



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

**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL CANAL DE CALCIO
CATSPER EN ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

BIÓL. VERÓNICA LOYO CELIS

DIRECTOR DE TESIS

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

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

**DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. FRANCISCO RAFAEL FERNÁNDEZ DE MIGUEL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. FROYLAN MIGUEL GÓMEZ LAGUNAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. JANET MURBARTIÁN AGUILAR
CINVESTAV, IPN**

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO 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.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo se realizó en el Consorcio de Fisiología del Espermatozoide (laboratorio dieciséis) del Departamento de Biología del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, Morelos), bajo la supervisión del Dr. Alberto Darszon.

Se contó con la asesoría técnica de:

- Biól. José Luis de la Vega Beltrán
- M.C. Yoloxóchitl Sánchez Guevara
- Q.F.B. Xóchitl del Carmen Alvarado Affantranger

Se recibió financiamiento de

- CONACYT: 435022
- PAPIIT-UNAM: IN200919 (A.D.) e IN215519 (C.B.)
- CONACYT Frontiers 71

Agradecimiento especial al Dr. Luis Vaca Domínguez, por los comentarios y sugerencias efectuados a mi trabajo.

ÍNDICE:

• ABREVIATURAS	1
• ABSTRACT	3
• RESUMEN	4
• INTRODUCCIÓN	
○ El espermatozoide de erizo de mar	5
○ La quimiotaxis	6
○ El canal de Ca ²⁺ CatSper	8
▪ Relevancia fisiológica	8
▪ Propiedades estructurales y biofísicas	8
▪ Fosforilación del canal CatSper	10
▪ CatSper y la cascada de señalización inducida por speract	11
○ El canal de Cloruro activado por Calcio	11
• HIPÓTESIS	12
• OBJETIVOS	12
○ Objetivo general	12
○ Objetivos particulares	12
• MATERIAL Y MÉTODOS	13
• RESULTADOS	18
• DISCUSIÓN	32
• CONCLUSIONES	35
• PERSPECTIVAS	36
• REFERENCIAS	37
• APÉNDICE	41

ABREVIATURAS

- **AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
- **ASW:** Agua de mar artificial
- **BSA:** Albúmina de suero bovino
- **°C:** Grados Celsius
- **Ca²⁺:** Calcio
- **[Ca²⁺]_i:** Calcio intracelular
- **1CaASW:** Agua de mar artificial + 1 mM CaCl₂
- **CaCC:** Canal de Cloruro activado por Calcio
- **CaKC:** Canal de Potasio activado por Calcio
- **Cl⁻:** Cloruro
- **DSW:** Agua de mar artificial diluida
- **DVF:** Solución libre de cationes divalentes
- **Em:** Potencial de membrana
- **G:** Conductancia
- **G_{max}:** Conductancia máxima
- **GMPc:** Guanosín monofosfato cíclico
- **I_{CatSper}:** Corriente CatSper
- **I-V:** Relación corriente-voltaje
- **K⁺:** Potasio
- **KH₂PO₄:** Fosfato monopotásico
- **kHz:** Kilohercio
- ***L. pictus:*** *Lytechinus pictus*
- **M:** Molar
- **Mibe:** Mibefradil
- **mL:** Mililitro
- **mm:** Milímetro
- **mM:** Milimolar
- **MΩ:** Megaohm
- **ms:** Milisegundo

- **mV:** Milivoltio
- **n:** Número de experimentos independientes
- **Na⁺:** Sodio
- **Na₂HPO₄:** Fosfato de sodio dibásico
- **NFA:** Ácido niflúmico
- **nM:** Nanomolar
- **NNC:** NNC55-0396
- **p:** Valor p
- **pA:** Picoamperio
- **PBS:** Solución buffer de fosfatos
- **pH_a:** Potencial de Hidrógeno acrosomal
- **pH_i:** Potencial de Hidrógeno intracelular
- **PKA:** Proteína cinasa A
- **PM:** Peso molecular
- **RU:** RU1968
- **s:** Segundo
- **s.e.m:** Error estándar de la media
- ***S. purpuratus:*** *Strongylocentrotus purpuratus*
- **T16Ainh:** T16Ainh-A01
- **μL:** Microlitro
- **μm:** Micrometro
- **μM:** Micromolar
- **V_{1/2}:** Potencial de activación medio

ABSTRACT

Sea urchin sperm swimming is regulated by speract, a decapeptide released from egg jelly that induces chemotaxis and triggers membrane potential (E_m) changes, intracellular increases in cyclic nucleotides (cGMP, cAMP), pH (pH_i) and calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$). The identity of the ionic transporters associated with these $[Ca^{2+}]_i$ changes required for chemotaxis remains unknown. CatSper, a sperm exclusive Ca^{2+} channel has been detected by proteomic analysis and immunofluorescence in sea urchin sperm and there is evidence for its involvement in chemotaxis. This work presents an electrophysiological characterization of a CatSper channel in sea urchin sperm. Swelling of sperm by suspending them in 10-fold diluted artificial sea water (DSW) allowed us to achieve on-cell patch-clamp recordings that document a mildly voltage- and pH_i - dependent Na^+ permeable channel (in the absence of divalent ions in the pipette). This channel was sensitive to speract and blocked by Mibefradil (Mibe), NNC55-0396 (NNC) and RU1968 (RU) resembling CatSper. Moreover, we also report the presence of a voltage dependent Cl^- channel inhibited by Niflumic Acid and the TMEM16A blocker, T16Ainh.

