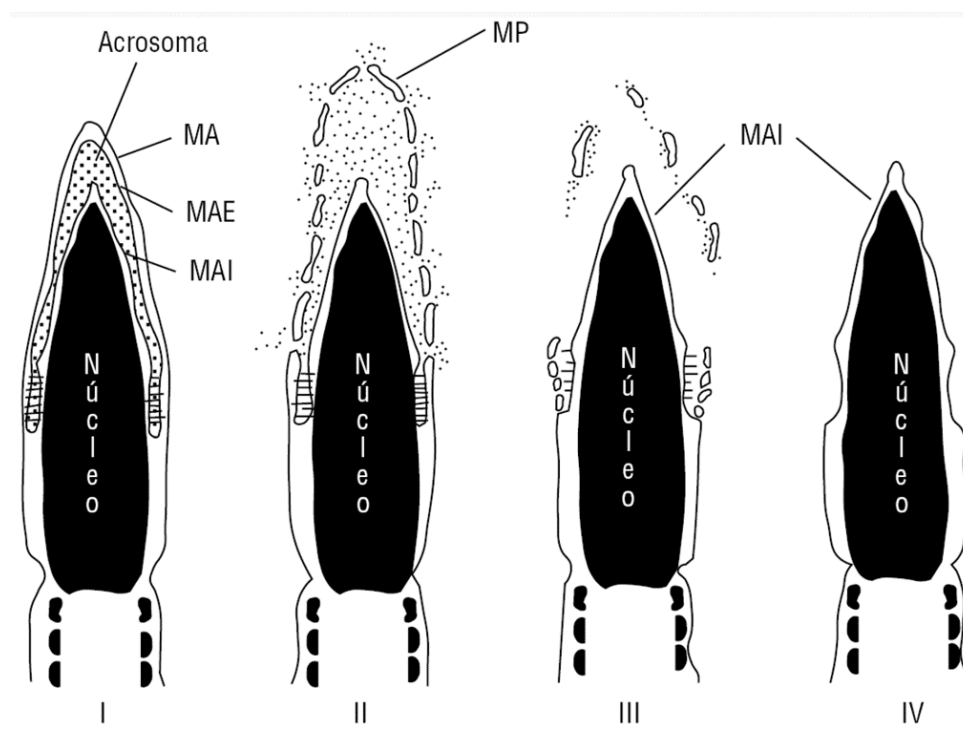


Figura 1.3: Cambios morfológicos del espermatozoide en la reacción acrosomal. La vesiculación del acrosoma y la membrana plasmática libera el contenido del acrosoma que se difunde en el medio extracelular, generando así exocitosis. Además, la pérdida del acrosoma también expone la membrana acrosomal interna, la cual se convierte en la nueva membrana plasmática a partir del segmento ecuatorial. Figura obtenida de [del Río et al., 2007](#)

La visión clásica de este proceso propone que las enzimas de la matriz acrosomal liberadas al medio extracelular facilitan el paso del espermatozoide a través de la zona pelúcida (ZP), una capa de glicoproteínas que rodea al ovocito y que los espermatozoides deben penetrar para poder fecundarlo [Darszon et al., 2011](#); [Florman and Ducibella, 2006](#); [Wassarman and Litscher, 2009](#). Sin embargo, hay evidencia de que son aquellos espermatozoides carentes de acrosoma, los que tienen capacidad para penetrar la zona pelúcida y realizar la fusión con el ovocito [Bianchi and Wright, 2016](#); [Inoue et al., 2011](#); [Jin et al., 2011](#); [Kuzan et al., 1984](#). Este descubrimiento generó una nueva hipótesis: la reacción acrosomal ayuda a remodelar y reorganizar la membrana plasmática del espermatozoide, exponiendo al medio extracelular proteínas que antes estaban ocultas en la MAI y que se relacionan con el reconocimiento y acoplamiento con la zona pelúcida, así como con el acoplamiento y fusión con la membrana plasmática del ovocito (Figura [1.4](#)) [Bianchi and Wright, 2016](#). Los mecanismos que operan y regulan la RA no se conocen completamente por lo que debe seguirse investigando a fondo. Sin embargo, la importancia de este proceso es clara, los espermatozoides incapaces de hacer la RA son infértiles [Balestrini et al., 2015](#).

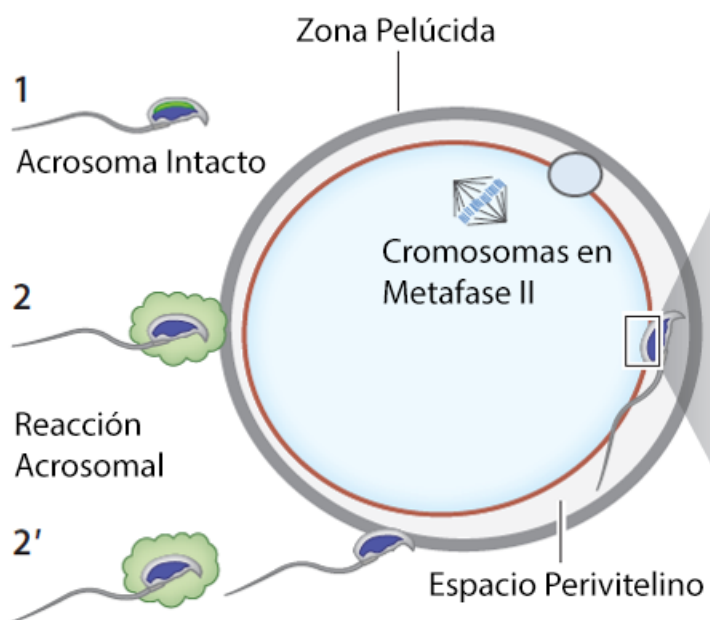


Figura 1.4: La zona pelúcida (ZP) es una capa de glicoproteínas que envuelve al ovocito. En el esquema clásico se plantea que el evento fisiológico que dispara la RA es el contacto con la ZP y la exocitosis de enzimas ayuda a digerir esta capa, facilitando la penetración del espermatozoide hacia el espacio perivitelino (2). Evidencia más reciente propone que la RA ocurre antes del contacto (2') y expone nuevas proteínas en la membrana plasmática del espermatozoide, capaces de interactuar con la ZP y la membrana del ovocito. Actualmente es tema de debate quién induce, dónde inicia y cuál es la función de la RA. Figura obtenida y traducida de [Bianchi and Wright, 2016](#)

### 1.2.1. Inductores de la RA

La lista de elementos extracelulares e intracelulares capaces de inducir la RA es muy extensa. En este trabajo solamente nos enfocamos en algunos de los principales, específicamente la Pg.

Mencionamos anteriormente que la capacitación es un proceso de maduración que involucra diversos cambios bioquímicos y biofísicos en el espermatozoide, cuya función es preparar la maquinaria molecular para desarrollar funciones específicas, tales como la RA. Sin embargo, una vez que los espermatozoides están capacitados, diversos estímulos pueden producir esta reacción de exocitosis.

Durante años, se pensó que el estímulo físico que dispara la reacción acrosomal es el contacto con ZP3, una glicoproteína específica de la zona pelúcida [Mayorga et al., 2007](#); [Shur et al., 2006](#); [Snell and White, 1996](#). Sin embargo, otros trabajos sugieren que existen estímulos diferentes capaces de inducir exocitosis, por ejemplo la Pg, una hormona presente en las proximidades del ovocito [Sánchez-Cárdenas et al., 2014](#); [Schuffner et al., 2002](#). Progesterona y ZP3 producen un aumento en las concentraciones de  $([Ca^{2+}]_i)$ , lo cual es consistente con el uso frecuente de ionóforos de calcio como inductores de exocitosis

acrosomal. Se piensa que un aumento en los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  se relaciona con varios eventos, por ejemplo: activación de fosfolipasa C (PLC) que produce inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), activación de canales de calcio en la MAE, aumento en la producción de cAMP a través de adenilato ciclasa soluble (sAC) sensible a  $Ca^{2+}$  y activación de sinaptotagmina [Darszon et al., 2011; Mayorga et al., 2007].

En los humanos, la Pg promueve la RA a través de la activación de CatSper, un canal de  $Ca^{2+}$  localizado en la pieza principal del flagelo del espermatozoide [Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011]. Esta hormona, sin embargo, no promueve la activación de CatSper en el ratón [Mannowetz et al., 2017; Orta et al., 2018], aunque es capaz de promover la RA en esta especie [Murase and Roldan, 1996; Nahed et al., 2016]. Lo anterior sugiere que la Pg puede promover la RA a través de diferentes vías de señalización que todavía no se han identificado.

Existen otros ligandos celulares capaces de inducir la RA, tales como GABA [Jin et al., 2009; Meizel et al., 1997; Wistrom and Meizel, 1993], glicina [Kumar and Meizel, 2008], EGF [Daniel et al., 2010], ATP [Luria et al., 2002; Rossato et al., 2005], acetilcolina [Bray et al., 2006], esfingosina-1-fosfato [Darszon et al., 2011; Suhaiman et al., 2010], y NNC55-0396 [Chávez et al., 2018].

La diversidad en los inductores de la RA dificulta y hace necesario estudiar las señales fisiológicas en la interacción espermatozoide-ovocito que disparan este evento.

### 1.2.2. Regulación de la reacción acrosomal

A pesar de los distintos esfuerzos de diversos grupos de investigación, los eventos bioquímicos y biofísicos involucrados en RA están lejos de ser completamente entendidos. Sin embargo, a través de años de investigación, estos esfuerzos han proporcionado información sobre los actores moleculares intracelulares más relevantes, así como las interacciones entre ellos, durante el desarrollo de este complejo proceso de exocitosis. En este trabajo intentamos resumir los actores y procesos más importantes que regulan la RA. Estos se encuentran esquematizados en la Figura 1.5.

#### Regulación de $pH_i$ y $pH_a$

La regulación del  $pH_i$  en los espermatozoides se lleva a cabo principalmente por flujos de protones ( $H^+$ ) entre el medio extracelular, el citosol y las pozas internas, así como por el transporte y metabolismo del bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) [Balbach et al., 2020; Chae et al., 2017; Hidalgo et al., 2020; Lishko et al., 2010; Nakanishi et al., 2001; Nishigaki et al., 2014; Romero et al., 2013; Soriano-Úbeda et al., 2019]. En la membrana plasmática un cotransportador  $Na^+/HCO_3^-$  (NBC) permite la entrada de  $HCO_3^-$  [Nishigaki et al., 2014; Romero et al., 2013], mientras que un intercambiador  $Cl^-/HCO_3^-$  (SLC) dependiente de  $pH$  lo saca al medio extracelular. Incrementos en la concentración de  $HCO_3^-$  intracelular ( $[HCO_3^-]_i$ ) también activan Adenilato Ciclasa soluble (sAC) [Chen et al., 2000; Kleinboelting et al., 2014; Nishigaki et al., 2014; Okamura et al., 1985]. El intercambiador  $Na^+/H^+$  específico del espermatozoide (sNHE) contribuye de forma importante a la regulación del  $pH_i$  en espermatozoides de ratón [Nakanishi et al., 2001; Nishigaki et al., 2014; Wang

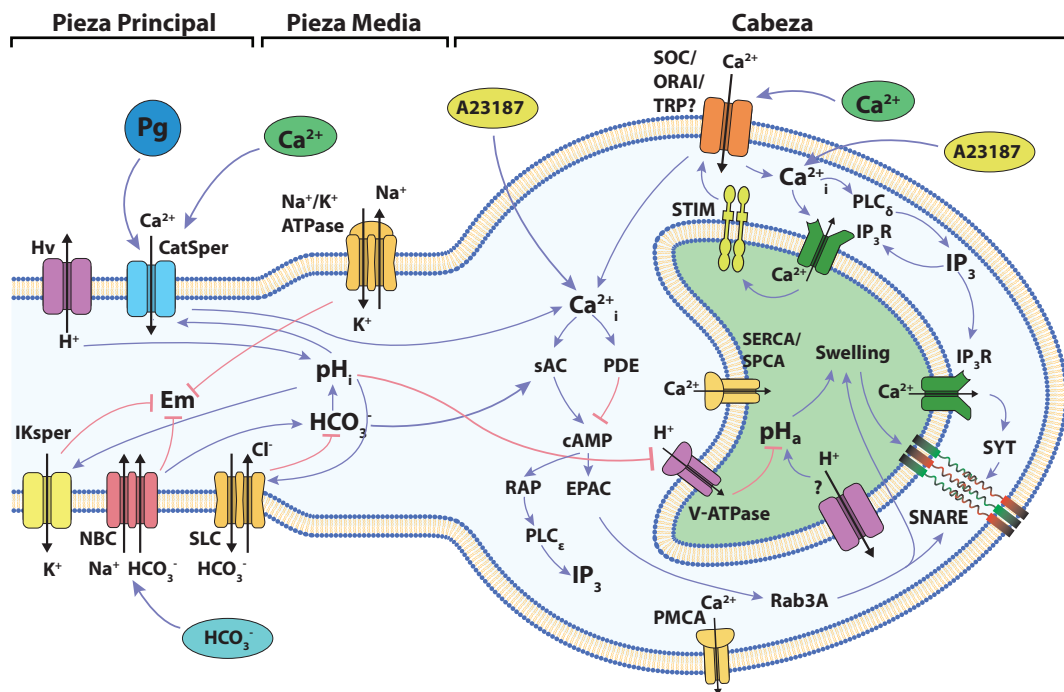


Figura 1.5: Diagrama de la red de señalización involucrada en el desarrollo de la RA en espermatozoides humanos. La caricatura muestra los principales componentes moleculares y eventos de señalización, considerados para desarrollar el modelo descrito en este trabajo. Los enlaces azules entre componentes indican interacciones positivas, mientras que los enlaces rojos indican interacciones negativas. Se indica la localización de los diferentes componentes que residen en el flagelo y la cabeza.

et al., 2007], aunque resultados recientes indican que es el intercambiador  $\text{Na}^+, \text{K}^+ / \text{H}^+$  ( $\text{NHA}_1$ ) el transportador importante para el incremento de  $\text{pH}_i$  inducido por ZP durante la RA. En el espermatozoide de humano, el canal de  $\text{H}^+$   $\text{Hv1}$ , promueve la alcalinización del citosol y parece ser el principal regulador del  $\text{pH}_i$  [Chae et al., 2017; DeCoursey, 2013; Lishko et al., 2010; Miller et al., 2018; Nishigaki et al., 2014].

En el acrosoma, el pH del espacio intra acrosomal se mantiene ácido ( $\text{pH}_a \sim 5.4$ ), principalmente por medio de una  $\text{H}^+$  V-ATPasa localizada en la membrana acrosomal [Chávez et al., 2018; Nakanishi et al., 2001; Sun-Wada et al., 2002]. A su vez, el  $\text{pH}_a$  ácido contribuye en la acidificación del citosol por medio de una corriente de fuga de  $\text{H}^+$  de la membrana acrosomal ( $\text{HLeak}_a$ ) cuyos transportadores no han sido completamente determinados [Chávez et al., 2018; Nakanishi et al., 2001]. En la literatura se propone que un intercambiador  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  somático en la membrana del acrosoma podría participar en este flujo [Nakamura et al., 2005; Oberheide et al., 2017], sin embargo su existencia todavía no está establecida. Durante la capacitación el  $\text{pH}_a$  aumenta y esto incrementa la RA producida de forma espontánea [Nakanishi et al., 2001]. Debido a ello, se propuso que un incremento de  $\text{pH}_a$  durante la capacitación puede ser un requerimiento para preparar al espermatozoide para la RA. En este sentido, bases débiles permeables capaces de alcalinizar el acrosoma también son capaces de liberar  $\text{Ca}^{2+}$  de compartimentos ácidos incluyendo el acrosoma, incrementar  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e inducir la RA [Chávez et al., 2018]. Además, se propuso que la alcalinización

acrosomal también está involucrada en el hinchamiento del acrosoma y la deformación de la membrana acrosomal externa (OAM) durante la RA, a través de la activación de enzimas proteolíticas dependientes de  $\text{pH}_a$ , que desestabilizan y disgregan la matriz acrosomal [Chávez et al., 2018; Guyonnet et al., 2014].

### Regulación del potencial de membrana ( $E_m$ )

Existe evidencia de que la hiperpolarización de la membrana plasmática es importante para la capacitación, y por tanto, necesaria para que ocurra la RA [Molina et al., 2020]. Además, la despolarización de la membrana en espermatozoides capacitados puede modular este evento de exocitosis [Darszon et al., 2011; De La Vega-Beltrán et al., 2012]. Estos eventos sugieren la existencia de una regulación fina del  $E_m$  durante la capacitación y la RA. El  $E_m$  regula y es regulado por diferentes transportadores iónicos. La despolarización de la membrana activa canales dependientes de voltaje, como los clásicos  $\text{Ca}_v$ s [Darszon et al., 1999; Zhang and Gopalakrishnan, 2005], un tema controvertido, CatSper [Chávez et al., 2014], canales de  $\text{K}^+$  (IKsper) [Chávez et al., 2014; Zhang et al., 2006] y Hv1 [Chae et al., 2017; Lishko et al., 2010]. El  $E_m$  también tiene influencia en la actividad de sNHE (en espermatozoides de ratón), que es activado por hiperpolarización y participa en la alcalinización del espermatozoide [Chávez et al., 2014]. Flujos catiónicos inducidos por IKsper y Hv1 promueven hiperpolarización, así como la entrada de  $\text{HCO}_3^-$  por activación de NBC. Finalmente, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por activación de CatSper (posiblemente también por  $\text{Ca}_v$ s) y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por depósitos (SOCs), además de incrementar  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , despolariza el  $E_m$  [Correia et al., 2015; Darszon et al., 2011; Sosa et al., 2016].

### Regulación de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico y acrosomal

Está establecido que elevaciones orquestadas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  son cruciales para la RA. En la cabeza del espermatozoide, después de la inducción de la RA,  $\text{Ca}^{2+}$  entra al citosol principalmente a través de canales SOC en la MP (evidencia indirecta [Sosa et al., 2016]). También ocurre liberación de inositol 3-fosfato ( $\text{IP}_3$ ) causada por fosfolipasa C delta 4 ( $\text{PLC}_\delta$ ) que activa receptores de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) en la MAE [Darszon et al., 2011; Fukami et al., 2001, 2003; Mayorga et al., 2007; Sosa et al., 2016; Tomes, 2015]. Estos últimos son canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , dependientes de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e  $\text{IP}_3$ , con un sitio de unión para  $\text{IP}_3$  y dos sitios de unión para  $\text{Ca}^{2+}$  de baja y alta afinidad que promueven la apertura o inactivación del canal, respectivamente [Belmonte et al., 2016; Bezprozvanny et al., 1991; Foskett et al., 2007; Schmeitz et al., 2013]. En presencia de  $\text{IP}_3$ , un incremento moderado en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  resulta en la apertura de los  $\text{IP}_3\text{R}$ , mientras que altas concentraciones de este catión bloquean el canal. La activación de los  $\text{IP}_3\text{R}$  libera  $\text{Ca}^{2+}$  del acrosoma. Este evento es detectado por moléculas de interacción con el estroma (STIM) en la MAE [Darszon et al., 2011; Sosa et al., 2014], que a su vez se reorganizan y activan canales SOC en la MP [Lefèvre et al., 2012; Sosa et al., 2016]. En el flagelo, CatSper incrementa la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [Kirichok et al., 2006; Lishko et al., 2012]. Dos tipos diferentes de ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  ayudan a controlar la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  promovida por los canales SOC e  $\text{IP}_3\text{R}$ . La ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (PMCA), transporta  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular [Da Costa et al., 2016; Schuh et al., 2004] y una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  en el acrosoma (ACA) contribuye en mantener los altos niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_a$  en este organelo, necesarios durante las etapas finales de la RA. Existe debate sobre cuál es el tipo de ATPasa que moviliza  $\text{Ca}^{2+}$

hacia el acrosoma. La bomba ATPasa tipo 1 de la vía secretora (SPCA1) se expresa en espermatozoides humanos, aunque parece estar localizada principalmente en la región del cuello [Harper et al., 2005]. Además, un estudio diferente muestra que la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo 2 del retículo sarco/endoplásmico (SERCA2) se expresa en la región del acrosoma y la pieza media [Lawson et al., 2007]. Se debe investigar más a fondo la contribución y presencia de estas dos formas de ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  en la RA.

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un modulador de diferentes vías de señalización: participa en la activación de PLC que produce diacilglicerol (DAG) e  $\text{IP}_3$  [Darszon et al., 2011; Nahed et al., 2016], en la activación de AC que incrementa la concentración de cAMP, en la activación de PDE que producen el efecto opuesto a la AC [Jungnickel et al., 2007; Sosa et al., 2016] y en la activación de sinaptotagmina (SYT) [Hutt et al., 2005], un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  importante en las etapas finales de la fusión entre membrana [Mayorga et al., 2007].

### Fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática

Los eventos que intervienen en la fusión entre la MAE y la MP durante la RA no están completamente caracterizados. Sin embargo, diversos elementos involucrados en otros procesos de exocitosis también están presentes en el espermatozoide de mamífero, tales como proteínas Rab3A asociadas a Ras [Iida et al., 1999; Ward et al., 1999; Yunes et al., 2000], factor sensible a la N-etilmaleimida (NSF) [Michaut et al., 2000; Ramalho-Santos and Schatten, 2004], proteínas  $\alpha$  de fijación soluble de NSF ( $\alpha$ SNAP) [Tomes et al., 2005], miembros de la familia de receptores de SNAP (SNARE's) [Ramalho-Santos et al., 2000; Schulz et al., 1998; Tomes et al., 2002], proteínas asociadas a SNARE's como la complexina [Redecker et al., 2003; Zhao et al., 2007], proteínas reguladas por  $\text{Ca}^{2+}$  como sinaptotagmina (SYT) [Hutt et al., 2005, 2002; Ramalho-Santos et al., 2000] y calmodulina [Trejo and Mújica, 1990], así como proteínas relacionadas al transporte vesicular tales como la dinamina [Mayorga et al., 2007; Zhao et al., 2007].