Keywords: *calcium / CatSper / patch-clamp / sea urchin / sperm.*

RESUMEN

El patrón de nado de los espermatozoides de erizo de mar está regulado por speract, un decapeptido embebido en la gelatina del óvulo, el cual induce quimiotaxis, desencadena cambios en el potencial de membrana (E_m), aumento intracelular de nucleótidos cíclicos (GMPc, AMPc), pH (pH_i) y calcio ($[Ca^{2+}]_i$). La identidad de los transportadores iónicos asociados al cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ indispensable para la quimiotaxis, aún no se ha dilucidado.

CatSper, un canal de Ca^{2+} que se expresa exclusivamente en el espermatozoide, se ha detectado mediante análisis proteómico e inmunofluorescencia en espermatozoides de erizo de mar y existe evidencia de su participación en la quimiotaxis.

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización electrofisiológica del canal CatSper en espermatozoides de erizo de mar (hinchados) mediante la técnica de patch-clamp en la configuración de fijación de voltaje en célula adherida, registrándose así un canal iónico dependiente de voltaje que posee las características descritas para CatSper, como se describe a continuación: conduce cationes monovalentes, se estimula por el incremento del pH_i , es sensible a speract, débilmente dependiente de voltaje y se bloquea con Mibefradil (Mibe), NNC55-0396 (NNC) (inhibidores de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes) y RU1968 (RU). Aunado a esto, se registró un canal de Cl^- dependiente de voltaje inhibido por ácido niflúmico (NFA) y T16Ainh (bloqueador específico del canal TMEM16A).

Palabras clave: calcio / CatSper / erizo de mar / espermatozoide / patch-clamp.

INTRODUCCIÓN

○ El espermatozoide de erizo de mar:

Los erizos de mar son ampliamente utilizados en estudios de Biología del Desarrollo debido a que liberan un elevado número de gametos al mar. El gameto masculino, el espermatozoide, está constituido por una cabeza de 2-4 μm de diámetro y un flagelo de 50 μm de longitud. El flagelo, posee una estructura denominada axonema, la cual permite la motilidad de los espermatozoides (Darszon et al, 2011; Lin y Nicastro, 2018) y está conformada por 9 pares externos de microtúbulos y un par central (**Figura 1**). En el flagelo se localiza el receptor a speract, un decapeptido (GFDLNGGGVG) embebido en la gelatina de los óvulos de las hembras, el cual induce una cascada de señalización (**Figura 2**).

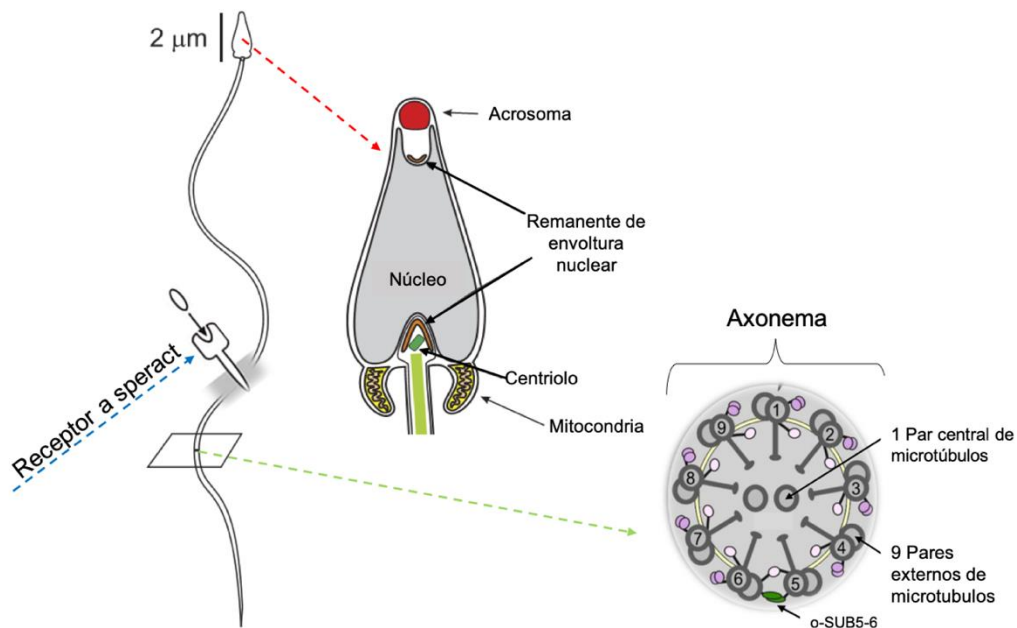


Figura 1. Estructura del espermatozoide de erizo de mar. El espermatozoide de erizo de mar está conformado por la cabeza (flecha roja) y el flagelo (flecha verde claro). La cabeza está integrada por el acrosoma (rojo), el núcleo (gris), remanentes de la envoltura nuclear (café), el centriolo (verde oscuro) y la mitocondria (amarillo) localizada en la base de la cabeza. El flagelo está constituido por el axonema (esquema inferior derecho, en el cual se representa un corte transversal del flagelo donde se puede observar la distribución de los componentes del axonema) y es en esta estructura donde se localiza el receptor a speract (flecha azul) (Imagen modificada de Darszon et al, 2011; Lin y Nicastro, 2018).

La unión del speract a su receptor desencadena procesos bioquímicos y electrofisiológicos que conducen al incremento intracelular de nucleótidos cíclicos (GMPc, AMPc) y pH (pHi), así como cambios en el potencial de membrana provocados por flujos iónicos de Cl⁻, K⁺ y Na⁺ (**Figura 2**). Estos eventos a su vez, ocasionan fluctuaciones en la concentración de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) que controlan el batido flagelar. La regulación de las propiedades del batido flagelar esta íntimamente relacionada con un proceso fisiológico denominado quimiotaxis.

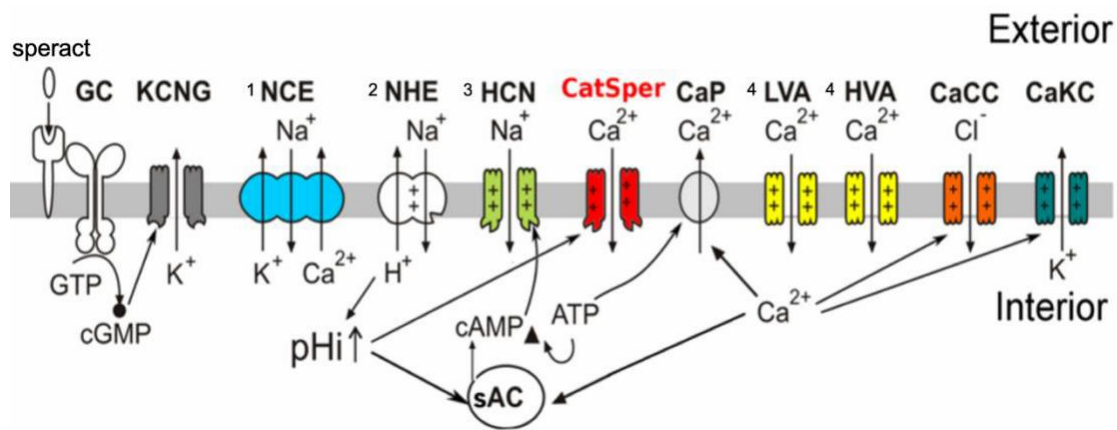


Figura 2. Cascada de señalización inducida por speract en espermatozoides de erizo de mar de la especie *S. purpuratus*. Posterior a la unión del speract a su receptor localizado en el flagelo, se activa la enzima Guanilato Ciclasa (GC) la cual promueve la síntesis de GMPc, este segundo mensajero conduce a la apertura del canal de K⁺, KCNG que hiperpolariza el potencial de membrana. La hiperpolarización: 1) Estimula al intercambiador K⁺/Na⁺/Ca²⁺ (NCE) el cual disminuye la [Ca²⁺]_i. 2) Activa al intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE) que induce un incremento del pH_i. 3) Activa al canal de Na⁺ regulado por AMPc (HCN). 4) Remueve la inactivación de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje de bajo y alto umbral (LVA y HVA). El incremento de pH_i a su vez activa al canal de Ca²⁺ CatSper y de manera indirecta al canal HCN. El flujo de Ca²⁺ estimula al canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ (CaCC) y al canal de K⁺ activado por Ca²⁺ (CaKC), ambos canales reinician la vía a través de una nueva hiperpolarización (Imagen modificada de Espinal-Enríquez et al, 2017).

○ La quimiotaxis:

La quimiotaxis, al igual que la capacitación y la reacción acrosomal, constituyen eventos fundamentales en la fisiología del espermatozoide. La quimiotaxis involucra la regulación de las propiedades del batido flagelar de los espermatozoides que dirige su nado hacia la fuente del gradiente de atrayente químico, el óvulo (**Figura**

3) (Wood et al, 2005; Kaupp et al, 2008; Guerrero et al, 2010). Durante la quimiotaxis se desencadena la cascada de señalización inducida por speract (**Figura 2**) en la cual, entre otros eventos, ocurre un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Eisenbach et al, 2006; Darszon et al, 2008; Espinal et al, 2017).

La entidad molecular principal involucrada en el transporte del Ca^{2+} en espermatozoides de mamífero corresponde al canal CatSper (Kirichok et al, 2006; Lishko et al, 2011; Strünker et al, 2011; Smith et al, 2013). En espermatozoides de erizo de mar de la especie *Arbacia punctulata*, se demostró que CatSper está presente (**Figura 4**) y se ha sugerido que es el canal más importante que regula el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la quimiotaxis (Seifert et al, 2015).

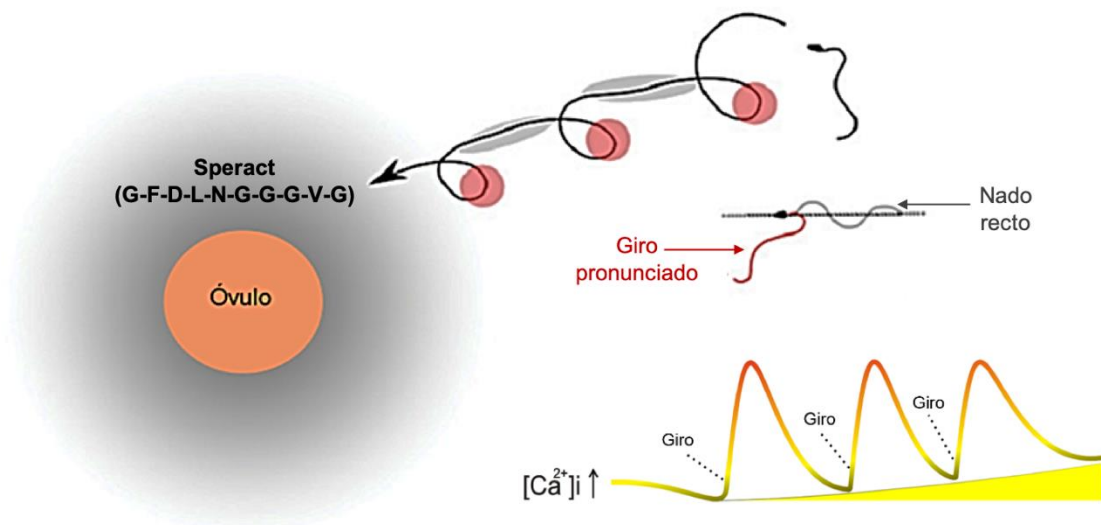


Figura 3. Quimiotaxis en espermatozoides de erizo de mar. Gradiente de speract derivado de la gelatina que recubre al óvulo (panel izquierdo). Este decapeptido ocasiona fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ (panel inferior derecho) que regulan la motilidad del espermatozoide (panel superior derecho) generando periodos de nado recto (gris) seguidos de giros pronunciados (rojo) (Imagen modificada de Guerrero et al, 2010).