El grupo de Mayorga propone un modelo [Mayorga et al., 2007], basado en múltiples reportes de la literatura, para describir los eventos fisiológicos específicos involucrados en la fusión de membranas durante la RA en espermatozoides de ratón. Este modelo también es consistente con observaciones experimentales en espermatozoides humanos y lo tomamos como una hipótesis inicial para este trabajo de tesis. El modelo considera que en etapas tempranas de la fusión, SYT está inactiva y hay complejos *cis*-SNARE inactivos, ensamblados entre la MAE y la MP, que mantienen a la RA en pausa hasta que otros eventos la disparan. Más tarde, los canales  $\text{IP}_3\text{R}$  se abren y liberan  $[\text{Ca}^{2+}]_a$  del acrosoma, lo que promueve apertura de canales SOC e incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Estos eventos estimulan la actividad de adenilato ciclasas solubles y/o transmembranales, incrementando los niveles de cAMP [Baxendale and Fraser, 2003; Branham et al., 2006; Steegborn, 2014]. Hay evidencia de que este incremento promueve deformación de la MAE e hinchamiento del acrosoma, posiblemente activando Rab3A a través de proteínas de intercambio directamente estimuladas por cAMP (EPAC) [Mayorga et al., 2007; Yudin et al., 1988]. Los eventos que conectan  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  con cAMP, EPAC y Rab3A no son claros, pero en la literatura se propone que después de la activación de Rab3A, NSF y  $\alpha$ SNAP, los complejos *cis*-SNARE se desensamblan y reorganizan en complejos *trans*-SNARE [Blas et al., 2005]. En este punto, la SYT se desfosforila y la fusión queda en pausa hasta que  $\text{Ca}^{2+}$  se libera



desde el acrosoma para activarla. Este modelo considera que el  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol es inaccesible al pequeño espacio existente entre la MAE y la MP en los estados finales de la RA y que se requiere de actividad de los  $\text{IP}_3\text{Rs}$  para proveer la concentración necesaria de  $\text{Ca}^{2+}$  que active SYT, quien a su vez activará a las SNAREs, finalmente permitiendo la fusión entre membranas.

### 1.3. Redes de regulación bioquímica

En esta sección abordamos de forma general y abstracta los conceptos e ideas principales de las redes de regulación bioquímica, sus fundamentos y el estudio de sus estados dinámicos. Retomamos estos conceptos en los capítulo 2 y 3 de esta tesis para desarrollar y analizar la red de regulación de la RA.

En las últimas décadas, la bioquímica y la biología molecular han identificado complejos patrones de interacción entre moléculas intracelulares y extracelulares en diversos sistemas. Generalmente, estas biomoléculas forman redes de interacción involucradas en la señalización celular durante diferentes procesos. En la actualidad, diversas técnicas experimentales novedosas son capaces de identificar componentes de estas redes para determinar sus actividades bioquímicas. Sin embargo, entender el comportamiento de la red como un sistema completo continúa siendo una tarea complicada, los procedimientos experimentales son costosos en tiempo y recursos y, en muchas ocasiones, es difícil estudiar a detalle los efectos de estímulos dentro y fuera de las células. Por ello, frecuentemente se utilizan herramientas matemáticas y computacionales que facilitan la interpretación de datos y en general, ayudan a entender el comportamiento de sistemas biológicos [Morris et al., 2010].

En 1969, Stuart Kauffman propuso un modelo formal de interacción y regulación entre genes para describir patrones de expresión genética que regulan la diferenciación celular [Kauffman, 1969]. La interacción entre genes conforma una red genética cuyo estado está descrito por un conjunto de  $N$  variables discretas  $x_1, x_2, \dots, x_N$ , cada una representando el estado de un solo gen. Típicamente, cada variable  $x_i$  es booleana y toma el valor 1 si el gen está expresado o 0 si no lo está, aunque puede haber variables con más de dos valores discretos.

El estado de expresión de cada gen  $x_i$  está determinado por el estado de otros genes denominados "reguladores" de  $x_i$ . De esta forma, el estado de  $x_i$  puede expresarse a través de una función de regulación  $F_i$  que depende del estado de los reguladores de  $x_i$ . Así, cada variable actualiza su estado en pasos discretos de tiempo conforme a la siguiente regla dinámica:

$$x_i(t+1) = F_i(x_{i1}(t), x_{i2}(t), \dots, x_{ik}(t)) \quad (1.1)$$

Donde  $x_{i1}, \dots, x_{ik}$  son los reguladores de  $x_i$ . En general la construcción de las funciones de regulación  $F_i$  requieren de un trabajo artesanal complicado que involucra la información existente en la literatura y la experiencia propia del diseñador. Comúnmente,  $F_i$  se construye utilizando tablas de verdad o funciones lógicas que asignan un valor a  $x_i$  por

cada combinación posible de sus reguladores [Kauffman, 1969].

La aplicación de la función de regulación  $F_i$  puede darse de acuerdo a dos esquemas principales. En el más simple, dado un estado inicial de la red, todas las variables  $x_i$  se actualizan de forma simultánea (*actualización síncrona*). Esta aproximación es fácil de implementar y computacionalmente eficiente, aunque puede dar lugar a artefactos dinámicos, tales como ciclos espurios. Por otro lado, las transiciones entre un estado y otro pueden darse a través de *actualización asíncrona*, es decir, una sola variable (nodo) cambia su estado en cada paso de tiempo. Este esquema requiere la implementación de reglas dinámicas adicionales, por ejemplo, especificar tiempos de retraso, prioridades o sub-grupos de actualización síncrona [Faure et al., 2006]. Estas reglas son, en general, difíciles de implementar, son sensibles al contexto particular de cada problema y requieren la especificación de parámetros que típicamente no se conocen. Debido a ello, en este trabajo de tesis abordamos la aproximación más simple: actualización síncrona.

Los primeros modelos de regulación de este tipo hacían suposiciones irreales biológicamente y los experimentalistas ignoraron estos modelos [Aldana and Cluzel, 2003; Espinosa-Soto et al., 2004]. Sin embargo, en la actualidad existen descripciones genéticas relativamente completas de varios sistemas, que permiten el desarrollo de modelos de regulación genética realistas en la diferenciación celular [Abou-Jaoudé et al., 2015; Espinosa-Soto et al., 2004; Hasty et al., 2002; Mendoza et al., 1999].

Diversos trabajos han extendido este modelo de red de regulación genética para desarrollar redes de regulación bioquímica en diversos sistemas [Albert and Othmer, 2003; Espinal et al., 2011; Espinal-Enríquez et al., 2017; Espinosa-Soto et al., 2004; Faure et al., 2006; Huang and Ingber, 2000; Huang et al., 2005; Li et al., 2004; Mendoza and Alvarez-Buylla, 1998, 2000; Mjolsness et al., 1991; Morris et al., 2010; Salazar-Ciudad and Jernvall, 2002; Von Dassow et al., 2000], donde los nodos de la red representan biomoléculas presentes dentro o fuera de las células, el estado de cada nodo representa la activación o inhibición, aumento o decremento, presencia o ausencia de dichas biomoléculas y la regulación entre nodos se lleva a cabo por medio de interacciones activadoras o inhibidoras entre ellos.

El uso de estos modelos presenta buenos resultados en la descripción de diversos sistemas biológicos y en este trabajo utilizamos una red de regulación bioquímica para estudiar algunos aspectos de la RA en espermatozoides de mamífero, la cual considera las interacciones entre algunos de los componentes bioquímicos más importantes que intervienen en este proceso excitotico.

### 1.3.1. Atractores

El *estado* de la red  $X(t)$  al tiempo  $t$ , se define como el valor que cada variable (nodo)  $x_i$  toma al tiempo  $t$ . Es decir,  $X(t) = x_1(t), x_2(t), \dots, x_N(t)$ . Debido a la naturaleza síncrona del modelo utilizado en este trabajo de tesis, dado cualquier estado inicial de la red  $X(0)$ , la aplicación determinista y sucesiva de la ecuación [1.1] para obtener estados sucesores de  $X(0)$  lleva a la red a través de una serie de cambios que terminan en un subconjunto de estados que se repiten periódicamente, llamado *atractor*, que puede ser potencialmente un punto

fijo (si el estado de la red no cambia en el tiempo), o un *atractor cíclico*, si un conjunto de al menos dos estados de la red se visitan de forma periódica [Abou-Jaoudé et al., 2015; Espinal et al., 2011; Faure et al., 2006].

Formalmente, sea  $X(0)$  un estado inicial de la red y sea  $F(X(t))$  la aplicación de la ecuación 1.1 a todos los nodos de la red, tal que  $X(t+1) = F(X(t))$ . La aplicación sucesiva de  $F$  a los estados sucesores de  $X(0)$  genera la secuencia de estados  $X(0), X(1), \dots, X(k), X(k+1), \dots, X(m)$ , con  $0 \leq k \leq m$ . Dado que el número de posibles estados de la red es finito ( $2^N$  para una red que se compone de  $N$  nodos binarios), la dinámica de la ecuación 1.1 lleva a la red a visitar un estado ya visitado anteriormente. Esto es, la aplicación de  $F$  al estado  $X(m)$  conduce al estado  $X(k)$  ya visitado. Es decir,  $X(m+1) = F(X(m)) = X(k)$ . Dado el determinismo del operador  $F$  que se sigue del determinismo de cada función  $F_i$ , la red solamente puede transitar entre los estados de la secuencia  $X(k), \dots, X(m)$ , que se repite infinitas veces. A esta secuencia se le conoce como *atractor*.

Una red de regulación puede tener diversos atractores asociados, cada uno de ellos con su propia secuencia de estados. Dado un atractor  $A_i$ , *la cuenca de atracción* de  $A_i$  se define como el conjunto de todos los estados que bajo la dinámica terminan dentro del atractor  $A_i$ . Dada la naturaleza determinista de la dinámica, un estado solamente puede pertenecer a una cuenca de atracción. Esto significa que el estado inicial de la red determina completamente el atractor al que la red llegará eventualmente. Los estados, atractores, cuencas de atracción y transiciones entre estados pueden representarse por medio de una *gráfica de transición de estados*. En esta gráfica, cada nodo representa un estado de la red y las aristas dirigidas conectando dos estados denotan la transición entre un estado y otro en un paso de tiempo. Como ejemplo, la Figura 1.6 muestra una pequeña parte de la gráfica de transición de estados para un atractor de la red de RA que desarrollamos y cuya especificación se detalla más adelante en este trabajo.

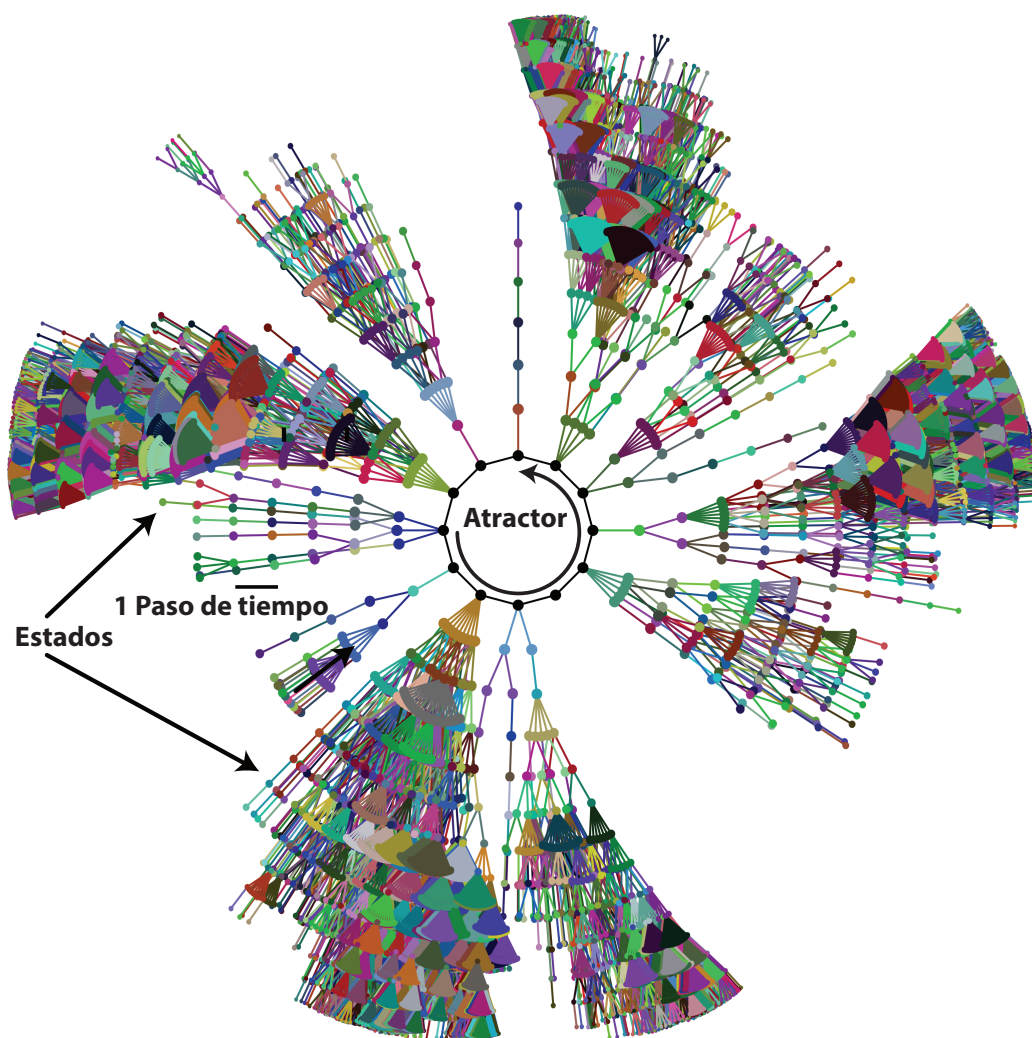


Figura 1.6: Fracción de una cuenca de atracción de la red de RA. Los estados de la red están representados por vértices y las aristas entre vértices representan una transición entre estados en un paso de tiempo. Eventualmente, la red alcanza el atractor, representado por el conjunto de vértices negros al centro de la gráfica, conectados con líneas negras. Por claridad, solamente se muestran los estados que se encuentran a trece pasos de tiempo o menos del atractor.

Atractores diferentes pueden representar comportamientos estables distintos del sistema. En el caso de las redes de regulación genética, los atractores representan patrones de actividad genética que producen diferentes fenotipos [Abou-Jaoudé et al., 2015; Mendoza and Alvarez-Buylla, 1998, 2000]. En redes metabólicas, los atractores representan estados funcionales estables de una célula [Espinal et al., 2011]. Generalmente, los atractores de punto fijo se consideran como estados inamovibles del sistema en los que ninguna de las variables involucradas cambia su estado. Los atractores cíclicos representan oscilaciones estables o condiciones de mantenimiento de un determinado fenómeno. En este tipo de atractores pueden existir variables que cambian su valor de forma cíclica mientras que otras permanecen en un valor fijo.

En este trabajo nos enfocamos en las redes de regulación que poseen nodos que funcionan como *componentes de entrada*. Estos nodos representan señales externas que se propagan en la red a través de vías de señalización entrelazadas. Diferentes combinaciones de los valores de los nodos de entrada representan distintas señales que definen un subconjunto específico del espacio de estados en donde la dinámica de la red y sus atractores se encuentran confinados. Es decir, diferentes valores de los nodos de entrada pueden llevar a la red a atractores diferentes. Es de particular importancia determinar cómo es que los cambios en los nodos de entrada modifican los atractores a los que la red puede llegar, pues esto está directamente relacionado con la influencia que tienen las variables externas en los estados funcionales que puede alcanzar el sistema biológico representado por la red. Por ejemplo, los cambios del medio externo intervienen en la diferenciación celular para determinar el fenotipo final de las células en diversas especies [Huang et al., 2005; Thieffry, 2007; Álvarez-Buylla et al., 2008].

### 1.3.2. Régimen dinámico y mapeo de Derrida

La dinámica de la red, descrita por la ecuación [1.1] lleva a las redes de regulación discretas a uno de tres posibles regímenes dinámicos: ordenado, crítico o caótico [Aldana et al., 2003; Derrida and Pomeau, 1986]. Estos regímenes se caracterizan por la forma en la que se propagan pequeñas perturbaciones en los estados iniciales de la red, y por el efecto de esas perturbaciones en el estado dinámico del sistema.

Redes que operan en diferentes regímenes muestran propiedades dinámicas distintas. Particularmente, las redes que operan cerca del régimen crítico muestran un compromiso entre la robustez y adaptabilidad que les permite resistir a perturbaciones, pero al mismo tiempo, les da la capacidad de adaptarse, por ejemplo, para reaccionar a estímulos de condiciones externas. Es sabido que la coexistencia de robustez y adaptabilidad son dos grandes características que con frecuencia se pueden encontrarse en un rango muy amplio de sistemas vivos, desde redes de regulación hasta organización de sociedades [Aldana et al., 2007; Daniels et al., 2018; Espinal et al., 2011; Kauffman, 1969; Kinouchi and Copelli, 2006].

En este trabajo utilizamos el mapeo de Derrida para poder analizar el régimen dinámico de una red de regulación discreta. Dados dos estados iniciales de la red  $X_i(t)$ ,  $X_j(t)$ , definimos  $\delta(X_i(t), X_j(t))$  como la distancia de Hamming entre  $X_i(t)$  y  $X_j(t)$ , es decir, el número de nodos en la red que toman un valor diferente entre  $X_i(t)$  y  $X_j(t)$ . Esta distancia puede interpretarse como el tamaño de una perturbación entre dos estados. Bajo la dinámica de la ecuación [1.1],  $X_i(t)$  y  $X_j(t)$  se actualizan para producir dos nuevos estados  $\tilde{X}_i(t+1)$ ,  $\tilde{X}_j(t+1)$  en un paso de tiempo. Sea  $F$  dicha transición, en general tenemos

$$\tilde{X}_i(t+1) = F(X_i(t)) \quad (1.2)$$

Por aplicaciones sucesivas de la ecuación [1.1] tenemos

$$\tilde{X}_i(t+k) = F^k(X_i(t)) \quad (1.3)$$

Definimos  $H(t)$  como el valor promedio de la distancia de Hamming entre pares de estados seleccionados aleatoriamente  $X_{i1}(t), X_{i2}(t)$ . De esta forma, tenemos

$$\begin{aligned} H(t+k) &= \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \delta \left( \tilde{X}_{i1}(t+k), \tilde{X}_{i2}(t+k) \right) \\ &= \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \delta \left( F^k(X_{i1}(t)), F^k(X_{i2}(t)) \right) \end{aligned} \quad (1.4)$$

El valor de  $H(t)$  es una medida del tamaño promedio de una perturbación generada por las diferencias entre los estados  $X_{i1}(t), X_{i2}(t)$ . En el régimen ordenado las perturbaciones desaparecen ( $H(t) \rightarrow 0$  cuando  $t \rightarrow \infty$ ) y se dice que la red es insensible a perturbaciones porque su estado final permanece sin alteraciones. En el régimen caótico, incluso pequeñas diferencias entre estados típicamente incrementan en el tiempo, se propagan por toda la red y usualmente esto resulta en un estado dinámico completamente diferente ( $H(t) \rightarrow P > 0$  cuando  $t \rightarrow \infty$ ). Finalmente, en el régimen crítico, perturbaciones pequeñas no incrementan ni disminuyen, se mantienen más o menos constantes, confinadas a un pequeño conjunto de cambios entre  $\tilde{X}_{i1}(t+k)$  y  $\tilde{X}_{i2}(t+k)$  [Espinal et al., 2011].

Con estos elementos, podemos calcular numéricamente el mapeo de Derrida  $M(H(t))$  [Derrida and Pomeau, 1986], que describe cómo las perturbaciones incrementan o decrecientan en un solo paso de tiempo  $H(t+1) = M(H(t))$ . El valor de la pendiente  $M'(0)$  de este mapeo en  $H = 0$  es suficiente para determinar por completo el régimen en el que opera la red [Aldana and Cluzel, 2003; Balleza et al., 2008; Derrida and Pomeau, 1986; Espinal et al., 2011]:

- Ordenado. Si  $M'(0) < 1$
- Caótico. Si  $M'(0) > 1$
- Crítico. Si  $M'(0) = 1$

En este trabajo usaremos estos conceptos para evaluar en cuál régimen dinámico opera la red de regulación de la RA.

En esta tesis utilizamos el contexto biológico de la reacción acrosomal en espermatozoides de mamífero, así como de las redes de regulación genética para construir, analizar e interpretar los resultados del modelo matemático que proponemos.



# Capítulo 2

## Red de regulación discreta de la reacción acrosomal

En este trabajo, proponemos una red de regulación bioquímica de la reacción acrosomal de espermatozoides humanos. Para implementarla, es necesario definir algunas restricciones sobre los posibles estados iniciales del sistema, esto es, a partir de qué momento entre la capacitación y la fusión de membranas inicia la operación del modelo y cuáles son los posibles estados de los nodos en ese instante, así como su interpretación biológica. También es necesario definir cuáles son los elementos bioquímicos principales, involucrados en la reacción acrosomal, cuáles son aquellos nodos cuyo comportamiento se puede corroborar con resultados experimentales y particularmente, se requiere definir la dinámica de cada nodo, lo que es especialmente difícil. Este capítulo aborda los aspectos fundamentales del diseño y construcción de la red de regulación de la reacción acrosomal.

### 2.1. Consideraciones preliminares

Existe un debate sobre los eventos bioquímicos específicos que determinan el final de la capacitación y el inicio de la RA. Sin embargo, en este trabajo suponemos que los espermatozoides modelados se encuentran en condiciones capacitantes y el modelo inicia la descripción del sistema en un estado cercano al final de la capacitación. De esta forma, el modelo toma en cuenta las siguientes hipótesis sobre el estado fisiológico de las células, que se derivan de la bioquímica del espermatozoide, abordada en la sección [1.2.2](#):

- Aumento en los niveles de  $\text{HCO}_3^-$  intracelular ( $[\text{HCO}_3^-]_i$ ). Este aumento se produce durante capacitación debido a incremento en la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  extracelular en condiciones fisiológicas. Nuestro modelo considera la concentración de  $[\text{HCO}_3^-]_i$  hacia el final de la capacitación como el nivel basal.
- Aumento del  $\text{pH}_i$  y  $\text{pH}_a$ . Durante la capacitación, el  $\text{pH}_i$  y  $\text{pH}_a$  aumentan junto con la concentración de  $[\text{HCO}_3^-]_i$ . [Nakanishi et al., 2001](#); [Nishigaki et al., 2014](#); [Romero et al., 2013](#). El nivel de  $\text{pH}_i$  y  $\text{pH}_a$  alcanzado hacia el final de la capacitación se considera como el nivel más ácido en nuestro modelo.
- Hiperpolarización de la membrana plasmática. Como estipulamos anteriormente, el



Em se hiperpolariza durante capacitación y es importante para la RA. En nuestro modelo, suponemos que el Em se encuentra en un punto cercano a la hiperpolarización observada en espermatozoides capacitados.

- Aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las concentraciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_a$  aumentan durante capacitación, un evento fundamental para la operación de la red bioquímica de ensamblaje vesicular [Sosa et al., 2016; Mayorga et al., 2007; Bustos et al., 2015; Tomes, 2015; Correia et al., 2015]. En nuestro modelo tomamos como niveles basales de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_a$  a aquellos alcanzados hacia el final de la capacitación.
- Maquinaria de ensamblaje vesicular. La conclusión de la RA requiere la activación de una compleja maquinaria de ensamblaje para realizar la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática. Los componentes involucrados en este último proceso de la RA no están completamente establecidos. Sin embargo, en nuestro modelo consideramos a las proteínas SNARE, Rab3A y SYT como los principales actuadores de la fusión de membranas, en conjunto con el hinchamiento del acrosoma. En nuestro modelo suponemos que los estados iniciales de la red no se traducen directamente en un estado final de la RA, es decir, siempre consideramos que los nodos de la maquinaria de ensamblaje vesicular están inactivos en los estados iniciales de la red.

Finalmente, suponemos que existen suficientes recursos energéticos intracelulares (ADP, ATP, GTP, GDP) para la correcta operación de las proteínas que los utilizan y que los elementos intracelulares se encuentran en un estado de fosforilación adecuado para su correcto funcionamiento.

La red que proponemos en este trabajo, se basa en la implementación e interacción de los siguientes módulos principales:

- Maquinaria de ensamblaje vesicular
- Regulación del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_a$
- Regulación del Em
- Cambios en el  $\text{pH}_i$  y  $\text{pH}_a$

Consideramos además, los siguientes compartimentos celulares en el modelo:

- Membrana plasmática
- Citosol
- Membrana acrosomal
- Lumen acrosomal
- Pozas ácidas del cuello
- Medio extracelular

Finalmente, para comparar y corroborar los resultados del modelo con resultados experimentales, elegimos incluir en el modelo los componentes intracelulares cuyo comportamiento

consideramos más importante para supervisar la reacción acrosomal y que pueden medirse experimentalmente en el laboratorio:

- Fusión de membranas. La RA culmina con la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, permitiendo la liberación del contenido acrosomal y exponiendo la membrana acrosomal interna al medio extracelular como la nueva membrana plasmática del espermatozoide. Este es el punto principal de análisis de nuestro modelo. El comportamiento de la fusión entre membranas puede medirse experimentalmente por medio de FM4-64, un marcador de exocitosis [Sánchez-Cárdenas et al., 2014].
- Concentraciones de  $[Ca^{2+}]_i$ . Dada la importancia de este ion en la reacción acrosomal, el calcio intracelular es de particular interés y su comportamiento es ampliamente estudiado antes y durante la RA. Experimentalmente, puede medirse por medio de marcadores fluorescentes de calcio como FLUO-4 [Sánchez-Cárdenas et al., 2014].
- $pH_i$  y  $pH_a$ . Parte de nuestro objetivo en este trabajo es establecer la contribución de cambios en el  $pH_a$  en la RA en espermatozoide humano. Además, la alcalinización del  $pH_i$  es un evento importante para la RA. Por ello, es fundamental analizar el comportamiento de estos dos elementos intracelulares en el modelo. Experimentalmente en modelos de ratón el  $pH_i$  puede medirse por medio de GFP, una proteína fluorescente sensible a pH. En humano, el uso de compuestos fluorescentes como BCECF son utilizados con frecuencia para medir  $pH_i$ . Por otra parte, el  $pH_a$  puede medirse por medio de lysosensor, una sonda fluorescente frecuentemente utilizada para medir el pH de organelos ácidos tales como los lisosomas [Chávez et al., 2018].
- Em. Hemos mencionado antes la importancia de la hiperpolarización del Em para la RA y la fecundación. A su vez, la despolarización del Em contribuye en la activación de diferentes transportadores iónicos importantes para la RA. De esta forma, la regulación fina del Em es fundamental para este proceso excitotico. Actualmente, existen diversas técnicas para medir experimentalmente el Em en células pequeñas tales como los espermatozoides [Gorelik et al., 2002]. Estas técnicas incluyen sondas fluorescentes sensibles a voltaje, como Disc<sub>3</sub>(5), así como técnicas electrofisiológicas como el uso de bicapas lipídicas planares y Patch-Clamp [Darszon et al., 1999; Molina et al., 2020; Gorelik et al., 2002].

## 2.2. Variables externas

Con el propósito de comprobar la capacidad del modelo para reproducir resultados experimentales reportados en la literatura, característicos de la RA, incluimos algunos nodos en la red que representan la presencia de elementos y estímulos en el medio externo. Por ejemplo, la presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular ( $[Ca^{2+}]_o$ ) determina si el  $[Ca^{2+}]_i$  aumenta ante la apertura de canales en la membrana plasmática. De igual forma, la presencia de  $HCO_3^-$  en el medio extracelular ( $[HCO_3^-]_o$ ) es importante para inducir aumento de bicarbonato intracelular ( $[HCO_3^-]_i$ ), lo que contribuye en la alcalinización del  $pH_i$ .

Finalmente, consideramos los efectos de progesterona (Pg) y el ionóforo de  $Ca^{2+}$  A23187 como inductores de la reacción acrosomal. Pg induce un aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  a través de

CatSper [Sánchez-Cárdenas et al., 2014] y se encuentra presente en condiciones fisiológicas en las inmediaciones del ovocito, mientras que A23187 es un estímulo artificial que tiene efectos directos en las concentraciones de  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Ca^{2+}]_a$  [Sosa et al., 2016]. Pg y A23187 se utilizan frecuentemente en experimentos *in vitro* como inductores de la RA.

### 2.3. Implementación de la red

Los componentes e interacciones de las vías de señalización involucradas en la reacción acrosomal de espermatozoides humanos, descritas en la sección 1.2.2 e ilustrados en la Figura 1.5, así como las consideraciones preliminares y variables externas expuestas en este capítulo, se utilizaron para construir formalmente la *Red de Regulación de la Reacción Acrosomal* representada en la Figura 2.1, que consta de 38 nodos y 87 enlaces entre ellos.

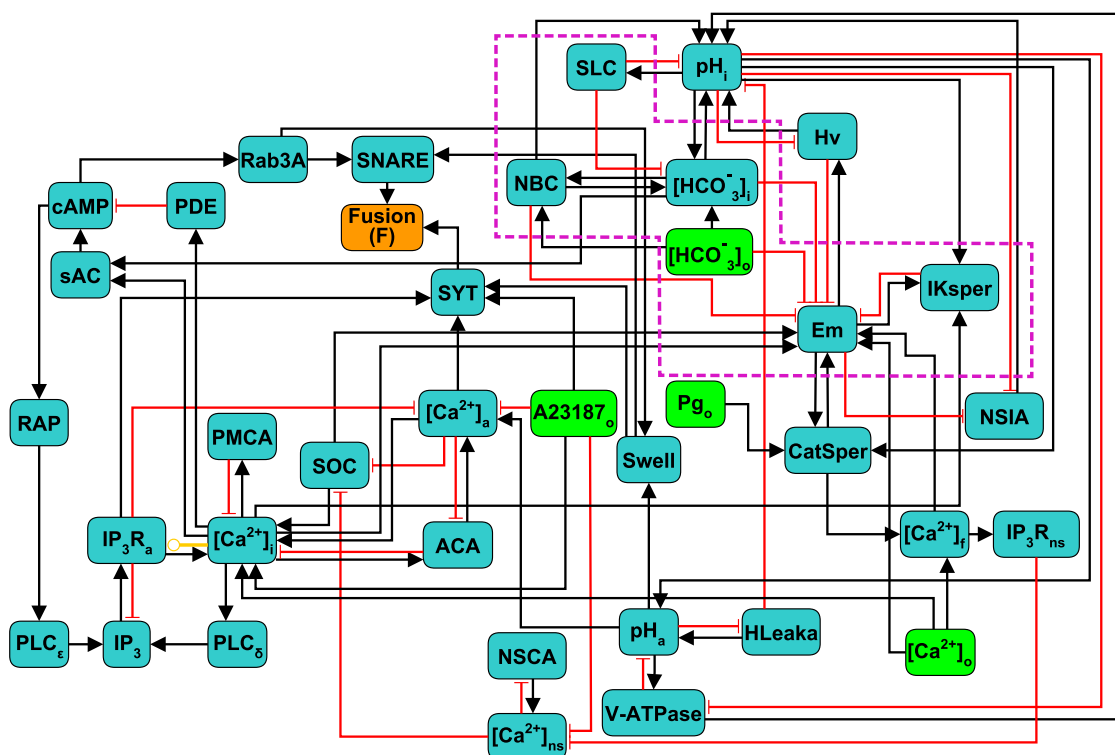


Figura 2.1: Esquema de la red de regulación discreta de la RA en espermatozoides humanos. Los nodos verde claro indican componentes extracelulares que representan estímulos o *entradas* de la red, los nodos verde oscuro representan componentes intracelulares, el nodo naranja Fusión (F) es el nodo reportero de salida, que representa la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, indicando el término de la RA. Las líneas negras indican interacciones positivas o de activación, las líneas rojas indican interacciones negativas o de inhibición, la línea amarilla indica una interacción dual, dependiendo del valor de los nodos involucrados ( $IP_3R_a$  y  $[Ca^{2+}]_i$ ). Los subíndices al final del nombre de cada nodo indican la localización de cada componente en el espermatozoide: i,a,o,f y ns representan intracelular, acrosomal, externo (medio extracelular), flagelar y pozas del cuello, respectivamente. Los nodos dentro de la caja punteada púrpura están involucrados mayoritariamente en la capacitación y se incluyen como variables de control de las condiciones necesarias para realizar la RA.

En esta red, cada nodo representa uno de los componentes involucrados en las vías de señalización de la RA y los enlaces representan interacciones de regulación entre componentes. Dados cuales quiera dos nodos A y B, la interacción entre ellos puede ser positiva, negativa o dual, dependiendo de si la actividad de A promueve (líneas negras) o inhibe (líneas rojas) la actividad de B, o si el efecto de A en B es dependiente del contexto de ambos nodos. La red incluye cuatro nodos de *entrada* que representan estímulos externos: el ionóforo de  $Ca^{2+}$  A23187, progesterona (Pg) y concentraciones externas de  $Ca^{2+}$  y  $HCO_3^-$ . La red contiene un *nodo reportero* de salida (Fusión o F), representando la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática. Este nodo indica cuando la RA se completa y es el punto final de nuestra red.

La mayoría de los nodos son binarios, es decir, pueden tomar valores 0 o 1, lo que respectivamente corresponde a la actividad basal y aumentada de cada componente. Para describir mejor la actividad y la dinámica de algunos componentes, cuatro nodos toman más de dos valores discretos entre  $\{0, 1, 2, 3\}$ , tal como se muestra en la Tabla (2.1): Em, CatSper,  $[Ca^{2+}]_i$  y  $pH_i$ . El valor particular de estos nodos tiene diferentes interpretaciones para cada caso: Em (hiperpolarizado 0, equilibrio 1, levemente despolarizado 2, totalmente despolarizado 3); CatSper (cerrado 0, abierto 1, inactivado 2);  $[Ca^{2+}]_i$  (basal 0, activador 1, inhibidor 2);  $pH_i$  (ácido 0, levemente alcalino 1, totalmente alcalino 2).

Estado	Em	CatSper	$[Ca^{2+}]_i$	$pH_i$
0	Hiperpolarizado	Cerrado	Basal	Ácido
1	Equilibrio	Abierto	Activador	Levemente Alcalino
2	Levemente Despolarizado	Inactivado	Inhibidor	Totalmente Alcalino
3	Totalmente Despolarizado	N/A	N/A	N/A

Tabla 2.1: Estados e interpretaciones de los nodos no binarios. El número de estados y su interpretación biológica depende de cómo cada nodo regula y es regulado por otros nodos. Los nodos con valores N/A (No aplica) en el estado 3 son ternarios y solamente pueden tomar valores en  $\{0, 1, 2\}$ .

## 2.4. Funciones de regulación

La dinámica de cada nodo de la red está determinada por la ecuación (1.1), que requiere especificar la función de regulación  $F_i(x_{i1}(t), x_{i2}(t), \dots, x_{ik}(t))$  para cada nodo  $x_i$  de la red, con reguladores  $x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ik}$ . Biológicamente,  $F_i$  representa la respuesta del componente  $x_i$  ante cambios en otros componentes que interactúan con  $x_i$ . Por ejemplo, el cambio en la concentración de cAMP cuando aumenta la actividad de sAC o el cambio en el estado de un conjunto de canales iónicos dependientes de voltaje ante un cambio en el Em. De esta forma, la función discreta  $F_i$  determina el valor del nodo  $x_i$  para cada posible configuración de los valores de sus reguladores.

La construcción de  $F_i$  es específica para cada nodo y requiere un trabajo artesanal que involucra una extensa revisión de la literatura, experiencia experimental, computacional y teórica, así como la revisión y análisis de bases de datos que contienen interacciones proteómicas, bioquímicas, biofísicas y metabólicas tanto en espermatozoides de humano como en otros sistemas celulares, tales como Reactome [Joshi-Tope, 2004], Pathway Commons [Cerami et al., 2011], InnateDB [Breuer et al., 2013] and NCI-PID [Schaefer et al., 2009].

Para un nodo  $x_i$  con reguladores  $x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ik}$ , el número de posibles configuraciones de los reguladores  $R_i$  está definido como

$$R_i = \prod_{j=1}^k M_v(x_{ij})$$

donde  $M_v(x_{ij})$  es el número de posibles valores que puede tomar el nodo  $x_{ij}$ . Las funciones

de regulación  $F_i$  pueden construirse a través de ecuaciones de lógica discreta o tablas de verdad; en esta tesis, utilizamos la segunda aproximación. El conjunto de tablas de verdad de la red de regulación de la RA está disponibles en el repositorio <https://doi.org/10.5281/zenodo.6339753>. En la siguiente sub-sección proporcionamos un ejemplo del proceso de construcción de la función de regulación de un nodo particular: el receptor de  $\text{IP}_3$  del acrosoma ( $\text{IP}_3\text{R}_a$ ).

### 2.4.1. Ejemplo de construcción de la función de regulación del nodo $\text{IP}_3\text{R}_a$

Los receptores de  $\text{IP}_3$  del acrosoma ( $\text{IP}_3\text{R}_a$ ) son canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e  $\text{IP}_3$ , localizados en la membrana acrosomal externa [Darszon et al., 2011; Sosa et al., 2016; Tomes, 2015]. Poseen un sitio de unión a  $\text{IP}_3$  y dos sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de alta y baja afinidad, que abren o bloquean el canal, respectivamente. El aumento moderado de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en presencia de  $\text{IP}_3$  promueve la apertura del canal. Un aumento posterior en la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bloquea el canal a través del sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de baja afinidad.

La Tabla 2.2 presenta la función de regulación de los canales  $\text{IP}_3\text{R}_a$ . Para su construcción, primero identificamos a sus reguladores, los nodos  $\text{IP}_3$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . El nodo  $\text{IP}_3$  es binario y puede tomar solamente dos valores (Basal= 0 e Incrementado= 1), mientras que el nodo  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  puede tomar tres valores (Basal= 0, Activador= 1, Inhibidor= 2).  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 1$  representa un incremento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  suficiente para abrir los canales  $\text{IP}_3\text{R}_a$  dado un incremento de  $\text{IP}_3$ , mientras que  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 2$  promueve su bloqueo. Por motivos prácticos, el nodo  $\text{IP}_3\text{R}_a$  solamente puede tomar dos valores (Cerrado= 0 y Abierto= 1), dependiendo del valor de sus reguladores. Cuando  $\text{IP}_3 = 0$ , los canales no pueden abrirse, independientemente del valor de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Cuando  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 0$  o  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 2$ , los canales están cerrados, ya que la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es muy baja o muy alta, independientemente del valor de  $\text{IP}_3$ . Esto significa que  $\text{IP}_3\text{R}_a = 1$  solamente cuando  $\text{IP}_3 = 1$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 1$ . El valor de  $\text{IP}_3\text{R}_a$  y en general de todos los nodos de la red se debe especificar para cada valor posible de sus reguladores.

Reguladores		Objetivo
$\text{IP}_3$	$[\text{Ca}^{2+}]_i$	$\text{IP}_3\text{R}_a$
0	0	0
0	1	0
0	2	0
1	0	0
1	1	1
1	2	0

Tabla 2.2: Función de regulación de los canales  $\text{IP}_3\text{R}_a$ . Las filas representan el valor asignado al nodo  $\text{IP}_3\text{R}_a$  en cada posible configuración de sus reguladores,  $\text{IP}_3$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

El modelo de red de regulación propuesto en este capítulo se utiliza para analizar la contribución de la heterogeneidad fisiológica y cambios en el  $\text{pH}_a$ , en la capacidad de los

espermatozoides para realizar la RA de forma espontánea e inducida por un agonista natural, la progesterona.

# Capítulo 3

## Resultados

Imaginemos una población de espermatozoides, cada uno actualizando internamente su propia red de regulación. Iniciamos cada red de la población en un estado inicial aleatorio y dejamos que la dinámica actualice la red. Diferentes redes terminarán en diferentes atractores, dependiendo del estado inicial en el cual iniciaron. De esta forma, aunque todas las redes de la población son idénticas, la configuración final de la población será heterogénea, ya que diferentes redes terminarán en diferentes atractores.

### 3.1. El espacio de atractores se parte en tres subpoblaciones funcionalmente diferentes

Para consolidar la construcción de la red de regulación discreta de la RA en espermatozoide de humano, primero caracterizamos y clasificamos los atractores de la red y sus correspondientes cuencas de atracción.

Experimentalmente está demostrado que la Pg liberada por las células del cumulus en condiciones naturales activa CatSper y de esta forma incrementa el  $[Ca^{2+}]_i$  [Kirichok et al., 2006; Lishko et al., 2011; Mannowetz et al., 2017; Miller et al., 2016; Strünker et al., 2011], aunque hay evidencia de otras respuestas que promueven la RA [Stival et al., 2016]. En nuestro modelo, para poder incorporar este resultado, calculamos los atractores de la red y los clasificamos en tres *clases funcionales* en términos de su interpretación biológica:

- Primero, identificamos todos los atractores en ausencia de Pg y determinamos aquellos en los que el nodo reportero Fusion está activo ( $F=1$ ) (Figura 3.1A,C). Las redes en estos atractores representan espermatozoides que alcanzarán la fusión de membranas sin el estímulo de la Pg y corresponden a la RA espontánea. Así, etiquetamos a estos atractores como *Espontáneos*.
- Después, en los atractores restantes, en los cuales el nodo reportero Fusion está inactivo ( $F=0$ ), activamos el nodo Pg, simulando los efectos de agregar progesterona al medio. Consecuentemente, las redes que residen en alguno de estos atractores *origen* (Figura 3.1B - columna izquierda) "saltan" hacia la cuenca de atracción de un atractor *destino* diferente (Figura 3.1B - columna derecha). Si dentro de el atractor



destino el nodo reportero Fusión está activado ( $F=1$ ), etiquetamos al nodo origen como *Inducible* (Figura 3.1B-C), ya que las redes en estos atractores representan espermatozoides que realizan la RA solamente después del estímulo por Pg.

- Finalmente, si el nodo reportero Fusión no está activado dentro del atractor destino, entonces el atractor origen se etiqueta como *Negativo* (Figure 3.1B-C) ya que las redes que residen en esos atractores representan espermatozoides que no realizarán la RA, incluso después del estímulo con Pg.