- **El canal de Ca²⁺ CatSper:**
- **Relevancia fisiológica:** CatSper se expresa específicamente en el flagelo del espermatozoide (Chung et al, 2017; Hwang et al, 2019). Este canal se ha detectado por análisis proteómico e inmunocitoquímico en espermatozoides de erizo de mar (**Figura 4**) (Seifert et al, 2015; Espinal-Enríquez et al, 2017). En espermatozoides de mamífero CatSper regula la hiperactivación, induce un incremento en la [Ca²⁺]_i y es esencial para la fecundación. Ratones nulos a CatSper (CatSper^{-/-}) son infértiles debido a que sus espermatozoides no pueden hiperactivarse (Ren et al, 2001; Smith et al, 2013). Se le llama hiperactivación al batido flagelar de los espermatozoides de mamífero que resulta de la capacitación. Este batido es muy asimétrico, de amplitud grandes y muy propulsivo (Chang y Suarez, 2010).



Figura 4. Expresión del canal CatSper en espermatozoides de erizo de mar. Inmunocitoquímica efectuada con el anticuerpo anti-ApCatSper3 en espermatozoides de erizo de mar de la especie *Arbacia punctulata*. Se puede observar la expresión de CatSper a lo largo del flagelo (tinción roja) y el ADN (tinción azul) teñido con DAPI (barra de escala=10 μm) (Imagen modificada de Seifert et al, 2015).

- **Propiedades estructurales y biofísicas:** El canal de Ca²⁺ CatSper está constituido por cuatro subunidades alfa (α), seis segmentos transmembranales (S1-S6), el S4 constituye el sensor de voltaje y entre S5 y S6 se localiza el

poro. Además, de las subunidades α , este canal posee siete subunidades accesorias ($\beta, \gamma, \delta, \epsilon, \eta, \zeta$ y EFCAB9) (Hwang et al, 2019) y dos proteínas asociadas (TMEM249 unida a la subunidad accesoria η y SLCO6C1 unida a la subunidad accesoria ϵ) (**Figura 5**) caracterizadas a partir de experimentos de criomicroscopía en los cuales se resolvió la estructura de este canal (Lin et al, 2021).

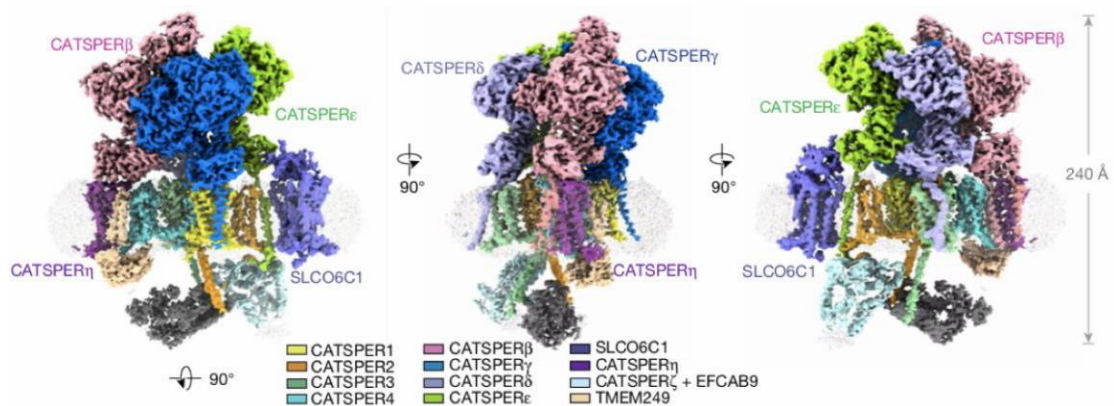


Figura 5. Estructura del canal de Ca^{2+} CatSper. Criomicroscopía del canal CatSper integrado por cuatro subunidades α formadoras del poro (CatSper1-4), siete subunidades accesorias ($\beta, \gamma, \delta, \epsilon, \eta, \zeta$ y EFCAB9) de las cuales dos (ζ y EFCAB9) son citosólicas y dos proteínas asociadas (TMEM249 y SLCO6C1) que constituyen el complejo *CatSpersoma*. (Imagen modificada de Lin et al, 2021).

Debido a la relevancia fisiológica de esta macromolécula, se han caracterizado sus propiedades biofísicas en mamíferos. CatSper conduce selectivamente una corriente de Ca^{2+} , manifiesta una débil dependencia al voltaje y una fuerte dependencia al pH_i (se activa con pH alcalino, $V_{1/2} = \pm 11$ mV) (Kirichok et al, 2006), se bloquea con inhibidores de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes: HC-056456 ($\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M}$, espermatozoides de ratón), NNC55-0396 ($\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$, espermatozoides de humano), Mibefradil ($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$, espermatozoides de humano) y RU1968 ($\text{IC}_{50} = 0.4 \mu\text{M}$, espermatozoides de humano y $10 \mu\text{M}$, espermatozoides de ratón) y también se regula por la

proteína cinasa A (PKA) (Carlson et al, 2009; Lishko et al, 2011; Brenker et al, 2012; Rennhack et al, 2018; Orta et al 2018). No obstante, este canal no se ha podido expresar heterológamente, lo que obstaculiza el estudio de las relaciones entre su estructura y su función.

- Fosforilación del canal CatSper:** Actualmente existe una controversia en el campo de estudio de la fisiología del espermatozoide respecto al rol de la fosforilación en el canal CatSper. A partir de mediciones de Ca^{2+} intracelular y registros electrofisiológicos en espermatozoides de ratón se reportó que la Proteína Cinasa A (PKA) regula la actividad de CatSper mediante fosforilación mejorando así su capacidad para conducir e incrementar el $[Ca^{2+}]_i$ (**Figura 6**) (Orta et al, 2018), no obstante, en espermatozoides de humano a partir de ensayos de fluorimetría, optoquímica y patch-clamp se determinó que CatSper no es activado vía PKA (Wang et al, 2020). En espermatozoides de erizo de mar el papel de la fosforilación en el canal CatSper no ha sido evaluado.

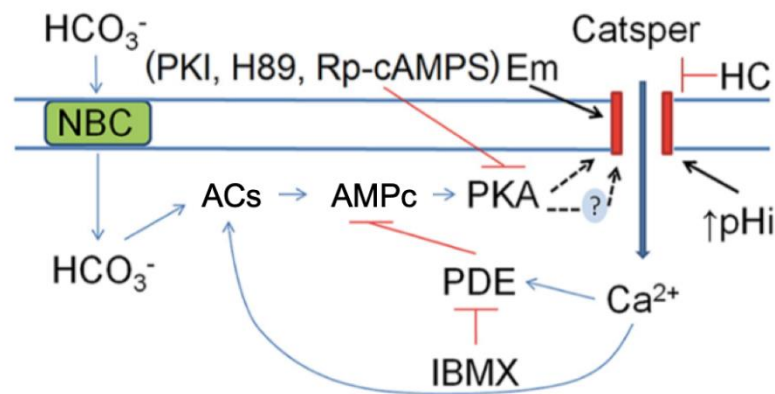


Figura 6. Modelo propuesto para la activación del canal CatSper vía PKA en espermatozoides de ratón. Durante la capacitación, los espermatozoides están expuestos a altas concentraciones de Bicarbonato de sodio (HCO_3^-) compuesto que permea al interior celular a través del cotransportador Na^+/HCO_3^- (NBC) y estimula a la Adenilato Ciclasa Soluble (ACs) la cual eleva el Adenosin Monofosfato Cíclico (AMPc) activando así a la Proteína Cinasa A (PKA) que estimula al canal CatSper (Imagen modificada de Orta et al, 2018).

- **CatSper y la cascada de señalización inducida por speract:**

En espermatozoides de erizo de mar el Ca^{2+} es un catión esencial que modula el nado del espermatozoide en respuesta a péptidos quimioatrayentes como el speract (Guerrero et al, 2010), el cual desencadena una cascada de señalización (**Figura 2**) en la que se produce un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se ha reportado que CatSper es el principal canal involucrado en el transporte de Ca^{2+} en espermatozoides de erizo de mar (Seifert et al, 2015).

- **El canal de Cloruro activado por Calcio (TMEM16A)**

En espermatozoides de humano se ha reportado la expresión funcional del canal TMEM16A, el cual regula la reacción acrosomal (Orta et al, 2012), mientras que en espermatozoides de erizo de mar (mediante análisis proteómico) se ha detectado la expresión del canal TMEM16A (Beltrán et al, 2016) que forma parte de las entidades moleculares involucradas en la cascada de señalización inducida por speract (Espinal-Enríquez et al, 2017).

El canal de cloruro TMEM16A pertenece a la familia de anoctaminas, está constituido por 10 hélices transmembranales, entre la hélice 7 y 8 se localiza el sitio de unión a Ca^{2+} , catión que en un intervalo de concentración fisiológica intracelular (0.2-1 μM) incrementa la probabilidad de apertura del canal (Morales et al, 1993). El canal TMEM16A es inhibido por múltiples compuestos entre los cuales destacan: ácido niflúmico (NFA), ácido 4,4'-diisotiocianostilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS), 2-(4-cloro-2-metilfenoxi)-N'-(2-metoxibencilideno) acetohidrazida (Ani9), ácido 6-(1,1-dimetiletil)-2-[(2-

furanilcarbonil)amino]-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxílico (CaCCinh-A01) y 2-[(5-etil-1,6-dihidro-4-metil-6-oxo-2-pirimidinil)tio]-N-[4-(4-metoxifenil)-2tiazolil] acetamida (T16Ainh-A01) siendo este ultimo uno de los bloqueadores más específicos para este canal (Ji et al, 2019).

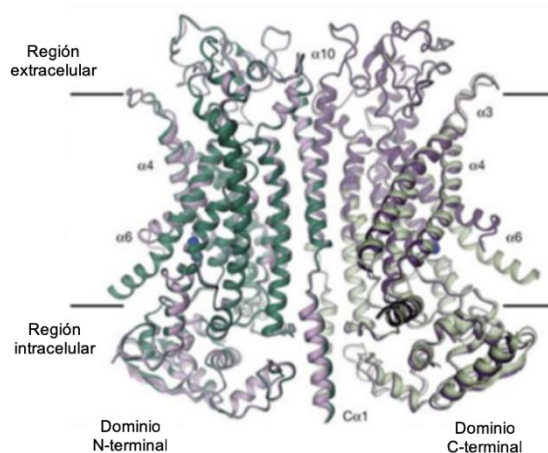


Figura 7. Estructura del canal TMEM16A. Criomicroscopía electrónica que muestra que el canal TMEM16A integrado por 10 subunidades α , en la región intracelular se localiza el dominio N y C-terminal y entre el segmento $\alpha 7$ y 8 se localiza el sitio de unión a Ca^{2+} (Imagen modificada de Ji et al, 2019).