■

De acuerdo a esta clasificación, la Figura 3.1D muestra la distribución de atractores antes del estímulo por Pg en cada uno de los grupos funcionales.

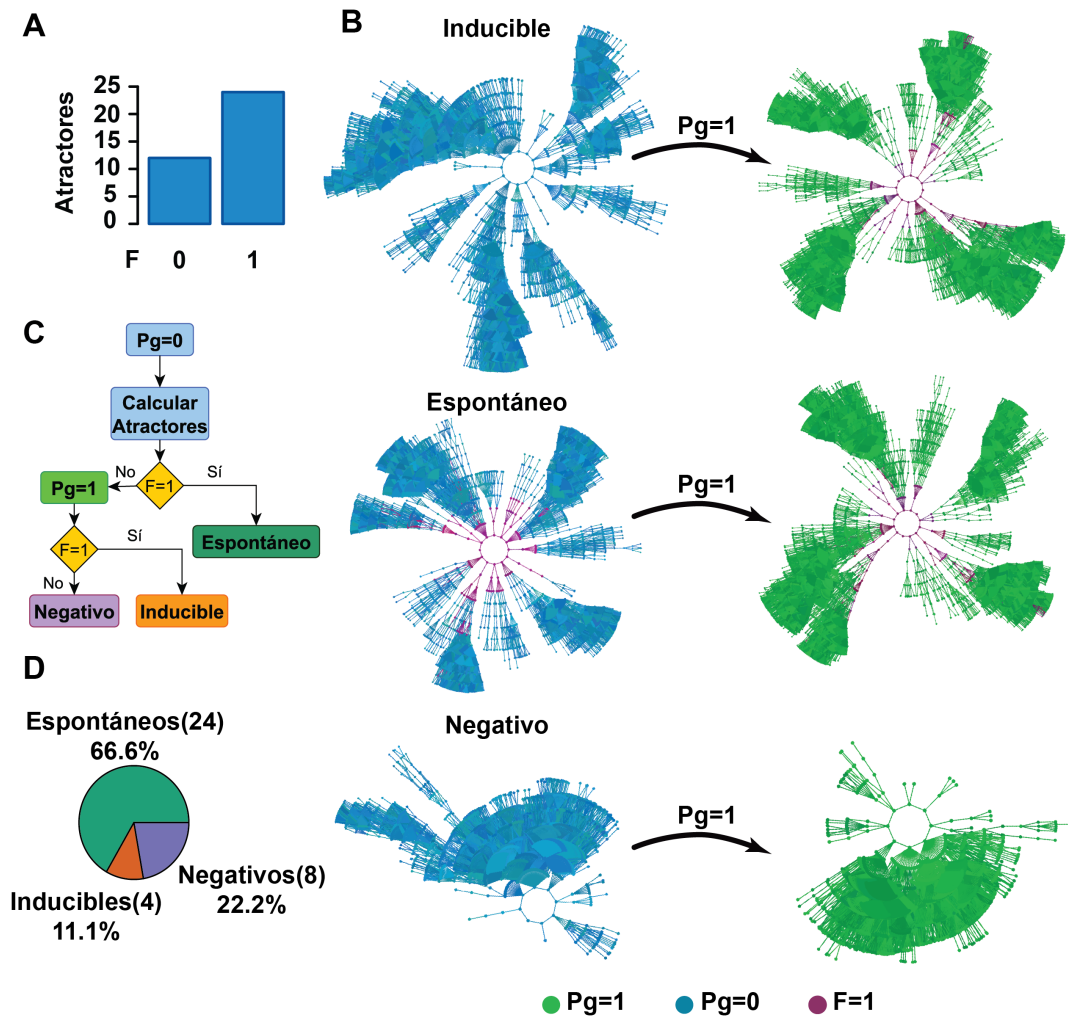


Figura 3.1: El espacio de atractores se parte en tres grupos funcionales: Espontáneos, Inducibles y Negativos. **(A)** Número de atractores que alcanzan fusión de membrana ( $F=1$ ) o que no la alcanzan ( $F=0$ ) en ausencia de  $Pg$  ( $Pg=0$ ). **(B)** Diagrama del criterio de clasificación en tres grupos funcionales para el espacio de atractores. Los colores representan la actividad del nodo  $Pg$  y el nodo reportero Fusión ( $F$ ); los puntos azules corresponden a estados donde  $Pg=0$ , mientras que los puntos verdes indican  $Pg=1$ . Los puntos púrpuras representan estados que alcanzaron  $F=1$ . Considerando los atractores del panel A, atractores espontáneos presentan fusión de membrana ( $F=1$ ) en ausencia de  $Pg$ , en cuyo caso la adición de  $Pg$  no afecta al estado de la membrana fusionada (estos atractores corresponden a la segunda barra del panel A). En los atractores restantes que no presentan fusión de membrana ( $F=0$ ), los atractores Inducibles son aquellos en los que la fusión ( $F=1$ ) se alcanza solamente después del estímulo de la  $Pg$  ( $Pg=1$ ). Los atractores negativos nunca alcanzan la fusión de membranas ( $F=1$ ) independientemente del valor de la  $Pg$ . **(C)** Diagrama de flujo del criterio de clasificación descrito en B. **(D)** Distribución de atractores en ausencia de  $Pg$  ( $Pg=0$ ), clasificados en términos de su respuesta a  $Pg$ .

## 3.2. Heterogeneidad fisiológica

Los espermatozoides humanos parecen ser heterogéneos en su capacidad para llevar a cabo la RA *in vitro*. Cerca del 15-20 % de los espermatozoides capacitados producen RA de forma espontánea [Nakanishi et al., 2001] y 20-30 % de las células realizan RA en respuesta a Pg [Stival et al., 2016]. Sin embargo, no está establecida la relación entre la heterogeneidad fisiológica en una población de espermatozoides y la proporción de células que alcanzan la RA espontánea o inducida por Pg.

Como está descrito en diferentes modelos discretos reportados en la literatura [Álvarez-Buylla et al., 2008; Espinal et al., 2011; Espinal-Enríquez et al., 2017; Espinosa-Soto et al., 2004; Mendoza and Alvarez-Buylla, 2000], utilizamos un conjunto de estados iniciales aleatorios, uniformemente distribuidos, para evaluar los posibles destinos de la red. Los estados que representan células que ya han llevado a cabo la fusión de membranas o que tienen una maquinaria de fusión ya activada, fueron excluidos del análisis, ya que estos nodos son en su mayoría insensibles a cualquier estímulo por estar muy cerca de llevar a cabo la fusión o por ser biológicamente no alcanzables. De esta forma, restringimos el conjunto de estados iniciales a aquellos en los que el valor de los nodos reportero Fusion, Swell y SNARE es 0 en todos los casos. Los valores del resto de los nodos se asignaron aleatoriamente.

Como resultado de esta aproximación aleatoria, la proporción de estados iniciales que alcanzan los atractores Inducibles, Espontáneos y Negativos, se aleja de las proporciones observadas experimentalmente, de células que realizan la RA inducida por Pg, RA espontánea y no RA en absoluto (Figura 3.2). Esta discrepancia indica que no es realista suponer una distribución uniforme y equiprobable de estados iniciales y que el conjunto de estos, interpretado como la heterogeneidad existente en los estados iniciales fisiológicos de los espermatozoides, debe tener una distribución no trivial. Sin embargo, estos resultados indican que la heterogeneidad fisiológica está estrechamente relacionada con la proporción de células que presentan la RA, ya sea espontánea o inducida.

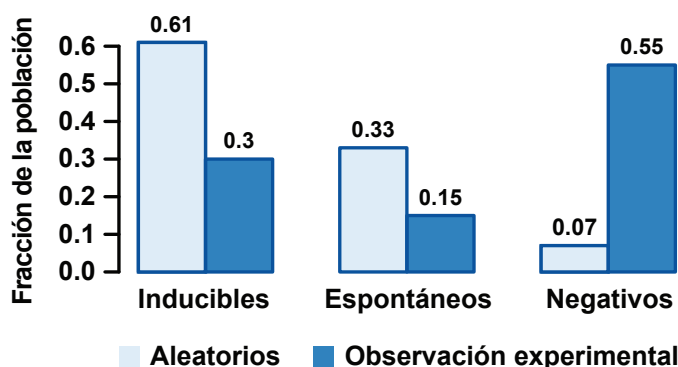


Figura 3.2: Fracción de estados seleccionados aleatoriamente con una distribución equiprobable, que están contenidos en las cuencas de atracción de atractores Inducibles, Espontáneos y Negativos, y comparación con observaciones experimentales de las fracciones de una población de espermatozoides que presentan RA inducida por Pg, RA espontánea o no RA.

Para entender mejor el patrón de heterogeneidad de una forma más realista, construimos el conjunto de estados iniciales seleccionando aleatoriamente estados de las cuencas de atracción de los atractores Espontáneos, Inducibles y Negativos, basándonos en probabilidades que representaran los porcentajes observados: 15 %, 30 % y 65 % respectivamente, y aplicamos las restricciones antes mencionadas sobre los nodos de la maquinaria de fusión. Se debe notar que el proceso de selección de los estados iniciales cancela cualquier efecto del tamaño relativo de las cuencas de atracción y por construcción, la población de redes que inician en estos estados iniciales reproduce las proporciones observadas de RA espontánea, inducible y negativa. Usamos este conjunto para completar nuestra validación de la construcción del modelo, así como para investigar las características comunes y diferencias entre los estados iniciales. Para este propósito, primero exploramos la probabilidad de activación  $P(x)$  para todo nodo  $x$  en la red. Esto es:

- Para nodos booleanos, calculamos la probabilidad de que un nodo  $x$  esté en el estado activo  $P(x) = P(x = 1)$  dentro del conjunto de estados iniciales.
- Para los nodos no booleanos  $\text{pH}_i$ ,  $\text{CatSper}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $\text{Em}$ ,  $P(x) = P(x > M_x/2)$ , donde  $M_x$  es el valor máximo que puede tomar el nodo  $x$ .

La Figura 3.3 muestra la probabilidad de activación de cada nodo en la red (excepto los nodos que representan componentes del medio externo). Para tener una buena estadística, usamos una muestra de  $2 \times 10^7$  estados iniciales diferentes, construidos como describimos anteriormente, lo cual mantiene la desviación estándar de la probabilidad de activación menor a 0.001. Los nodos pueden separarse en dos grupos principales: aquellos en los que  $0.4 < P(x) < 0.6$ , que no muestran una tendencia clara hacia activación o inactivación, y aquellos en los que  $P(x) < 0.4$  o  $P(x) > 0.6$ , que tienen una tendencia más grande a estar activados o inactivados. De acuerdo con la literatura [Sosa et al., 2016], los nodos involucrados en la cascada de señalización del cAMP (RAP, Rab3A, cAMP, sAC), así como los canales  $\text{IP}_3\text{R}$   $\text{Ca}^{2+}$  estuvieron predominantemente inactivados. Por otro lado,  $\text{IKsper}$  mostró tendencia a estar activado, lo cual es necesario para mantener el  $\text{Em}$  hiperpolarizado [Chávez et al., 2013]. Además, la  $\text{ATPasa}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  acrosomal (ACA) y el canal de  $\text{H}^+$   $\text{Hv}$  mostraron una alta tendencia hacia la activación. ACA ayuda a mantener la alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del acrosoma, requerida para la RA, mientras que el  $\text{Hv}$  incremental el  $\text{pH}_i$ , un evento que está relacionado con la activación de  $\text{CatSper}$  y el cual probablemente también es necesario para la RA [Darszon et al., 2006; Lishko et al., 2010; Miller et al., 2018].

La Figura 3.3 adicionalmente muestra la probabilidad de activación de los nodos en el conjunto de estados iniciales seleccionados (barras azules), en un conjunto de estados iniciales aleatorios equiprobables (línea punteada naranja) y en todos los estados que componen las cuencas de atracción de todos los atractores del sistema (línea púrpura). El patrón de activación de los nodos en el conjunto de estados iniciales seleccionados diverge del patrón mostrado en el conjunto de estados iniciales aleatorios para la mayoría de los nodos, especialmente en aquellos involucrados en la vía de señalización del cAMP, nodos relacionados con movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , tales como  $\text{IP}_3\text{R}_a$   $\text{PLC}$ ,  $\text{ACA}$  y nodos ligados a la regulación del  $\text{pH}_i$  y del  $\text{Em}$ , tales como  $\text{Hv}$  y  $\text{IKsper}$  respectivamente.

También es notable la diferencia entre los patrones de activación del conjunto de estados iniciales seleccionados y los estados de todas las cuencas de atracción en el espacio de

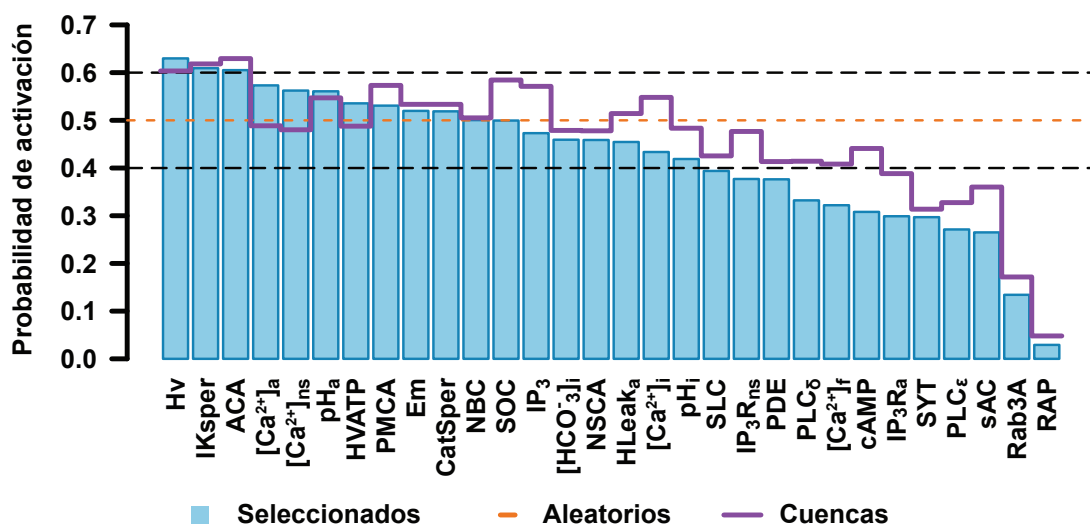


Figura 3.3: Probabilidad de activación de los nodos de la red en el conjunto de estados iniciales. La altura de las barras para cada nodo representa la probabilidad de que ese nodo esté en estado activado. La línea punteada naranja muestra la probabilidad de activación de un conjunto completamente aleatorio de estados iniciales. La línea púrpura continua representa la probabilidad de activación de cada nodo en el conjunto completo de estados que conforman las cuencas de atracción de todos los atractores. Las líneas negras punteadas ayudan a identificar los nodos cuya probabilidad de activación está entre 0.4 y 0.6. Las barras de error no se muestran ya que en cada caso la desviación estándar está por debajo de 0.001.

atractores; principalmente, los nodos relacionados a las vías de señalización de cAMP y  $[Ca^{2+}]_a$  muestran menor activación en el conjunto de estados iniciales seleccionados. Esto es probablemente porque en los atractores Espontáneos e Inducibles, la activación de estos nodos favorece la activación del nodo reportero Fusión. Consecuentemente, los estados que muestran activación de los nodos que regulan al cAMP y al  $[Ca^{2+}]_a$  están congregados alrededor de su correspondiente atractor. Esta es la razón de que el conjunto de estados de las cuencas de atracción considere más estados con activación de estos nodos que el conjunto de estados iniciales seleccionados, lo cual explica las diferencias en las probabilidades de activación.

Para los nodos no binarios, la Figura 3.4 muestra la probabilidad de que un nodo tome un valor específico dentro del conjunto de estados iniciales. Como se muestra, solamente un pequeño conjunto de estados iniciales toma el valor más alcalino de  $pH_i$ , mientras que la mayoría toman valores más ácidos. Esto concuerda con la noción de que la alcalinización del citosol se requiere para realizar la RA [Darszon et al., 2006; Florman et al., 1989; Lishko et al., 2010]. La mayoría de los estados iniciales en la población pertenecen a los atractores Negativos que no realizan RA espontánea o inducida. Además, solamente una pequeña fracción de los estados iniciales muestran a CatSper en estado abierto (1) y altos niveles de  $[Ca^{2+}]_i$ , lo cual concuerda con la idea de que la activación de CatSper es importante para incrementar la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  y de esta forma, también la RA [Kirichok et al., 2006; Lishko et al., 2011; Mannowetz et al., 2017; Miller et al., 2016; Strünker et al., 2011]. No se aprecian diferencias significativas entre los valores de Em, aunque esto puede

compensarse por la actividad de  $IK_{sper}$ , mostrada en la Figura 3.3, para inducir una fuerte tendencia de  $Em$  hacia valores hiperpolarizados en los atractores inducibles (Figura 3.7). Estos resultados sugieren que en una población de espermatozoides, la proporción de ellos que muestran RA espontánea, inducida por Pg o no RA en absoluto, está relacionada con la heterogeneidad de los estados fisiológicos de las células. Además, esta heterogeneidad no es arbitraria y existen elementos celulares más robustos a perturbaciones que otros.

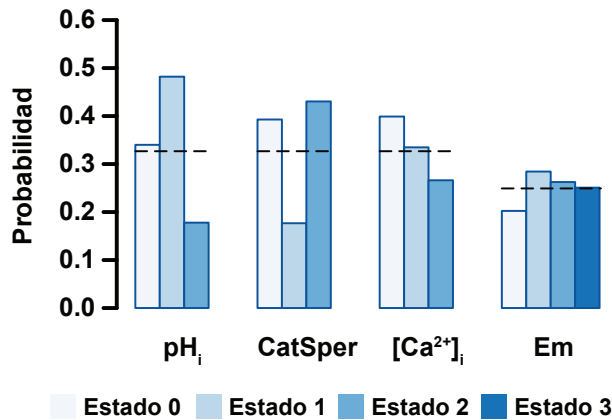


Figura 3.4: Probabilidad de que un nodo no binario tome un valor específico en el conjunto de estados iniciales. La altura de las barras muestra la probabilidad promedio calculada sobre  $2 \times 10^7$  estados iniciales. Las líneas negras punteadas indican la probabilidad obtenida en un conjunto completamente aleatorio de estados iniciales. La interpretación biológica del estado de cada nodo es como sigue:  $pH_i$  (ácido 0, medianamente alcalino 1, totalmente alcalino 2); CatSper (cerrado 0, abierto 1, inactivado 2);  $[Ca^{2+}]_i$  (basal 0, activador 1, inhibidor 2); Em (hiperpolarizado 0, equilibrio 1, medianamente depolarizado 2, totalmente depolarizado 3). Las barras de error no se muestran ya que la desviación estándar está por debajo de 0.001.

### 3.3. Validación del modelo

Como mencionamos anteriormente, para validar el modelo caracterizar el conjunto de estados iniciales seleccionados, comparamos el comportamiento del modelo con un conjunto de 26 observaciones experimentales diferentes reportadas en la literatura y descritas en la Tabla 3.1. Nos enfocamos en el comportamiento de  $cAMP$ ,  $pH_a$ ,  $pH_i$ ,  $Em$ ,  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Ca^{2+}]_a$  y el nodo reportero Fusión, dada su relevancia para la RA. En cada variable, seleccionamos un conjunto de observaciones experimentales reportadas en la literatura y replicamos los experimentos en el modelo. Debemos recordar que en nuestra aproximación, cada espermatozoide contiene una red interna en un estado inicial específico para esa célula. Para simular una población de espermatozoides incubados bajo una determinada condición experimental (CE), usamos una población de redes, cada una iniciando de uno de los estados iniciales antes mencionados, replicamos los efectos de la CE y dejamos que la dinámica actualice las redes hasta que todas ellas alcanzaron su correspondiente atractor. Medimos el efecto promedio de cada CE y comparamos cualitativamente el comportamiento de la población de redes con los resultados de los experimentos reportados. Para ilustrar el proceso, la sección 3.3.1 muestra dos ejemplos de comparación entre simulaciones y

resultados experimentales. Los resultados de las comparaciones descritos en la Tabla (3.1) muestran que nuestro modelo corrobora 92 % de los resultados experimentales obtenidos por diferentes grupos de investigación.

Variable	Condición	Referencia	Reportado	Modelo	Variable	Condición	Referencia	Reportado	Modelo
cAMP	Capacitación	Visconti et al. 1995, 2002	↑	↑ 2%	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>a</sub>	Pg	De Blas et al. 2002, Rossato et al. 2001	↓	↓ 9%
	Pg	Sosa et al. 2016	↑	↑ 3%	Hinchamiento	Control	Sosa et al. 2016	↑ 15%	↑ 30%
pH <sub>e</sub>	Capacitación	Nakanishi et al. 2001	↑	↑ 3%	XC + A23187	Sosa et al. 2016	↑	↑ 61%	
	DCCD	Nakanishi et al. 2001	↑	↑ 45%	XC + TG	Sosa et al. 2016	↑	↑ 61%	
	DIDS	Nakanishi et al. 2001	↓	↓ -1%	XC + cAMP	Sosa et al. 2016	↑	↑ 70%	
	NNC	Chávez et al. 2018	↑	↑ 45%	XC + 8-pCPT	Sosa et al. 2016	↑	↑ 70%	
	NNC vs Ionomicina	Chávez et al. 2018	↑	↑ 50%	XC + Rab3A	Sosa et al. 2016	↑	↑ 70%	
pH <sub>i</sub>	Capacitación	Darszon et al. 2006, Lishko et al. 2012	↑	↑ 5%	XC + Pg	Sosa et al. 2016	↑	↓ -3%	
Em	Capacitación	Chávez et al. 2013	↓	↓ -86%	RA	DCCD	Nakanishi et al. 2001	↑	↑ 55%
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Capacitación	Chávez et al. 2013	↓	↓ -86%	DIDS	Nakanishi et al. 2001	↑	↑ 7%	
	Capacitación	Lishko et al. 2012, Visconti et al. 2002	↑	↑ 5%	Ionomicina	Chávez et al. 2018	↑	↑ 28%	
	Pg	Blackmore et al. 1990, Kirkman-Brown et al. 2000	↑	↑ 24%	NNC	Chávez et al. 2018	↑	↑ 85%	
	NNC	Chávez et al. 2018	↑	↑ 28%	NNC vs Ionomicina	Chávez et al. 2018	↑	↑ 57%	
	Ionomicina vs NNC	Chávez et al. 2018	↑	↑ 20%					

Tabla 3.1: Observaciones experimentales comparadas con el comportamiento de la red discreta de la RA. Para cada variable, reproducimos en el modelo un conjunto de condiciones experimentales reportadas en la literatura. Las flechas indican el cambio cualitativo en la variable medida (↑ incremento, ↓ disminución) cuando está sujeta a cada condición. La concordancia entre las observaciones experimentales y el comportamiento de la red están señaladas como filas verdes, indicando las mismas respuestas cualitativas en los experimentos y en el modelo, mientras que las discrepancias están señaladas como filas rojas. Los porcentajes indican la magnitud del cambio respecto a la máxima respuesta posible. El caso particular del hinchamiento bajo condiciones control se señala como una discrepancia, ya que el porcentaje de acrosomas hinchados en el modelo es significativamente más grande que el reportado. Todos los experimentos se realizaron en diferentes medios capacitantes (ver referencias). DCCD, N,N'-diciclohexilcarbodiimida; DIDS, ácido 4,4'-diisotiocianostilbeno-2,2'-disulfónico; NNC, NNC55-0396; XC, Xestospongina C; TG, Tapsigargina; 8-pCPT, 8-pCPT-20-O-Me-cAMP.

### 3.3.1. Ejemplos de comparación entre el modelo y observaciones experimentales

#### Ejemplo 1: porcentaje de acrosomas hinchados

En Sosa et al., 2016, los autores incuban muestras de espermatozoides humanos en Xestospongina C (XC) con diferentes tratamientos. En presencia de ionóforo A23187 y Pg, el porcentaje de acrosomas hinchados incrementa con respecto a los experimentos control. Nosotros reproducimos las mismas condiciones experimentales en nuestro modelo y medimos el porcentaje de acrosomas hinchados simulando la adición de XC, A23187 y Pg. Para A23187, la diferencia en el porcentaje de acrosomas hinchados (61 % normalizado por el total de la población) concuerda con los resultados experimentales, reportados en la Tabla 3.1 como una fila verde y dos flechas apuntando en la misma dirección, lo que indica la misma respuesta cualitativa entre el modelo y los experimentos (↑↑). En el caso de la Pg, el porcentaje de acrosomas hinchados (-3 %) difiere respecto a los experimentos, lo que se indica como una fila roja y flechas que apuntan en direcciones opuestas (↑↓) (Figura 3.5). Las razones de esta diferencia cualitativa se abordan en la sección 4 de conclusiones.

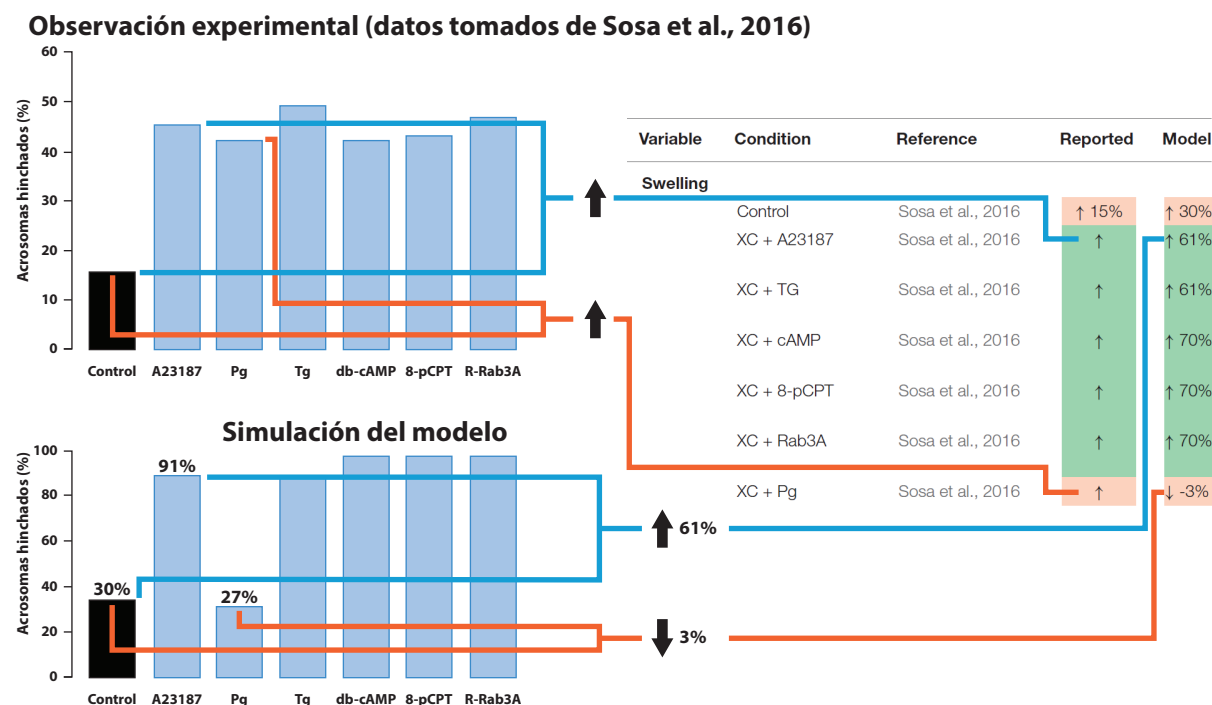


Figura 3.5: Comparación entre el modelo y observaciones experimentales de acrosomas hinchados en presencia de XC, A23187 y Pg. Las flechas indican el signo de la diferencia entre los acrosomas hinchados en condiciones Control y en presencia de A23187 o Pg, para los experimentos reportados y los resultados del modelo. Las coincidencias entre los experimentos y el modelo se indica con una fila verde resaltando flechas que apuntan en la misma dirección, mientras que las discrepancias se especifican como una fila roja y flechas que apuntan en direcciones opuestas. La magnitud del cambio en el modelo se indica como un porcentaje de la máxima respuesta.

### Ejemplo 2: respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a la Pg

En Kirkman et al., 2000, los autores reportan un incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  como respuesta a la estimulación con Pg. Nosotros simulamos estas condiciones experimentales en el modelo y medimos los efectos de la adición de Pg en el valor promedio y normalizado de  $[Ca^{2+}]_i$ , tomado en una población de espermatozoides, considerando los últimos 20 pasos de la serie de tiempo, antes y después de la adición de Pg. El estímulo indujo un incremento en las concentraciones de  $[Ca^{2+}]_i$  en el modelo y en los experimentos, lo cual se reporta en la tabla 3.1 como una fila verde y dos flechas apuntando en la misma dirección, lo que indica la misma respuesta cualitativa entre el modelo y los experimentos (Figura 3.6). El modelo no fue capaz de reproducir el primer incremento transitorio de  $[Ca^{2+}]_i$ , dadas sus limitaciones. La reproducción cuantitativa de los resultados experimentales requiere incrementar la complejidad del modelo, lo cual se aborda en la sección 4 de conclusiones



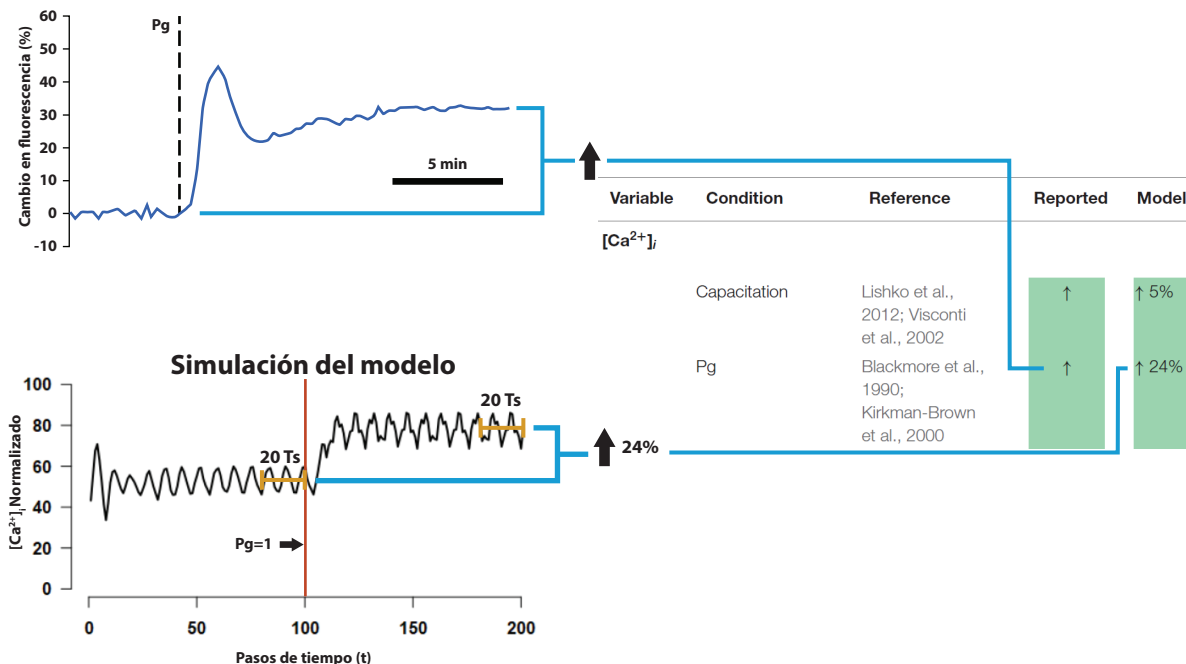
**Observación experimental (datos tomados de Kirkman et al., 2000)**

Figura 3.6: Comparación de la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  entre el modelo y las observaciones experimentales, como respuesta a la estimulación con Pg. La serie de tiempo promedio de  $[Ca^{2+}]_i$  se calculó en el modelo antes y después de la adición de Pg. Consideramos la serie de tiempo promedio 20 pasos antes de la adición de Pg y los últimos 20 pasos de tiempo de la simulación. Las flechas indican un incremento en la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  tanto para el modelo como para los experimentos. El cambio de magnitud en el modelo se indica como un porcentaje del máximo valor posible de  $[Ca^{2+}]_i$ .

### 3.4. Atractores Espontáneos, Inducibles y Negativos muestran diferencias a gran escala en el estado fisiológico de la red

Una vez que validamos nuestro modelo de RA, procedimos a examinar su capacidad predictiva. Para este propósito analizamos a detalle las características que definen la clasificación funcional de los atractores en Espontáneos, Inducibles y Negativos para la RA. Calculamos la probabilidad de activación de todos los nodos para cada grupo funcional dentro del conjunto de estados iniciales construidos previamente. La Figura 3.7A muestra los nodos en los que la probabilidad de activación es significativamente diferente entre los tres grupos funcionales. Las mayores diferencias están en la clase de los atractores Inducibles, en donde la actividad de los nodos relacionados con las concentraciones de  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Ca^{2+}]_a$  tienen los cambios más significativos en la probabilidad de activación, comparados con las otras dos clases. Aunque las diferencias entre los atractores Espontáneos y Negativos son sutiles, puede verse que hay cambios considerables en la probabilidad de activación de sAC, la corriente de salida de protones (HLeak),  $pH_i$ , la V-ATPasa acrosomal y el Em. Notablemente, esta figura muestra que en el conjunto de estados iniciales, los

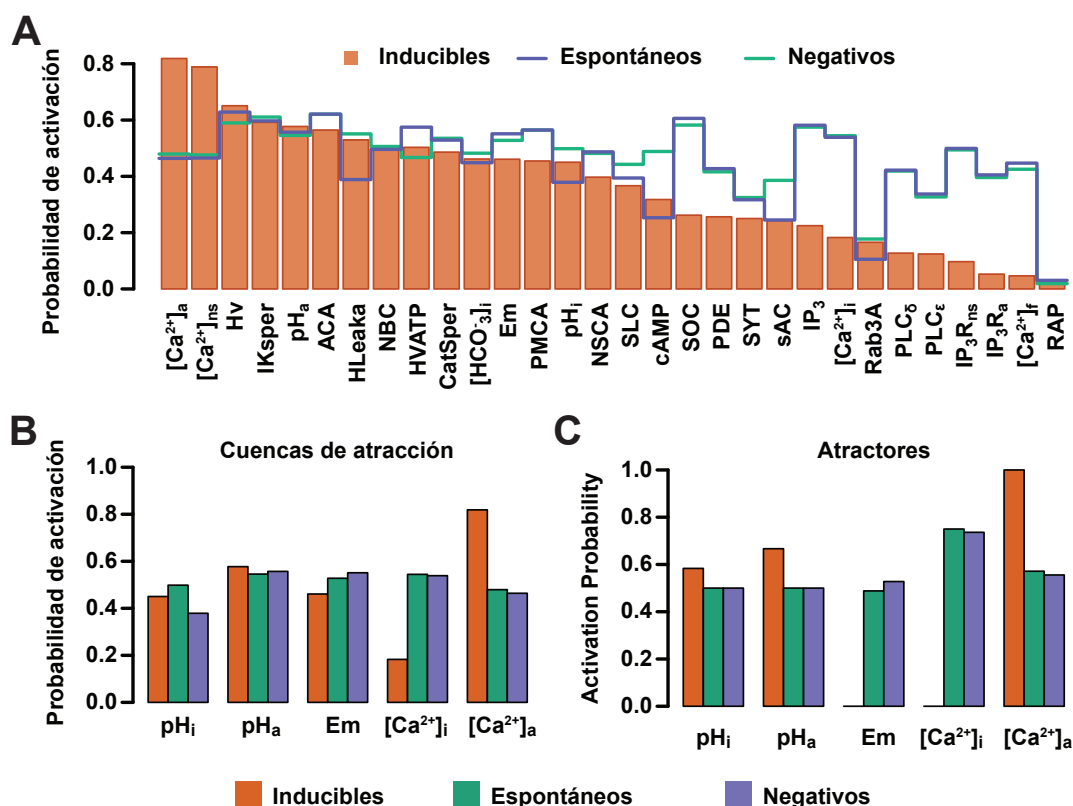


Figura 3.7: Probabilidad de activación de los nodos de la red en las cuencas de atracción y atractores Inducibles, Espontáneos y Negativos. (A) Las barras representan la probabilidad de activación de los nodos, para los estados iniciales dentro de las cuencas de atractores Inducibles. Las líneas azul y verde corresponden a la probabilidad de activación de los nodos de la red en las cuencas de atractores Espontáneos y Negativos, respectivamente. (B-C) Probabilidad de activación de los nodos  $pH_i$ ,  $pH_a$ , Em,  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Ca^{2+}]_a$  en las cuencas de atracción (B) o atractores (C) en las tres clases funcionales.

nodos relacionados a la regulación de  $pH_i$  y  $pH_a$  tienen probabilidades de activación distintas entre las clases funcionales.

Fijando nuestra atención en los nodos  $pH_i$ ,  $pH_a$ , Em,  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Ca^{2+}]_a$ , la Figura 3.7B muestra que hay diferencias significativas en la probabilidad de activación de estos nodos entre clases funcionales. Como se esperaría, el nodo  $pH_i$  tiene una probabilidad de activación más alta en los atractores Espontáneos que en los Inducibles, mientras que los atractores Negativos tienen la probabilidad más baja. No se aprecian diferencias significativas respecto a la probabilidad de activación del  $pH_a$  entre las tres clases. Notablemente, los nodos Em y  $[Ca^{2+}]_i$  alcanzan su probabilidad de activación más baja en los atractores Inducibles, indicando que el incremento en la actividad de Em (despolarización) y de  $[Ca^{2+}]_i$  (aumento en la concentración) frecuentemente llevan al sistema ya sea hacia los atractores de la RA espontánea o a los que no presentan RA en absoluto. El nodo  $[Ca^{2+}]_a$  también muestra su valor más alto en el grupo de atractores Inducibles, indicando que baja actividad de  $[Ca^{2+}]_a$  (disminución de la concentración) lleva a la red hacia los atractores Espontáneos o Negativos. En su mayoría, este comportamiento se preserva

cuando en vez de hacer el análisis en las cuenca de atracción, lo realizamos directamente en los atractores, calculando la probabilidad de activación de los nodos en los estados que conforman cada atractor. Como muestra la Figura 3.7C, las diferencias en este caso son más evidentes entre las clases; los nodos  $\text{pH}_i$  y  $\text{pH}_a$  tienen su actividad más alta en los atractores Inducibles. Encontramos que en todos los estados de los atractores en esta clase,  $E_m$  siempre toma su valor más bajo ( $E_m=0$ ), lo que representa su estado de mayor hiperpolarización, lo cual significa que siempre que un estado contiene un valor de  $E_m$  diferente de 0, la dinámica lleva a la red ya sea a un atractor Espontáneo o a uno Negativo. De forma similar, el nodo  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  siempre toma el valor basal 0 en los atractores de la clase Inducible. Este hecho no contradice la evidencia establecida de que el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumenta durante capacitación, indica que esta concentración debe permanecer en niveles basales mientras la célula espera un estímulo tal como la adición de Pg para disparar la RA. De otra forma, un incremento en la actividad del nodo  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lleva a la red a un atractor Espontáneo o Negativo. Como se espera, la actividad del nodo  $[\text{Ca}^{2+}]_a$  tiende a ser más baja dentro de los atractores Espontáneos y alcanza su máximo valor en los atractores Inducibles.

Estos resultados son consistentes con la noción de que la RA se estimula por incrementos en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , así como por despolarización de la membrana plasmática, pero también sugieren la existencia de espermatozoides hiperpolarizados con  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevado que no presentan RA. La probabilidad de activación del nodo  $[\text{Ca}^{2+}]_a$  en los atractores Inducibles es consistente con la idea de que la estabilidad del acrosoma requiere altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  para preparar al espermatozoide para el estímulo promovido por la Pg. Altos valores de  $[\text{Ca}^{2+}]_a$  también contribuyen a mantener bajo el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Además, la probabilidad de activación del  $\text{pH}_i$  en las diferentes clases es consistente con la propuesta de que la alcalinización del citosol habilita la RA espontánea, así como la inducida por Pg. Adicionalmente, el modelo predice un  $\text{pH}_i$  más elevado en células que pueden responder a Pg que en aquellas que llevan a cabo la RA espontánea.

### 3.5. Aumento de $\text{pH}_a$ define la capacidad de la red para la RA

Para investigar más a fondo el rol del  $\text{pH}_a$  durante la exocitosis acrosomal, analizamos cómo cambia el espacio de atractores al inducir condiciones de pH acrosomal ácido ( $\text{pH}_a=5.5$ ) o alcalino ( $\text{pH}_a=6.7$ ), fijando el valor del nodo  $\text{pH}_a$  en 0 o 1, respectivamente. Primero notamos que al fijar el valor del  $\text{pH}_a$ , el número de atractores se reduce drásticamente, tal como se muestra en la Figura 3.8A. En condiciones normales, sin determinar un valor particular para el  $\text{pH}_a$ , y fijando  $\text{Pg}=0$ , que en nuestro modelo representa la ausencia de Pg en el medio, la dinámica genera un total de 36 atractores que se reducen a 8 y 10 en condiciones que representan  $\text{pH}_a$  bajo (0-ácido) y alto (1-alkalino), respectivamente. Notablemente, la magnitud de esta contracción no es resultado del hecho de que fijar el valor del  $\text{pH}_a$  reduce a la mitad el número total de posibles estados de la red. Este cambio implica que fijar el  $\text{pH}_a$  limita el espacio de atractores y en consecuencia se reduce la cantidad de comportamientos estables posibles alcanzables por la red, desde cualquier estado inicial.