HIPÓTESIS

El canal de Ca^{2+} CatSper es una entidad molecular que en espermatozoides de erizo de mar regula el flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Caracterizar funcionalmente (mediante registros electrofisiológicos) al canal de Ca^{2+} CatSper en espermatozoides de erizo de mar.

Objetivos particulares:

- Caracterizar la dependencia en el voltaje y pH_i del canal CatSper, mediante registros de fijación de voltaje.
- Evaluar la farmacología del canal CatSper.
- Caracterizar las propiedades de la I_{CatSper} en respuesta al speract.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos: Ácido níflúmico, CaCl₂, EDTA, EGTA, Gluconato de sodio, HEPES, KCl, MgCl₂, Mibefradil, NaCl, NH₄Cl, NNC55-0396, T16Ainh-A01 y Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Toluca, Estado de México, México). Fluo-4 (Molecular Probes, Eugene, Oregón, EUA). Speract (fue proporcionado por el Dr. Yoshiro Tatsu) y RU1968 (fue proporcionado por el Dr. Timo Strünker). La composición del agua de mar artificial (ASW, por sus siglas en inglés) que se utilizó contenía [mM]: 465 NaCl, 26 MgCl₂, 30 MgClO₄, 10 CaCl₂, 2.5 NaHCO₃, 0.1 EDTA y 10 HEPES (pH=8.0 ajustado con NaOH). 1CaASW corresponde a ASW + 1 mM CaCl₂ (pH=7.4). La osmolaridad de ambas ASW fue de 980-1000 mOsm. La composición del agua de mar artificial diluida (DSW) fue [mM]: 49 NaCl, 1 CaCl₂, 25 MgCl₂, 1 KCl, 10 HEPES y 0.1 EDTA (pH=7.4 ajustado con NaOH). La osmolaridad del DSW fue de 155 mOsm.

Obtención de espermatozoides de erizo de mar: Los experimentos con erizos de mar se llevaron a cabo en conformidad con las regulaciones locales, estatales y nacionales para el uso de animales. Los erizos de mar de las especies *Lytechinus pictus* y *Strongylocentrotus purpuratus* se adquirieron en Marinus Scientific LLC (Long Beach, California, EUA) y Pamanes Inc. (Ensenada, Baja California, México) respectivamente. Ambas especies se mantuvieron a 15°C en ASW de la marca comercial Instant Ocean (Blacksburg, Virginia, EUA). Los espermatozoides se obtuvieron mediante la inyección intracelómica de 0.5 M de KCl (0.5-1 mL), se colectaron en tubos eppendorf de 0.6-1.5 mL y se mantuvieron en hielo hasta su uso.

Anticuerpos: El anticuerpo policlonal anti-CatSper1 (anticuerpo primario), se generó en Bio-Synthesis Inc (www.biosyn.com) a partir de dos péptidos antigénicos (AB1327-1: NH₂-CERDALRKAALKEAEDALFDDCOOH y AB1327-2: NH₂-CNQQGTLDKVLLVQDTVDD-COOH) sintetizados con base en la secuencia predicha para la subunidad CatSper1 del genoma de *S. purpuratus* (XP_030854941.1; PM=54440 Da). El anticuerpo secundario utilizado en este trabajo fue el Alexa Fluor 488 anti-conejo (Invitrogen™-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Inmunofluorescencia: La muestra de espermatozoides de erizo de mar se diluyó 1:300 en 1CaASW y se centrifugó a 300g por 5 minutos a 4°C. Los espermatozoides contenidos en el sobrenadante se diluyeron 1:100 en ASW y se centrifugaron a 1000g por 10 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se diluyó 1:100 en DSW para inducir hinchamiento celular (Sánchez et al, 2001).

Posteriormente, se transfirieron 50 µL de la suspensión de espermatozoides hinchados a cada uno de los tres pozos contenidos en un portaobjetos colocado dentro de una cámara húmeda en la cual se dejaron por 1 hora a 4°C. Transcurrido el tiempo, las células pegadas en los pozos del portaobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos, inmediatamente se lavaron 3 veces con PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ y 2 mM KH₂PO₄) durante 5 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% durante 10 minutos. En seguida, los espermatozoides se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos y se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 2% durante 2 horas a 4°C.

Posterior al bloqueo con BSA, las células se incubaron toda la noche a 4°C con el

anticuerpo primario (anti-CatSper1) y como control con el anticuerpo primario + la mezcla de péptidos antigénicos: AB1327-1 y AB1327-2.

A continuación, los espermatozoides se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488 (anti-conejo, diluido 1:500 en PBS) durante 1 hora a 25°C.

Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos, se adicionaron 2 µL de Citifluor a cada pozo del portaobjetos (para evitar fotoblanqueo) y se colocó un cubreobjetos de 24x50 mm, el cual se selló con esmalte. Las laminillas obtenidas se observaron en el microscopio confocal invertido Olympus FV100, objetivo 60x.

Medición de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de erizo de mar: Los espermatozoides de erizo de mar se diluyeron 1:5 en 1CaASW y se cargaron con el colorante Fluo-4 (20 µM) durante 3 h a 14°C. Posteriormente se añadieron 10 µL de la muestra de espermatozoides de erizo de marcados con el colorante Fluo-4 a una celda con 800 µL de ASW a 14°C y las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo en el espectrofluorómetro SLM 8000 Aminco (SLM Instruments, INC, Urbana, Illinois, EUA).

Electrofisiología: Los registros de corriente iónica se llevaron a cabo mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o patch-clamp en la configuración fijación de voltaje célula unida con el amplificador AXOPATCH 200 (Axon-Molecular Devices LLC, San José, California, EUA), la interfaz análoga-digital DigiData 1200 (Axon-Molecular Devices), el micromanipulador motorizado MP-225

(Sutter Instruments, Novato, California, EUA), el microscopio invertido Eclipse TE2000-U (Nikon Instruments-Nikon Co., Shinagawa, Tokio, Japón), la cámara QUANTIX Photometrics® CCD57-10 G1 (Roper Scientific Inc, Tucson, Arizona, EUA) y el controlador de temperatura TC- 202A (Warner Instruments LLC-Harvard Bioscience Inc, Hamden, Connecticut, EUA). El programa de adquisición utilizado fue el Clampex 6 (Axon-Molecular Devices), con el cual se ejecutaron protocolos de estimulación de -100 a +100 mV con un potencial de mantenimiento de 0 mV y una duración de 1s (rampas de voltaje) y 100 ms (pulsos cuadrados). La frecuencia de adquisición fue: 20-100 kHz y la ganancia: x1. La resistencia de las micropipetas elaboradas a partir de capilares de borosilicato (KIMBLE® Chase, Santiago de Querétaro, Querétaro, México) con el estirador de capilares P-2000 (Sutter Instruments) y pulidas en la microforja MF-83 (Narishige Scientific Instrument Lab, Setagaya, Tokio, Japón) fue de 20-30 MΩ.

La composición iónica de las soluciones de registro fue, solución de baño [mM]: 49 NaCl, 1 CaCl₂, 25 MgCl₂, 1 KCl, 10 HEPES, 0.1 EDTA (pH=7.4 ajustado con NaOH) y solución de pipeta [mM]: 150 Gluconato de sodio, 5 NaCl, 20 HEPES, 5 EGTA (pH=7 ajustado con NaOH). La conductancia se calculó a partir de la ecuación: $G_K = I_K / (E - E_K)$ (Hille, 2001), los valores de conductancia se normalizaron respecto a la conductancia máxima, el ajuste de la curva G-V se efectuó con la ecuación de Boltzmann: $p_2/p_1 = \exp(-u_2 - u_1 / K_B T)$ (Hille, 2001).

Análisis de datos: El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo con el software Clampfit 10 (Molecular Devices LLC, San José, California, EUA), Sigma Plot 10 (Systat Software Inc, Chicago, Illinois, EUA) y Origin 6.0 (OriginLab

Corporation, Northampton, Massachusetts, EUA). Los resultados se expresaron como la media \pm s.e.m, (n) corresponde al número de experimentos independientes. Las pruebas estadísticas efectuadas en los datos obtenidos a partir de registros electrofisiológicos fueron la ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Bonferroni. La prueba t-Student pareada se utilizó en los datos obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia. En todas las pruebas, las diferencias se consideraron significativas cuando $*p \leq 0.05$.

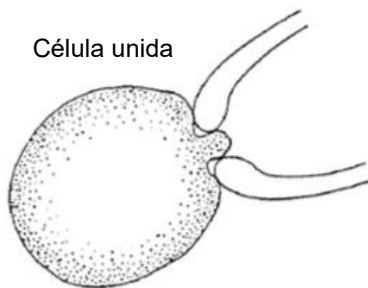


Figura 8. Configuración utilizada en el registro de corriente iónica en espermatozoides de erizo de mar hinchados. Representación gráfica de la configuración de registro célula unida en la cual se establece contacto entre la punta de la pipeta de registro y una pequeña sección de la superficie de la membrana celular, lo cual permite registrar la actividad iónica de un solo canal (registro de canal unitario) o de un conjunto de canales dependiendo del área de membrana que cubre la punta de la pipeta y la densidad de canales por unidad de área.

RESULTADOS

- **Expresión del canal de Ca²⁺ CatSper en espermatozoides de erizo de mar hinchados.**

Existe numerosa evidencia acerca de la expresión funcional y la distribución espacial del canal CatSper en espermatozoides de ratón y de humano (Kirichok et al, 2006; Lishko et al, 2012; Chung et al, 2017; Orta et al, 2018; Hwang et al, 2019). En espermatozoides de erizo de mar, CatSper se detectó inicialmente mediante bioinformática. Posteriormente se demostró su expresión a partir de análisis proteómico e inmunofluorescencia (Cai et al, 2008; Seifert et al, 2015; Espinal-Enríquez et al, 2017). A pesar de los trabajos citados, previo al presente estudio CatSper no había sido caracterizado electrofisiológicamente en espermatozoides de erizo de mar debido a la morfología de estas células (ausencia de gota citoplásmica, estructura en la cual se llevan a cabo sellos de alta resistencia (gigasellos) en espermatozoides de mamífero) y a su tamaño (menor respecto a espermatozoides de mamífero, cabeza: 2-4 µm de diámetro y flagelo: 50 µm de longitud). Para contender con las limitaciones intrínsecas de la muestra, decidimos implementar la estrategia experimental reportada por Sánchez et al, 2001, la cual consiste en suspender a los espermatozoides de erizo de mar en ASW diluida 1:10 **(Material y métodos)** con el objetivo de hincharlos y aumentar así la tasa de éxito en la obtención de gigasellos de 2.8% (Guerrero et al, 1987) a 42% (*L. pictus*) y 60% (*S. purpuratus*) **(Tabla 1)**.

Especie	Sellos/intentos	Porcentaje de éxito
<i>L. pictus</i>	372/893	42%
<i>S. purpuratus</i>	565/940	60%

Tabla 1. Porcentaje de éxito en la obtención de sellos de alta resistencia (gigasellos) en espermatozoides hinchados de erizo de mar de las especies *L. pictus* y *S. purpuratus*.