Para entender mejor las repercusiones de esta contracción, reclassificamos el espacio de

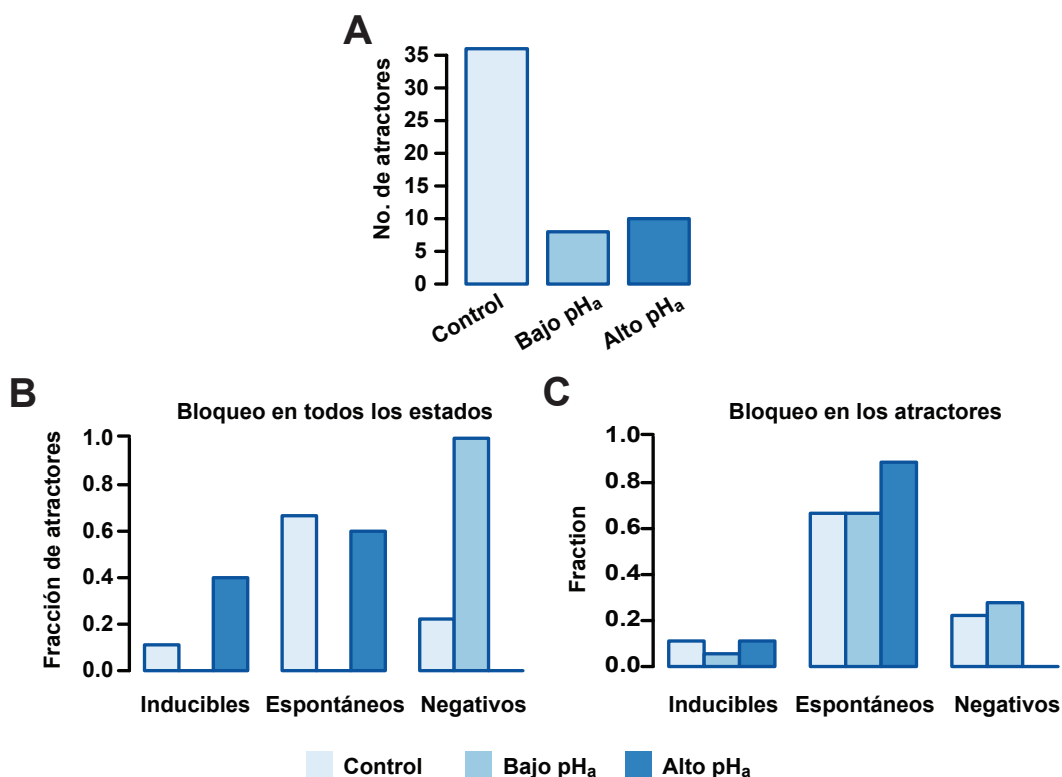


Figura 3.8: Efectos de bloquear el nodo  $pH_a$  en las cuencas de atracción de los atractores Inducibles, Espontáneos y Negativos. (A) Número total de atractores cuando el  $pH_a$  se fija en valor ácido (0) o alcalino (1) en todo el espacio de estados posibles. (B) Distribución de los atractores entre las clases funcionales, fijando el  $pH_a$  como en (A). Asignar  $pH_a = 0$  resulta en la eliminación de los atractores Inducibles y Espontáneos, mientras que fijar  $pH_a = 1$  lleva a la eliminación de los atractores Negativos. (C) Distribución de los atractores entre las diferentes clases funcionales cuando el  $pH_a$  se fija solamente en los estados que conforman el atractor. Asignar  $pH_a = 1$  en los atractores Negativos los transforma en Espontáneos.

atractores resultantes de acuerdo al criterio de clases funcionales y calculamos la fracción del total de atractores que reside en cada una de ellas. La Figura 3.8B muestra que para  $pH_a = 0$ , ningún atractor muestra activación del nodo reportero Fusión en ninguno de sus estados y el espacio de atractores completo pertenece a la RA Negativa. Por el otro lado, esta clase desaparece cuando el  $pH_a = 1$  y todos los atractores muestran activación del nodo reportero Fusión, ya sea en la clase de la RA Espontánea o Inducible. Notablemente, solo los atractores de la clase Inducible incrementan respecto al grupo control en esta condición, lo cual sugiere que la alcalinización solamente promueve la RA inducida por Pg.

Restringir el nodo  $pH_a$  a un valor fijo en todo el espacio de estados es una perturbación mayor del sistema, ya que recorta el espacio de estados posibles y reduce el número total de atractores. Debido a ello, también analizamos una perturbación menos drástica: en vez de fijar el valor de  $pH_a$  en todos los estados posibles, lo fijamos solamente en los estados que conforman los 36 atractores originales. Esto significaría alterar el  $pH_a$  una

vez que la célula alcanzó un estado estable después de capacitarse. Como se muestra en la Figura 3.8C, esta perturbación tiene un efecto menos drástico sobre la distribución funcional de los atractores, pero aún, cuando  $\text{pH}_a = 0$ , el número de atractores Inducibles decrece y el número de atractores Negativos aumenta, mientras que el número de atractores Espontáneos permanece igual. Esto significa que en esta condición, la dinámica reduce la capacidad de la red de activar el nodo Fusión después de la activación de Pg. Por el contrario, la clase Negativa desaparece cuando  $\text{pH}_a = 1$  y el número de atractores Espontáneos se incrementa mientras la clase Inducible permanece intacta. Estos resultados indican que un incremento de  $\text{pH}_a$  puede por si mismo disparar la RA en un grupo de células, pero también significa que la alcalinización incrementa el número de células capaces de realizar la RA inducida por Pg.

### 3.6. Perturbaciones transitorias de calcio y pH promueven cambios funcionales en una población de Redes

En este punto debemos recordar que la dinámica de nuestro modelo, descrita por la ecuación (1.1) es determinista y los nodos se actualizan síncronamente. Esto significa que cada estado inicial lleva a solo un atractor. Como siguiente paso para entender qué tan robusta es la red a pequeños cambios transitorios en el  $\text{pH}_a$  y cómo se compara su efecto respecto a cambios en otros nodos, implementamos una serie de pequeñas perturbaciones en cada uno de los nodos. Perturbar el valor de un nodo en una red que se encuentra en un determinado estado inicial, es decir, en una cuenca de atracción específica, puede tener como consecuencia diversos efectos. Dada una perturbación en el valor de un nodo  $x_i$  de una red que se encuentra en una cuenca de atracción  $B_j$  ocurre una de las siguientes opciones posibles:

- La red se queda en la misma cuenca de atracción  $B_j$  en la que estaba antes de la perturbación.
- La red cambia a otra cuenca de atracción  $B_{k1}$  que es funcionalmente equivalente, es decir, los atractores de las cuencas  $B_j$  y  $B_{k1}$  pertenecen a la misma clase funcional.
- La red cambia a otra cuenca de atracción  $B_{k2}$  que es funcionalmente diferente, es decir, los atractores de las cuencas  $B_j$  y  $B_{k2}$  pertenecen a distintas clases funcionales.

En este estudio, nos enfocamos en la última opción y contamos la fracción de perturbaciones que promovieron un cambio en la clase funcional del atractor resultante. Para ello, tomamos un conjunto de  $10^5$  estados aleatorios en la cuenca de atracción de cada atractor y cambiamos el valor de un solo nodo, el mismo para todos los estados. En el caso de los nodos binarios, la perturbación consistió simplemente en invertir el valor del nodo por su complemento; para los nodos no binarios seleccionamos un valor aleatorio diferente, entre el conjunto de valores posibles para ese nodo. En el caso particular de los atractores Espontáneos, dada la irreversibilidad de la fusión de membranas, los estados aleatorios que tomamos son solamente aquellos que no se traducen directamente a un estado final de la RA, esto es, escogimos solo aquellos estados en donde los nodos Swelling, SNARE, SYT y el nodo reportero Fusión tuvieron valor 0.

Los resultados mostrados en la Figura 3.9 presentan en orden los nodos en dónde las perturbaciones provocaron la mayor cantidad de cambios funcionales para cada una de las clases. Como se muestra en el panel A, en los atractores Inducibles, los nodos más susceptibles a las perturbaciones fueron aquellos relacionados con la regulación de  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Ca^{2+}]_a$ . Notablemente, las perturbaciones realizadas sobre el nodo  $pH_a$  no promovieron un número significativo de cambios funcionales. Además, la mayoría de los cambios fueron hacia atractores Espontáneos. Los paneles B y C muestran que en el caso de los atractores Espontáneos y Negativos, los nodos más susceptibles a las perturbaciones fueron principalmente  $pH_a$  y aquellos relacionados con la regulación del  $pH_i$  y  $pH_a$ . El panel B ilustra que solamente una pequeña fracción de las perturbaciones en las cuencas de los atractores Espontáneos pueden llevar a la red a los atractores Negativos. Notablemente, la mayoría de las perturbaciones realizadas en las cuencas de atractores Negativos, que provocaron un cambio funcional, llevaron a las redes residentes hacia cuencas de atractores Espontáneos, como se muestra en el panel C. Estos resultados predicen que las perturbaciones en el  $pH_a$  pueden promover la RA, al menos parcialmente, sin ningún otro estímulo y que la mayoría de los espermatozoides que reaccionan de esta forma vienen de un grupo de células que no habrían reaccionado de forma espontánea o inducida. Los resultados que presentamos en esta sección indican que no solamente cambios sostenidos pueden promover la RA, sino también estímulos transitorios (mayormente en  $Ca^{2+}$  y pH en el citosol y el acrosoma) son importantes inductores de la RA.

### 3.6.1. La red de regulación de la RA opera cerca del punto crítico

Para entender el régimen dinámico en el que opera la red de regulación de la RA y la influencia del  $pH_a$  en este régimen, calculamos numéricamente el mapeo de Derrida (sección 1.3.2) de la red original (control) y bajo restricciones de bajo y alto  $pH_a$  ( $pH_a = 0$  y  $pH_a = 1$  respectivamente) efectuadas en el espacio completo de estados de la red. En los tres casos encontramos que la pendiente del mapeo en el origen es muy cercana a 1 ( $1,09 \pm 0,04$ ), tal como se muestra en la Figura 3.10. Este comportamiento sugiere que la red de regulación de la RA opera muy cerca del régimen crítico. Notablemente, el mapeo de Derrida de la red bajo restricciones de bajo y alto  $pH_a$  es muy similar a la red control. Esto significa que el  $pH_a$  por si solo no es un nodo relevante para la criticalidad de la red.

Como mencionamos antes, los sistemas que operan cerca del régimen crítico muestran propiedades especiales que no están presentes en otros regímenes dinámicos [Aldana et al., 2007]. Por ejemplo, procesamiento de información eficiente y confiable [Carteret et al., 2008; Nykter et al., 2008] y maximización de sensibilidad y rango dinámico [Kinouchi and Copelli, 2006].

Una propiedad de los sistemas que operan cerca del régimen crítico, de particular interés para la red de regulación de la RA es la coexistencia simultánea de robustez y adaptabilidad. Anteriormente mencionamos la presencia de heterogeneidad fisiológica en espermatozoides capacitados y no capacitados. Esta existe incluso entre aquellas células preparadas para realizar la RA. Esto significa que existen diversos estados bioquímicos

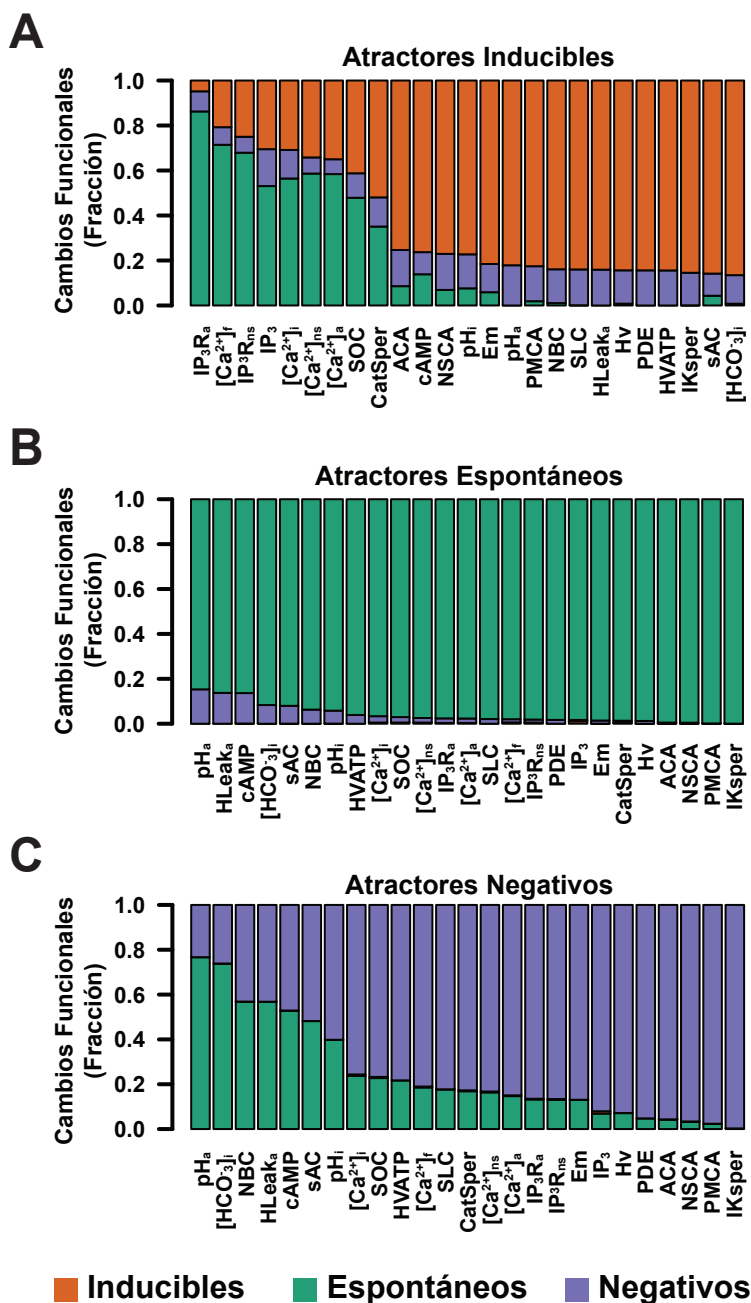


Figura 3.9: Fracción de perturbaciones, específicas de cada nodo, que promueven un cambio funcional en los atractores Inducibles (A), Espontáneos (B) y Negativos (C). Los nodos directamente involucrados en la regulación del  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Ca^{2+}]_a$  muestran alta sensibilidad en el grupo Inducible, mientras que los atractores Espontáneos y Negativos muestran mayor sensibilidad a las perturbaciones realizadas en los nodos relacionados a la regulación del  $pH_i$  y  $pH_a$ . Los tres paneles muestran una mínima fracción de perturbaciones en las cuencas de atractores Negativos y Espontáneos que lleven a la red hacia atractores Inducibles.

del espermatozoide que culminan en este evento de excitación. Por otro lado, durante su trayecto en el tracto femenino, los espermatozoides están constantemente expuestos a perturbaciones en el medio externo, tales como cambios de temperatura, pH y concentraciones

de ligandos, iones y hormonas, entre otras señales. Así, en presencia de la heterogeneidad fisiológica, se requiere que al menos una fracción de la población de espermatozoides muestre robustez a las perturbaciones del medio externo para evitar una RA prematura. Al mismo tiempo, los espermatozoides deben adaptarse a diferentes estímulos, cambiando sus propiedades fisiológicas para poder realizar la RA. Este balance puede darse con mayor probabilidad en un sistema que opera cerca del régimen crítico. Los resultados presentados en la Figura 3.10 indican que la red de regulación de la RA alcanza este compromiso entre robustez y adaptabilidad para cambiar su estado dinámico.

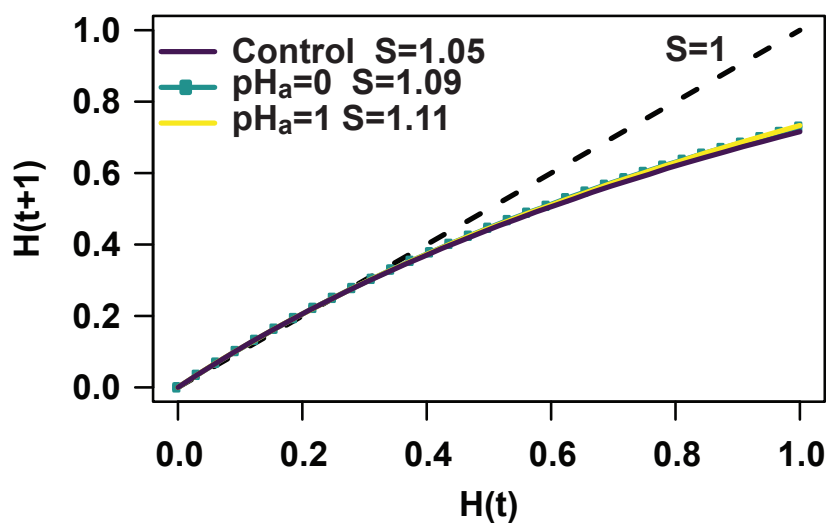


Figura 3.10: El mapeo de Derrida muestra que la red de regulación de la RA opera cerca del punto crítico en condiciones naturales (control) y bajo restricciones de bajo y alto  $\text{pH}_a$ . La pendiente  $S$  de cada mapeo en el origen es  $M'(0) = 1,09 \pm 0,04$  en cada caso. El mapeo muestra los resultados sobre un conjunto de  $5 \times 10^5$  estados de la red. Los casos  $\text{pH}_a = 0$  y  $\text{pH}_a = 1$  son indistinguibles

Los resultados mostrados en este capítulo nos permiten concluir este trabajo de tesis.





# Capítulo 4

## Conclusiones

En esta tesis desarrollamos una red de regulación discreta, síncrona y determinista de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos. Utilizamos esta red para determinar la contribución de cambios en el  $\text{pH}_a$  durante la RA espontánea e inducida por medio de Pg. Establecimos la relevancia de la heterogeneidad fisiológica en la proporción de espermatozoides capaces de realizar la RA, de igual forma, espontáneamente o a través de Pg. Finalmente, estudiamos las características dinámicas de la RA. En este capítulo, enunciamos las conclusiones que obtuvimos de este trabajo, discutimos los resultados que presentamos, mencionamos las contribuciones de esta tesis a la ciencias biomédicas y proponemos algunas ideas para extender la investigación que presentamos.

Los resultados revisados en el Capítulo 3 nos permiten concluir:

1. **Existe heterogeneidad fisiológica en el espermatozoide y hay diferencias significativas en los atractores entre los grupos que llevan a cabo la RA inducida, espontánea y en los que no ocurre.** Los patrones en la probabilidad de activación de los nodos son característicos para cada grupo funcional. Encontramos que los atractores en el grupo Inducible tienen diferencias notables, consistentes con la literatura, especialmente en los nodos Em,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_a$ ,  $\text{pH}_i$  y  $\text{pH}_a$ .
2. **Los elementos involucrados en la RA despliegan diferentes grados de libertad en su actividad.** Esta conclusión proviene del análisis de la probabilidad de activación de los nodos en el espacio completo de estados de la red. Existen nodos con una fuerte tendencia ya sea hacia la activación o inactivación, mientras que otros nodos tienen igual probabilidad de tomar cualquiera de sus valores posibles.
3. **La proporción de espermatozoides que pueden realizar la RA inducida y espontánea, depende de la estructura de la heterogeneidad fisiológica en la población.** En la sección 3.2 mostramos que los conjuntos de posibles estados de la red que preservan las proporciones de RA espontánea e inducida, observados experimentalmente, muestran un patrón de activación específico para cada nodo. Esto significa que existe una relación directa entre la estructura de la heterogeneidad fisiológica en una población de espermatozoides y la proporción de ellos capaces de realizar la RA.
4. **Cambios fijos de  $\text{pH}_a$  reducen el espacio de atractores de la red de regu-**

- lación.** La sección [3.5](#) ilustra que al fijar el  $\text{pH}_a$  en condiciones ácidas o alcalinas, el espacio de atractores se contrae notablemente, reduciendo los posibles estados dinámicos que la red puede alcanzar.
5. **La acidificación del  $\text{pH}_a$  disminuye la capacidad de los espermatozoides para realizar la RA.** El número de atractores relacionados con la RA espontánea e inducida por Pg se reduce al fijar el  $\text{pH}_a$  en valores ácidos, tanto en el espacio total de estados como en los estados que conforman cada atractor. Biológicamente, los espermatozoides que se encuentran en esos estados estables pierden su capacidad para realizar la RA.
  6. **La alcalinización acrosomal mejora la RA inducida y promueve la espontánea.** De forma inversa, el número de atractores capaces de desarrollar la RA espontánea e inducida por Pg aumenta al fijar el  $\text{pH}_a$  en valores alcalinos y disminuye el número de atractores negativos. Esto implica que algunos atractores negativos se convierten en inducibles o espontáneos en condiciones de  $\text{pH}_a$  alcalino. De esta forma, espermatozoides que se encuentran en esos atractores negativos adquieren la capacidad de realizar la RA al incrementar el  $\text{pH}_a$ .
  7. **Cambios transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{pH}_a$  promueven la RA.** En la sección [3.6](#) exploramos si la perturbación temporal de un solo nodo puede cambiar la trayectoria de la red hacia un atractor de un grupo funcional distinto. Encontramos que en las redes que se encuentran en la cuenca de atracción de atractores Inducibles, los nodos relacionados con la regulación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_a$  muestran la sensibilidad más alta a perturbaciones y la mayoría de los cambios en esos nodos promueven la RA. Estos resultados son consistentes con observaciones experimentales. Adicionalmente, en las redes que residen en las cuencas de atractores Espontáneos y Negativos, encontramos que el  $\text{pH}_a$  y sus reguladores son los nodo más sensible a las perturbaciones efectuadas y la mayoría de ellas promovieron la RA.
  8. **La regulación del  $\text{pH}_a$  es fundamental para la RA en espermatozoides de humano.** En conjunto, nuestros resultados muestran que al menos para una fracción de la población de espermatozoides, la alcalinización acrosomal es un paso necesario para inducir la RA. Además, el aumento de  $\text{pH}_a$  promueve por si mismo la RA en un grupo de espermatozoides. Este resultado está respaldado por trabajo publicado en nuestro grupo [\[Chávez et al., 2018\]](#).
  9. **La RA es un evento que opera en el régimen crítico.** Utilizando mapeos de Derrida, en la sección [3.6.1](#) mostramos que la red de regulación de la RA opera cerca del régimen crítico. Esto sugiere un compromiso entre robustez y adaptabilidad, necesario en el espermatozoide para, por un lado, resistir perturbaciones tanto intracelulares como del medio externo; por otro lado, para modificar su comportamiento dinámico ante estímulos que disparan la RA, como la adición de progesterona o el aumento de  $\text{pH}_a$ . Además, encontramos que modificaciones en el  $\text{pH}_a$  no cambian el régimen dinámico de la red.

## 4.1. Discusión

Uno de los principales retos en este trabajo es determinar cuáles son los principales nodos e interacciones en la red de regulación de la RA. El conocimiento de los procesos fisiológicos que culminan en la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática está incompleto y algunas veces la evidencia existente es controversial. A pesar de estas limitaciones, la red que presentamos considera la literatura más reciente sobre los principales componentes intracelulares y las interacciones más relevantes involucradas en la RA, esperando avanzar el entendimiento de este complejo proceso de exocitosis.

A través de calcular el espacio de atractores e identificar los estados que corresponden a sus correspondientes *cuenca de atracción*, concluimos que la red propuesta solamente tiene atractores cíclicos representando oscilaciones fisiológicas estables; no hay puntos fijos. Notamos que estos atractores se modifican cambiando el estado del nodo que representa la Pg en el medio externo y estas diferencias son consistentes con la respuesta de una población de espermatozoides a la adición de esta hormona. Tomando esto en cuenta, partimos el espacio de atractores en Espontáneos, Inducibles y Negativos, basándonos en sus características funcionales.

Como se hace comunmente en la literatura de las redes de regulación [Álvarez-Buylla et al., 2008; Espinal et al., 2011; Espinal-Enríquez et al., 2017; Espinosa-Soto et al., 2004; Mendoza and Alvarez-Buylla, 2000], abordamos la probabilidad de alcanzar diferentes atractores tomando un conjunto de estados iniciales aleatorios uniformemente distribuidos en la gráfica de transición de estados. Esta aproximación nos llevó a concluir que la proporción de redes dentro de una población, que puede alcanzar la RA de forma espontánea e inducida con Pg es inconsistente con las proporciones observadas experimentalmente [Nakanishi et al., 2001; Stival et al., 2016]. Exploramos las características de diferentes conjuntos de estados iniciales que son más consistentes con proporciones de RA reportadas experimentalmente bajo condiciones fisiológicas y determinamos que la probabilidad de activación de cada nodo en este conjunto de estados concuerda con el comportamiento biológico reportado en la literatura. Esto sugiere que no todos los estados de la red son alcanzables bajo condiciones fisiológicas. Más aún, el número de atractores de la red y el tamaño de sus cuencas de atracción no es fisiológicamente relevante. Con nuestro estudio pudimos delimitar el conjunto de estados de la red que se deben considerar como los estados característicos de los espermatozoides capacitados.

Mostramos que nuestro modelo puede reproducir cualitativamente las observaciones experimentales reportadas en la literatura. En este sentido, la red de regulación que proponemos tiene una tasa de éxito de 92 % al reproducir 24 de 26 resultados experimentales, que describen diferentes comportamientos de poblaciones de espermatozoides en respuesta a diversas condiciones y estímulos.

Un resultado experimental que nuestro modelo fue incapaz de reproducir es la observación que muestra que la Pg incrementa el hinchamiento del acrosoma en una población de espermatozoides humanos en presencia de Xestospongina C (XC), un bloqueador de canales  $IP_3R$  [Sosa et al., 2016]. En nuestro modelo, la Pg solamente promueve la apertura

ra de CatSper, localizado en la pieza principal del flagelo del espermatozoide [Kirichok et al., 2006; Lishko et al., 2011; Mannowetz et al., 2017; Miller et al., 2016; Strünker et al., 2011]. Planteamos la hipótesis de que el incremento local en el calcio flagelar y su difusión no son suficientes para activar la maquinaria de fusión en la cabeza, lo que involucra un incremento de cAMP dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y la apertura de canales  $\text{IP}_3\text{R}$ . Favorecemos la idea de que la oleada de  $\text{Ca}^{2+}$  generada en el flagelo es retransmitida por receptores  $\text{IP}_3\text{R}$  localizados en las pozas del cuello, y que esta retransmisión, al estar más cerca de la cabeza, provee el  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para activar la fusión de membranas. Sin embargo, en presencia de XC esto no sería posible, pues este inhibidor detendría la retransmisión de las pozas del cuello y así, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  originada en el flagelo no podría llegar a la cabeza, impidiendo el hinchamiento del acrosoma y la RA. Este resultado puede sugerir la participación de canales diferentes a los  $\text{IP}_3\text{R}$ , involucrados en la retransmisión de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, existe evidencia que indica que los receptores de Rianodina (RyRs), localizados en la envoltura nuclear redundante en espermatozoides humanos, están involucrados en la generación de oscilaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneas e inducidas por Pg [Mata-Martínez et al., 2018]. Sin embargo, la contribución y expresión de RyRs en el funcionamiento de espermatozoides humanos es controversial [Bedu-Addo et al., 2008; Harper and Publicover, 2005; Mata-Martínez et al., 2018; Teves et al., 2009]. La discrepancia entre nuestro modelo y este experimento particular también puede sugerir que la Pg promueve un incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en la cabeza o activar la RA por medio de una vía de señalización diferente. Hay evidencia de que la Pg promueve el incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través de CatSper en humanos [Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011], pero esta hormona no activa CatSper en ratones [Mannowetz et al., 2017; Orta et al., 2018], aunque promueve la RA [Murase and Roldan, 1996; Nahed et al., 2016]. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre las vías de señalización activadas por Pg en la cabeza del espermatozoide es todavía muy incompleto, así como su relación con la RA.

En general, nuestro modelo captura los aspectos esenciales de las interacciones involucradas en la RA, en vez de enfocarse en sus detalles cinéticos. Reproduce observaciones experimentales y nos permite estudiar las propiedades fundamentales de este complejo proceso de exocitosis. Nuestros resultados muestran que las propiedades de la heterogeneidad fisiológica en una población de espermatozoides influye directamente en la proporción de espermatozoides capaces de realizar la RA, espontánea o inducida por Pg. Además, nuestros resultados sugieren que no solamente los cambios permanentes en el  $\text{pH}_a$  pueden inducir la RA, también perturbaciones transitorias promueven esta reacción en una fracción de la población de espermatozoides. Finalmente, nuestro estudio del régimen dinámico de la red sugiere que la RA es un evento que opera cerca del régimen crítico, en donde existe la mayor probabilidad de que los espermatozoides tengan la robustez necesaria para resistir perturbaciones internas y externas, y al mismo tiempo, sean lo suficientemente adaptables como para reaccionar a estímulos que promuevan la RA, un evento que requiere modificar una gran parte de las características bioquímicas, biofísicas, morfológicas y dinámicas del espermatozoide para llevar a cabo la fecundación.

### 4.1.1. Trabajo futuro

Esta tesis presenta, hasta donde sabemos, la primera red de regulación de la RA en espermatozoides humanos. El trabajo que reportamos representa un punto de partida para estudiar las características dinámicas y fisiológicas de la RA utilizando un modelo matemático computacional. En esta sección proponemos algunas ideas para expandir la investigación desarrollada en esta tesis.

En el capítulo 3 caracterizamos la heterogeneidad fisiológica de una población de espermatozoides. Sin embargo, como mencionamos en el Capítulo 2, nuestro modelo considera los eventos que ocurren entre las etapas tardías de la capacitación y la fusión de membranas y no es adecuado para investigar el origen de la heterogeneidad en la población, cómo cambia durante los diferentes estados del desarrollo y maduración del espermatozoide y el orden de eventos que finalmente promueven los patrones de actividad específicos de cada grupo funcional. Para abordar estas preguntas, nuestro modelo puede expandirse para considerar los eventos que ocurren durante las etapas tempranas de capacitación e incluso la espermatogénesis, con el propósito de evaluar las propiedades de la heterogeneidad en diferentes momentos del desarrollo del espermatozoide y su importancia para la fecundación.

En términos de la construcción de la red, nueva información y datos pueden integrarse en el modelo para ayudar a aclarar las cascadas de señalización que participan en la reacción acrosomal de espermatozoides humanos. Por ejemplo, la dinámica de la polimerización de actina juega un papel vital en la RA. Durante la capacitación, la actina globular se polimeriza en la cabeza del espermatozoide, previniendo la RA a destiempo. Posteriormente, los filamentos de actina se despolimerizan, permitiendo el hinchamiento del acrosoma y la fusión de membranas [Breitbart et al., 2005; Liu et al., 1999; Romarowski et al., 2018]. En esta tesis consideramos esta dinámica en el nodo que representa el hinchamiento del acrosoma, que requiere  $[Ca^{2+}]_i$  y cAMP para activarse. Sin embargo, debe considerarse mucho más ampliamente la dinámica de los complejos patrones de polimerización de la actina globular para determinar cómo afectan a la RA.

La actualización síncrona y determinista son limitaciones importantes de nuestro modelo. Aunque muchos elementos del espermatozoide actualizan sus estados de forma síncrona (por ejemplo, el potencial de membrana reacciona instantáneamente a cambios en las corrientes iónicas), este no es el caso para otros nodos. La descripción cuantitativa de la RA y el ajuste fino a resultados experimentales requiere de modelos más complejos que involucren variables continuas, estocasticidad y ruido. Por ejemplo, la Pg muestra una elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  bifásica, necesaria para la RA [Kirkman-Brown et al., 2000; Sánchez-Cárdenas et al., 2014], mientras que oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  parecen inhibirla [Mata-Martínez et al., 2018; Torrezan-Nitao et al., 2021]. Simons et al. proponen un modelo de ecuaciones diferenciales para reproducir estos patrones de  $[Ca^{2+}]_i$  [Simons and Fauci, 2018]. Incluir la dinámica de polimerización de actina también requerirá variables espacio-tiempo dependientes.

Los modelos discretos pueden extenderse y convertirse en modelos más complejos y descriptivos, por ejemplo para estudiar oscilaciones pronunciadas de  $[Ca^{2+}]_i$  en espermatozoides de erizo de mar [Priego-Espinosa et al., 2020]. En este sentido, nuestro modelo representa un punto de partida para abordar cuantitativamente la complejidad de los

procesos fisiológicos de la RA.

# Bibliografía

- About-Jaoudé, W., Monteiro, P. T., Naldi, A., Grandclaoudon, M., Soumelis, V., Chaouiya, C., and Thieffry, D. (2015). Model Checking to Assess T-Helper Cell Plasticity. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2:86.
- Albert, R. and Othmer, H. G. (2003). The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*. Journal of Theoretical Biology, 223(1):1–18.
- Aldana, M., Balleza, E., Kauffman, S., and Resendiz, O. (2007). Robustness and evolvability in genetic regulatory networks. Journal of Theoretical Biology, 245(3):433–448.
- Aldana, M. and Cluzel, P. (2003). A natural class of robust networks. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(15):8710–8714.
- Aldana, M., Coppersmith, S., and Kadanoff, L. P. (2003). Boolean dynamics with random couplings. Perspectives and Problems in Nonlinear Science, pages 23–89.
- Álvarez-Buylla, E. R., Chaos, Á., Aldana, M., Benítez, M., Cortes-Poza, Y., Espinosa-Soto, C., Hartasánchez, D. A., Lotto, R. B., Malkin, D., Escalera Santos, G. J., and Padilla-Longoria, P. (2008). Floral morphogenesis: Stochastic explorations of a gene network epigenetic landscape. PLoS ONE, 3(11).
- Austin, C. (1951). Observations on the Penetration of the Sperm into the Mammalian Egg. Australian Journal of Biological Sciences, 4(4):581.
- Austin, C. R. (1952). The ‘Capacitation’ of the Mammalian Sperm. Nature, 170(4321):326–326.
- Balbach, M., Gervasi, M. G., Martín-Hidalgo, D., Visconti, P. E., Levin, L. R., and Buck, J. (2020). Metabolic changes in mouse sperm during capacitation. Biology of Reproduction, 1(11).
- Balestrini, P. A., Jabłoński, M., Schiavi-Ehrenhaus, L. J., Clara, ., Marín-Briggiler, I., Claudia Sánchez-Cárdenas, ., Darszon, A., Darío Krapf, ., and Buffone, M. G. (2015). Seeing is believing: Current methods to observe sperm acrosomal exocytosis in real time.
- Balleza, E., Alvarez-Buylla, E. R., Chaos, A., Kauffman, S., Shmulevich, I., and Aldana, M. (2008). Critical Dynamics in Genetic Regulatory Networks: Examples from Four Kingdoms. PLoS ONE, 3(6):e2456.
- Baxendale, R. W. and Fraser, L. R. (2003). Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa. Molecular Reproduction and Development, 66(2):181–189.



- Bedu-Addo, K., Costello, S., Harper, C., Machado-Oliveira, G., Lefievre, L., Ford, C., Barratt, C., and Publicover, S. (2008). Mobilisation of stored calcium in the neck region of human sperm a mechanism for regulation of flagellar activity. The International Journal of Developmental Biology, 52(5-6):615–626.
- Belmonte, S. A., Mayorga, L. S., and Tomes, C. N. (2016). The Molecules of Sperm Exocytosis. Advances in anatomy, embryology, and cell biology, 220:71–92.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., and Ehrlich, B. E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. Nature, 351(6329):751–4.
- Bianchi, E. and Wright, G. J. (2016). Sperm Meets Egg: The Genetics of Mammalian Fertilization. Annual Review of Genetics, 50(1):93–111.
- Blackmore, P. F., Beeben, S. J., Danforth, D. R., and Alexander, N. (1990). Progesterone and 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone NOVEL STIMULATORS OF CALCIUM INFLUX IN HUMAN SPERM. The Journal of Biological Chemistry, 265(3):1376–1380.
- Blas, G. A. D., Roggero, C. M., Tomes, C. N., and Mayorga, L. S. (2005). Dynamics of SNARE Assembly and Disassembly during Sperm Acrosomal Exocytosis. PLoS Biology, 3(10):e323.
- Branham, M. T., Mayorga, L. S., and Tomes, C. N. (2006). Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. Journal of Biological Chemistry, 281(13):8656–8666.
- Bray, C., Son, J. H., and Meizel, S. (2006). Acetylcholine causes an increase of intracellular calcium in human sperm. Molecular Human Reproduction, 11(12):881–889.
- Breitbart, H., Cohen, G., and Rubinstein, S. (2005). Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. Reproduction (Cambridge, England), 129(3):263–8.
- Breuer, K., Foroushani, A. K., Laird, M. R., Chen, C., Sribnaia, A., Lo, R., Winsor, G. L., Hancock, R. E. W., Brinkman, F. S. L., and Lynn, D. J. (2013). InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond—recent updates and continuing curation. Nucleic Acids Research, 41(D1):D1228–D1233.
- Bustos, M. A., Lucchesi, O., Ruete, M. C., Mayorga, L. S., and Tomes, C. N. (2015). Small GTPases in acrosomal exocytosis. Methods in Molecular Biology, 1298:141–160.
- Carteret, H. A., Rose, K. J., and Kauffman, S. A. (2008). Maximum Power Efficiency and Criticality in Random Boolean Networks. Physical Review Letters, 101(21):218702.
- Cerami, E. G., Gross, B. E., Demir, E., Rodchenkov, I., Babur, O., Anwar, N., Schultz, N., Bader, G. D., and Sander, C. (2011). Pathway Commons, a web resource for biological pathway data. Nucleic Acids Research, 39(Database):D685–D690.
- Chae, M. R., Kang, S. J., Lee, K. P., Choi, B. R., Kim, H. K., Park, J. K., Kim, C. Y., and Lee, S. W. (2017). Onion (*Allium cepa* L.) peel extract (OPE) regulates human sperm motility via protein kinase C-mediated activation of the human voltage-gated proton channel. Andrology, 5(5):979–989.

- Chang, M. C. (1951). Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. Nature, 168(4277):697–698.
- Chávez, J. C., de la Vega-Beltrán, J. L., Escoffier, J., Visconti, P. E., Treviño, C. L., Darszon, A., Salkoff, L., and Santi, C. M. (2013). Ion Permeabilities in Mouse Sperm Reveal an External Trigger for SLO3-Dependent Hyperpolarization. PLoS ONE, 8(4):60578.
- Chávez, J. C., De la Vega-Beltrán, J. L., José, O., Torres, P., Nishigaki, T., Treviño, C. L., and Darszon, A. (2018). Acrosomal alkalization triggers Ca<sup>2+</sup> release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. Journal of Cellular Physiology, 233(6):4735–4747.
- Chávez, J. C., Ferreira, J. J., Butler, A., De La Vega Beltrán, J. L., Treviño, C. L., Darszon, A., Salkoff, L., and Santi, C. M. (2014). SLO3 K<sup>+</sup> channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. Journal of Biological Chemistry, 289(46):32266–32275.
- Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Lourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin, L. R., and Buck, J. (2000). Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor. Science, 289(5479):625–628.
- Correia, J., Michelangeli, F., and Publicover, S. (2015). Regulation and roles of Ca<sup>2+</sup> stores in human sperm. Reproduction, 150(2):R56–R76.
- Da Costa, R., Botana, D., Piñero, S., Proverbio, F., and Marín, R. (2016). Cadmium inhibits motility, activities of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase and axonemal dynein-ATPase of human spermatozoa. Andrologia, 48(4):464–469.
- Dan, J. C. (1952). Studies on the Acrosome. I. Reaction to Egg-Water and Other Stimuli. Biological Bulletin, 103(1):54–66.
- Dan, J. C. (1954). Studies on the acrosome. III. Effect of calcium deficiency. The Biological Bulletin, 107(3):335–349.
- Daniel, L., Etkovitz, N., Weiss, S. R., Rubinstein, S., Ickowicz, D., and Breitbart, H. (2010). Regulation of the sperm EGF receptor by ouabain leads to initiation of the acrosome reaction. Developmental Biology, 344(2):650–657.
- Daniels, B. C., Kim, H., Moore, D., Zhou, S., Smith, H. B., Karas, B., Kauffman, S. A., and Walker, S. I. (2018). Criticality Distinguishes the Ensemble of Biological Regulatory Networks. Physical Review Letters, 121(13):138102.
- Darszon, A., Acevedo, J. J., Galindo, B. E., Hernández-González, E. O., Nishigaki, T., Treviño, C. L., Wood, C., and Beltrán, C. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. Reproduction, 131(6):977–988.
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., and Espinosa, F. (1999). Ion Channels in Sperm Physiology. Physiological Reviews, 79(2).
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., and Treviño, C. L. (2011). CALCIUM CHANNELS IN THE DEVELOPMENT , MATURATION , AND FUNCTION OF SPERMATOZOA. Physiological Reviews, 91:1305–1355.
- De Blas, G., Michaut, M., Treviño, C. L., Tomes, C. N., Yunes, R., Darszon, A., and Mayorga, L. S. (2002). The Intraacrosomal Calcium Pool Plays a Direct Role in Acrosomal Exocytosis. Journal of Biological Chemistry, 277(51):49326–49331.

- De La Vega-Beltrán, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Krapf, D., Hernández-González, E. O., Wertheimer, E., Treviño, C. L., Visconti, P. E., and Darszon, A. (2012). Mouse Sperm Membrane Potential Hyperpolarization Is Necessary and Sufficient to Prepare Sperm for the Acrosome Reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53):44384–44393.
- DeCoursey, T. E. (2013). Voltage-Gated Proton Channels: Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology of the HV Family. *Physiological Reviews*, 93(2):599–652.
- del Río, M. J., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M. E., Moreno, R. D., and Vigil, P. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Revista Internacional de Andrología*, 5(4):368–373.
- Derrida, B. and Pomeau, Y. (1986). Random Networks of Automata: A Simple Annealed Approximation. *Europhysics Letters (EPL)*, 1(2):45–49.
- Eisenbach, M. and Giojalas, L. C. (2006). Sperm guidance in mammals — an unpaved road to the egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(4):276–285.
- Espinal, J., Aldana, M., Guerrero, A., Wood, C., Darszon, A., and Martínez-Mekler, G. (2011). Discrete dynamics model for the speract-activated Ca<sup>2+</sup> signaling network relevant to sperm motility. *PLoS ONE*, 6(8):1–11.
- Espinal-Enríquez, J., Priego-Espinosa, D. A., Darszon, A., Beltrán, C., and Martínez-Mekler, G. (2017). Network model predicts that CatSper is the main Ca<sup>2+</sup> channel in the regulation of sea urchin sperm motility. *Scientific Reports*, 7(1):4236.
- Espinosa-Soto, C., Padilla-Longoria, P., and Alvarez-buylla, E. R. (2004). A gene regulatory network model for cell-fate determination during Arabidopsis thaliana flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *Plant Cell*, 16(11):2923–2939.
- Faure, A., Naldi, A., Chaouiya, C., and Thieffry, D. (2006). Dynamical analysis of a generic Boolean model for the control of the mammalian cell cycle. *Bioinformatics*, 22(14):e124–e131.
- Florman, H. and Ducibella, T. (2006). Fertilization in Mammals. In *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction*, pages 55–112. Elsevier.
- Florman, H. M., Tombes, R. M., First, N. L., and Babcock, D. F. (1989). An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca<sup>2+</sup> and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Developmental Biology*, 135(1):133–146.
- Foskett, J. K., White, C., Cheung, K.-H., and Mak, D.-O. D. (2007). Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Physiological reviews*, 87(2):593–658.
- Fukami, K., Nakao, K., Inoue, T., Kataoka, Y., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Nakamura, K., Katsuki, M., Mikoshiba, K., Yoshida, N., and Takenawa, T. (2001). Requirement of Phospholipase C $\delta$ 4 for the Zona Pellucida-Induced Acrosome Reaction. *Science*, 292(5518):920–923.
- Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Yoshida, N., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2003). Phospholipase C $\delta$ 4 is required for Ca<sup>2+</sup> mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *Journal of Cell Biology*, 161(1):79–88.

- Gorelik, J., Gu, Y., Spohr, H. A., Shevchuk, A. I., Lab, M. J., Harding, S. E., Edwards, C. R., Whitaker, M., Moss, G. W., Benton, D. C., Sanchez, D., Darszon, A., Vodyanoy, I., Klenerman, D., and Korchev, Y. E. (2002). Ion channels in small cells and subcellular structures can be studied with a smart patch-clamp system. Biophysical Journal, 83(6):3296–3303.
- Guyonnet, B., Egge, N., and Cornwall, G. A. (2014). Functional Amyloids in the Mouse Sperm Acrosome. Molecular and Cellular Biology, 34(14):2624–2634.
- Harper, C., Wootton, L., Michelangeli, F., Lefèvre, L., Barratt, C., and Publicover, S. (2005). Secretory pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SPCA1) Ca<sup>2+</sup> pumps, not SERCAs, regulate complex [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signals in human spermatozoa. Journal of Cell Science, 118(8):1673–1685.
- Harper, C. V. and Publicover, S. J. (2005). Reassessing the role of progesterone in fertilization—compartmentalized calcium signalling in human spermatozoa? Human Reproduction, 20(10):2675–2680.
- Hasty, J., McMillen, D., and Collins, J. J. (2002). Engineered gene circuits. Nature, 420(6912):224–230.
- Hidalgo, D. M., Romarowski, A., Gervasi, M. G., Navarrete, F., Balbach, M., Salicioni, A. M., Levin, L. R., Buck, J., and Visconti, P. E. (2020). Capacitation increases glucose consumption in murine sperm. Molecular Reproduction and Development, 87(10):1037–1047.
- Huang, S., Eichler, G., Bar-Yam, Y., and Ingber, D. E. (2005). Cell fates as high-dimensional attractor states of a complex gene regulatory network. Physical Review Letters, 94(12).
- Huang, S. and Ingber, D. E. (2000). Shape-Dependent Control of Cell Growth, Differentiation, and Apoptosis: Switching between Attractors in Cell Regulatory Networks. Experimental Cell Research, 261(1):91–103.
- Hutt, D. M., Baltz, J. M., and Ngsee, J. K. (2005). Synaptotagmin VI and VIII and syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction. Journal of Biological Chemistry, 280(21):20197–20203.
- Hutt, D. M., Cardullo, R. a., Baltz, J. M., and Ngsee, J. K. (2002). Synaptotagmin VIII is localized to the mouse sperm head and may function in acrosomal exocytosis. Biology of reproduction, 66(1):50–6.
- Iida, H., Yoshinaga, Y., Tanaka, S., Toshimori, K., and Mori, T. (1999). Identification of Rab3A GTPase as an acrosome-associated small GTP-binding protein in rat sperm. Developmental biology, 211:144–155.
- Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M., and Yanagimachi, R. (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(50):20008–11.
- Jin, J. Y., Chen, W. Y., Zhou, C. X., Chen, Z. H., Yu-Ying, Y., Ni, Y., Chan, H. C., and Shi, Q. X. (2009). Activation of GABAA receptor/Cl<sup>-</sup> channel and capacitation in rat spermatozoa: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Cl<sup>-</sup> are essential. Systems biology in reproductive medicine, 55(2):97–108.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K., and Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(12):4892–4896.

- Joshi-Tope, G. (2004). Reactome: a knowledgebase of biological pathways. Nucleic Acids Research, 33(Database issue):D428–D432.
- Jungnickel, M. K., Sutton, K. A., Wang, Y., and Florman, H. M. (2007). Phosphoinositide-dependent pathways in mouse sperm are regulated by egg ZP3 and drive the acrosome reaction. Developmental Biology, 304(1):116–126.
- Kauffman, S. A. (1969). Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. Journal of Theoretical Biology, 22(3):437–467.
- Kinouchi, O. and Copelli, M. (2006). Optimal dynamical range of excitable networks at criticality. Nature Physics, 2(5):348–351.
- Kirichok, Y., Navarro, B., and Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. Nature, 439(7077):737–740.
- Kirkman-Brown, J., Bray, C., Stewart, P., Barratt, C., and Publicover, S. (2000). Biphasic Elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Individual Human Spermatozoa Exposed to Progesterone. Developmental Biology, 222(2):326–335.
- Kleinboelting, S., Diaz, A., Moniot, S., Van Den Heuvel, J., Weyand, M., Levin, L. R., Buck, J., and Steegborn, C. (2014). Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(10):3727–3732.
- Kumar, P. and Meizel, S. (2008). Identification and spatial distribution of glycine receptor subunits in human sperm. Reproduction, 136(4):387–390.
- Kuzan, F. B., Fleming, a. D., and Seidel, G. E. (1984). Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome-reacted) spermatozoa of the rabbit. Fertility and sterility, 41(5):766–770.
- Lawson, C., Dorval, V., Goupil, S., and Leclerc, P. (2007). Identification and localisation of SERCA 2 isoforms in mammalian sperm. MHR: Basic science of reproductive medicine, 13(5):307–316.
- Lefièvre, L., Nash, K., Mansell, S., Costello, S., Punt, E., Correia, J., Morris, J., Kirkman-Brown, J., Wilson, S. M., Barratt, C. L. R., and Publicover, S. (2012). 2-APB-potentiated channels amplify CatSper-induced Ca(2+) signals in human sperm. The Biochemical journal, 448(2):189–200.
- Li, F., Long, T., Lu, Y., Ouyang, Q., and Tang, C. (2004). The yeast cell-cycle network is robustly designed. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(14):4781–4786.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., Fedorenko, A., and Kirichok, Y. (2010). Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. Cell, 140(3):327–337.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., and Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. Nature, 471(7338):387–391.
- Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J.-J., and Clapham, D. E. (2012). The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. Annual Review of Physiology, 74(1):453–475.

- Liu, D. Y., Martic, M., Clarke, G. N., Dunlop, M. E., and Baker, H. W. (1999). An important role of actin polymerization in the human zona pellucida-induced acrosome reaction. Molecular human reproduction, 5(10):941–9.
- Luque, G. M., Dalotto-Moreno, T., Martín-Hidalgo, D., Ritagliati, C., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Balestrini, P. A., Schiavi-Ehrenhaus, L. J., Gilio, N., Krapf, D., Visconti, P. E., and Buffone, M. G. (2018). Only a subpopulation of mouse sperm displays a rapid increase in intracellular calcium during capacitation. Journal of Cellular Physiology, 233(12):9685–9700.
- Luria, A., Rubinstein, S., Lax, Y., and Breitbart, H. (2002). Extracellular adenosine triphosphate stimulates acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa via P2 purinoceptor. Biol Reprod, 66(2):429–437.
- Mannowetz, N., Miller, M. R., Lishko, P. V., and Clapham, D. E. (2017). Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. PNAS, 114(22):5743–5748.
- Mata-Martínez, E., Darszon, A., and Treviño, C. L. (2018). pH-dependent Ca<sup>2+</sup> oscillations prevent untimely acrosome reaction in human sperm. Biochemical and Biophysical Research Communications, 497(1):146–152.
- Mayorga, L. S., Tomes, C. N., and Belmonte, S. A. (2007). Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. IUBMB Life, 59(4-5):286–292.
- Meizel, S., Turner, K. O., and Nuccitelli, R. (1997). Progesterone Triggers a Wave of Increased Free Calcium during the Human Sperm Acrosome Reaction. Developmental Biology, 182(1):67–75.
- Mendoza, L. and Alvarez-Buylla, E. R. (1998). Dynamics of the genetic regulatory network for *Arabidopsis thaliana* flower morphogenesis. Journal of theoretical biology, 193(2):307–19.
- Mendoza, L. and Alvarez-Buylla, E. R. (2000). Genetic regulation of root hair development in *Arabidopsis thaliana*: a network model. Journal of theoretical biology, 204(3):311–26.
- Mendoza, L., Thieffry, D., and Alvarez-Buylla, E. R. (1999). Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis. Bioinformatics, 15(7):593–606.
- Michaut, M., Tomes, C. N., De Blas, G., Yunes, R., and Mayorga, L. S. (2000). Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(18):9996–10001.
- Miller, M. R., Kenny, S. J., Mannowetz, N., Mansell, S. A., Wojcik, M., Mendoza, S., Zucker, R. S., Xu, K., and Lishko, P. V. (2018). Asymmetrically Positioned Flagellar Control Units Regulate Human Sperm Rotation. Cell Reports, 24(10):2606–2613.
- Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., Hill, R. Z., Bautista, D. M., Kirichok, Y., and Lishko, P. V. (2016). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. Science, 352(6285):555–559.
- Mjolsness, E., Sharp, D. H., and Reinitz, J. (1991). A connectionist model of development. Journal of Theoretical Biology, 152(4):429–453.

- Molina, L. C., Gunderson, S., Riley, J., Lybaert, P., Borrego-Alvarez, A., Jungheim, E. S., and Santi, C. M. (2020). Membrane Potential Determined by Flow Cytometry Predicts Fertilizing Ability of Human Sperm. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 7(January):1–12.
- Morris, M. K., Saez-Rodriguez, J., Sorger, P. K., and Lauffenburger, D. A. (2010). Logic-Based Models for the Analysis of Cell Signaling Networks. Biochemistry, 49(15):3216–3224.
- Murase, T. and Roldan, E. R. S. (1996). Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the sequence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrosomal exocytosis. Biochemical Journal, 320(3):1017–1023.
- Nahed, R. A., Martinez, G., Escoffier, J., Yassine, S., Karaouzène, T., Hograindleur, J. P., Turk, J., Kokotos, G., Ray, P. F., Bottari, S., Lambeau, G., Hennebicq, S., and Arnoult, C. (2016). Progesterone-induced acrosome exocytosis requires sequential involvement of calcium-independent phospholipase A2 $\beta$  (iPLA2 $\beta$ ) and group X secreted phospholipase A2(sPLA2). Journal of Biological Chemistry, 291(6):3076–3089.
- Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K., and Kanazawa, H. (2005). Four Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. Journal of Biological Chemistry, 280(2):1561–1572.
- Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Toshimori, K., and Okabe, M. (2001). Alkalinization of Acrosome Measured by GFP as a pH Indicator and Its Relation to Sperm Capacitation. Developmental Biology, 237(1):222–231.
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A. L., Romero, F., Treviño, C. L., and Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. Biochemical and Biophysical Research Communications, 450(3):1149–1158.
- Nykter, M., Price, N. D., Larjo, A., Aho, T., Kauffman, S. A., Yli-Harja, O., and Shmulevich, I. (2008). Critical Networks Exhibit Maximal Information Diversity in Structure-Dynamics Relationships. Physical Review Letters, 100(5):058702.
- Oberheide, K., Puchkov, D., and Jentsch, T. J. (2017). Loss of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE8 causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. Journal of Biological Chemistry, 292(26):10845–10854.
- Okabe, M. (2016). The Acrosome Reaction: A Historical Perspective. In Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization, pages 1–13. Springer, Cham.
- Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H., and Sugita, Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. Journal of Biological Chemistry, 260(17):9699–9705.
- Orta, G., de la Vega-Beltran, J. L., Martín-Hidalgo, D., Santi, C. M., Visconti, P. E., and Darszon, A. (2018). CatSper channels are regulated by protein kinase A. Journal of Biological Chemistry, 293(43):16830–16841.
- Priego-Espinosa, D. A., Darszon, A., Guerrero, A., González-Cota, A. L., Nishigaki, T., Martínez-Mekler, G., and Carneiro, J. (2020). Modular analysis of the control of flagellar Ca<sup>2+</sup>-spike trains produced by CatSper and CaV channels in sea urchin sperm. PLOS Computational Biology, 16(3):e1007605.

- Ramalho-Santos, J., Moreno, R. D., Sutovsky, P., Chan, a. W., Hewitson, L., Wessel, G. M., Simerly, C. R., and Schatten, G. (2000). SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization. *Developmental biology*, 223(1):54–69.
- Ramalho-Santos, J. and Schatten, G. (2004). Presence of N-ethyl maleimide sensitive factor (NSF) on the acrosome of mammalian sperm. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 50(3):163–168.
- Redecker, P., Kreutz, M. R., Bockmann, J., Gundelfinger, E. D., and Boeckers, T. M. (2003). Brain synaptic junctional proteins at the acrosome of rat testicular germ cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 51(6):809–19.
- Romarowski, A., Velasco Félix, Á. G., Torres Rodríguez, P., Gervasi, M. G., Xu, X., Luque, G. M., Contreras-Jiménez, G., Sánchez-Cárdenas, C., Ramírez-Gómez, H. V., Krapf, D., Visconti, P. E., Krapf, D., Guerrero, A., Darszon, A., and Buffone, M. G. (2018). Super-resolution imaging of live sperm reveals dynamic changes of the actin cytoskeleton during acrosomal exocytosis. *Journal of Cell Science*.
- Romero, M. F., Chen, A.-P., Parker, M. D., and Boron, W. F. (2013). The SLC4 family of bicarbonate transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3):159–182.
- Rossato, M., Di Virgilio, F., Galeazzi, C., and Foresta, C. (2001). Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: Role of calcium and plasma membrane potential. *Molecular Human Reproduction*, 7(2):119–128.
- Rossato, M., Ferigo, M., Galeazzi, C., and Foresta, C. (2005). Estradiol inhibits the effects of extracellular ATP in human sperm by a non genomic mechanism of action. *Purinergic Signalling*, 1(4):369–375.
- Salazar-Ciudad, I. and Jernvall, J. (2002). A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12):8116–8120.
- Sánchez-Cárdenas, C., Servín-Vences, M. R., José, O., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A., and Darszon, A. (2014). Acrosome Reaction and Ca<sup>2+</sup> Imaging in Single Human Spermatozoa: New Regulatory Roles of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Biology of Reproduction*, 91(3):1–13.
- Schaefer, C. F., Anthony, K., Krupa, S., Buchoff, J., Day, M., Hannay, T., and Buetow, K. H. (2009). PID: the Pathway Interaction Database. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl 1):D674–D679.
- Schmeitz, C., Hernandez-Vargas, E. A., Fliegert, R., Guse, A. H., and Meyer-Hermann, M. (2013). A Mathematical Model of T Lymphocyte Calcium Dynamics Derived from Single Transmembrane Protein Properties. *Frontiers in Immunology*, 4(SEP):277.
- Schuffner, A. a., Bastiaan, H. S., Duran, H. E., Lin, Z.-Y., Morshedi, M., Franken, D. R., and Oehninger, S. (2002). Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Molecular human reproduction*, 8(8):722–7.
- Schuh, K., Cartwright, E. J., Jankevics, E., Bundschu, K., Liebermann, J., Williams, J. C., Armesilla, A. L., Emerson, M., Oceandy, D., Knobloch, K. P., and Neyses, L. (2004). Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27):28220–28226.



- Schulz, J. R., Sasaki, J. D., and Vacquier, V. D. (1998). Increased association of synaptosome-associated protein of 25 kDa with syntaxin and vesicle-associated membrane protein following acrosomal exocytosis of sea urchin sperm. Journal of Biological Chemistry, 273(38):24355–24359.
- Shur, B. D., Rodeheffer, C., Ensslin, M. A., Lyng, R., and Raymond, A. (2006). Identification of novel gamete receptors that mediate sperm adhesion to the egg coat. Molecular and Cellular Endocrinology, 250(1-2):137–148.
- Simons, J. and Fauci, L. (2018). A Model for the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. Bulletin of Mathematical Biology, 80(9):2481–2501.
- Snell, W. J. and White, J. M. (1996). The Molecules of Mammalian Fertilization. Cell, 85(5):629–637.
- Soriano-Úbeda, C., Romero-Aguirregomezcorta, J., Matás, C., Visconti, P. E., and García-Vázquez, F. A. (2019). Manipulation of bicarbonate concentration in sperm capacitation media improves in vitro fertilisation output in porcine species. Journal of Animal Science and Biotechnology, 10(19).
- Sosa, C. M., Pavarotti, M. A., Zanetti, M. N., Zoppino, F. C. M., De Blas, G. A., and Mayorga, L. S. (2014). Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. Molecular Human Reproduction, 21(3):244–254.
- Sosa, C. M., Zanetti, M. N., Pocognoni, C. A., and Mayorga, L. S. (2016). Acrosomal Swelling Is Triggered by cAMP Downstream of the Opening of Store-Operated Calcium Channels During Acrosomal Exocytosis in Human Sperm. Biology of reproduction, 94(3):57.
- Steebhorn, C. (2014). Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases — similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1842(12):2535–2547.
- Stival, C., Puga Molina, L. D. C., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E., and Krapf, D. (2016). Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. Advances in anatomy, embryology, and cell biology, 220:93–106.
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> influx in human sperm. Nature, 471(7338):382–387.
- Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. Human Reproduction Update, 14(6):647–657.
- Suhaiman, L., De Blas, G. A., Obeid, L. M., Darszon, A., Mayorga, L. S., and Belmonte, S. A. (2010). Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinase are involved in a novel signaling pathway leading to acrosomal exocytosis. Journal of Biological Chemistry, 285(21):16302–16314.
- Sun-Wada, G.-H., Imai-Senga, Y., Yamamoto, A., Murata, Y., Hirata, T., Wada, Y., and Futai, M. (2002). A Proton Pump ATPase with Testis-specific E1-Subunit Isoform Required for Acrosome Acidification. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 277(20):18098–18105.

- Teves, M. E., Guidobaldi, H. A., Uñates, D. R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S. J., Morales Garcia, A. A., and Giojalas, L. C. (2009). Molecular Mechanism for Human Sperm Chemotaxis Mediated by Progesterone. PLoS ONE, 4(12):e8211.
- Thieffry, D. (2007). Dynamical roles of biological regulatory circuits. Briefings in Bioinformatics, 8(4):220–225.
- Tomes, C. N. (2015). The proteins of exocytosis: lessons from the sperm model. The Biochemical journal, 465(3):359–70.
- Tomes, C. N., De Blas, G. A., Michaut, M. A., Farré, E. V., Cherhitin, O., Visconti, P. E., and Mayorga, L. S. (2005).  $\alpha$ -SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. Molecular Human Reproduction, 11(1):43–51.
- Tomes, C. N., Michaut, M., De Blas, G., Visconti, P., Matti, U., and Mayorga, L. S. (2002). SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. Developmental biology, 243(2):326–338.
- Torrezan-Nitao, E., Brown, S. G., Mata-Martínez, E., Treviño, C. L., Barratt, C., and Publicover, S. (2021).  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in human sperm are triggered in the flagellum by membrane potential-sensitive activity of CatSper. Human Reproduction, 36(2):293–304.
- Trejo, R. and Mújica, A. (1990). Changes in calmodulin compartmentalization throughout capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. Molecular Reproduction and Development, 26(4):366–376.
- Visconti, P., de la Vega-Beltrán, J. L., Acevedo, J. J., and Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. Asian Journal of Andrology, 13:395–405.
- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., Olds-clarke, P., and Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. Development, 1150:1139–1150.
- Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., and Diekman, A. B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. Journal of Reproductive Immunology, 53(1-2):133–150.
- Von Dassow, G., Meir, E., Munro, E. M., and Odell, G. M. (2000). The segment polarity network is a robust developmental module. Nature, 406(6792):188–192.
- Wang, D., Hu, J., Bobulescu, I. A., Quill, T. a., McLeroy, P., Moe, O. W., and Garbers, D. L. (2007). A sperm-specific  $Na^+/H^+$  exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(22):9325–9330.
- Ward, C. R., Faundes, D., and Foster, J. A. (1999). The monomeric GTP binding protein, rab3a, is associated with the acrosome in mouse sperm. Molecular Reproduction and Development, 53(4):413–421.
- Wassarman, P. M. and Litscher, E. S. (2009). The multifunctional zona pellucida and mammalian fertilization. Journal of Reproductive Immunology, 83(1-2):45–49.

- Wistrom, C. A. and Meizel, S. (1993). Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl<sup>-</sup> channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. Developmental biology, 159(2):679–690.
- Yang, J.-M., Lee, C.-K., and Cho, K.-H. (2018). Global Stabilization of Boolean Networks to Control the Heterogeneity of Cellular Responses. Frontiers in Physiology, 9(JUL).
- Yudin, A. I., Gottlieb, W., and Meizel, S. (1988). Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. Gamete research, 20(1):11–24.
- Yunes, R., Michaut, M., Tomes, C., and Mayorga, L. S. (2000). Rab3A Triggers the Acrosome Reaction in Permeabilized Human Spermatozoa. BIOLOGY OF REPRODUCTION, 62:1084–1089.
- Zhang, D. and Gopalakrishnan, M. (2005). Sperm ion channels: Molecular targets for the next generation of contraceptive medicines? Journal of Andrology, 26(6):643–653.
- Zhang, X., Zeng, X., and Lingle, C. J. (2006). Slo3 K<sup>+</sup> Channels: Voltage and pH Dependence of Macroscopic Currents. The Journal of General Physiology, 128(3):317–336.
- Zhao, L., Shi, X., Li, L., and Miller, D. J. (2007). Dynamin 2 associates with complexins and is found in the acrosomal region of mammalian sperm. Molecular Reproduction and Development, 74(6):750–757.