Una vez implementada esta metodología, CatSper se detectó en toda la región del flagelo mediante ensayos de inmunofluorescencia. Para estas determinaciones se utilizó un anticuerpo generado contra la secuencia de la subunidad CatSper1 de *S. purpuratus* (**Material y Métodos**) y su especificidad se corroboró con el péptido antigénico correspondiente.

La presencia funcional de CatSper en espermatozoides de erizo de mar se ha documentado mediante mediciones de $[Ca^{2+}]_i$ con colorantes fluorescentes en experimentos en población y en células únicas (Espinal-Enríquez et al, 2017; Rennhack et al, 2018; Hamzeh et al, 2019). Considerando esta información, previo a la ejecución de registros electrofisiológicos decidimos corroborar la expresión de CatSper en espermatozoides de erizo de mar mediante determinaciones fluorométricas con el indicador de Ca^{2+} Fluo-4. En estos experimentos se añadió NH_4Cl para elevar el pH_i y activar al canal CatSper (Lishko et al, 2012; Hwang et al, 2019). En la **Figura 9A-B** se ilustra la respuesta al NH_4Cl (trazo representativo en color gris claro) y al bloqueador de CatSper, NNC55-0396 (NNC) (trazo representativo en color gris oscuro) en una población de espermatozoides de erizo de mar de la especie *S. purpuratus*.

Se ha reportado que el NNC induce un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (Espinal-Enríquez et al, 2017), no obstante, se desconocía el mecanismo por el cual ocurre este fenómeno. Trabajo de nuestro grupo demostró que el NNC, al igual que otras bases débiles, se acumula en organelos ácidos y eleva su pH (pH_a). El acrosoma es un organelo ácido que acumula Ca^{2+} y su alcalinización libera este catión al citoplasma y estimula la entrada de Ca^{2+} externo (Chávez et al, 2018).

El efecto colateral del NNC complicó la estimación de la capacidad inhibidora de los bloqueadores de CatSper. Para estimar la inhibición causada por NNC sobre la activación de CatSper, los datos presentados en este trabajo se normalizaron respecto a la respuesta máxima de fluorescencia obtenida tras la adición de Tritón X-100. El NNC inhibió el 25% de la respuesta de NH_4Cl , compuesto químico que activa al canal CatSper tras la inducción de la alcalinización del pH (Figura 9C-D). Estos hallazgos sugieren que CatSper se expresa de manera funcional en espermatozoides de erizo de mar.

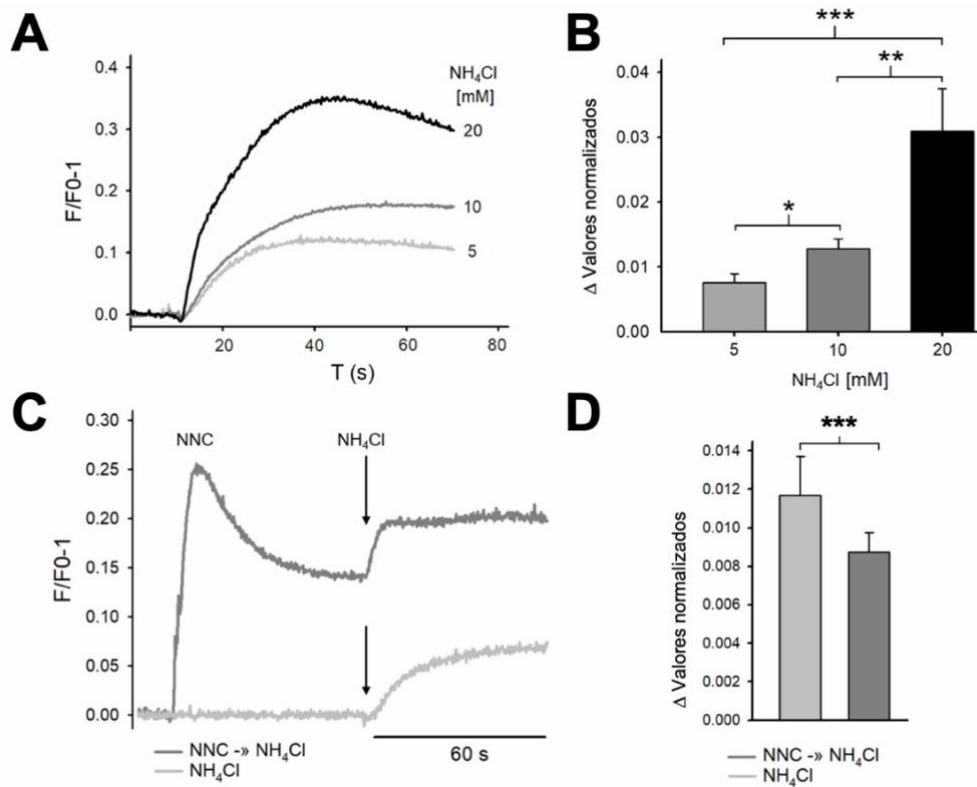


Figura 9. El bloqueador de CatSper NNC inhibe el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido con NH_4Cl . (A) Trazos representativos de la fluorescencia registrada posterior a la adición de NH_4Cl (5, 10 y 20 mM) en espermatozoides de erizo de mar (*S. purpuratus*) cargados con Fluo-4 (20 μM durante 3 h a 14°C). (B) Resumen de los experimentos mostrados en (A). (C) Trazos representativos del cambio en la fluorescencia registrado posterior a la adición de NH_4Cl (10 mM) en espermatozoides de erizo de mar (*S. purpuratus*) cargados con Fluo-4 e incubados con NNC (5 μM , durante 50 s). (D) Resumen de los experimentos mostrados en (C). Las barras de las gráficas (B y D) representan la media \pm s.e.m. ($n=3-5$). * $p \leq 0.046$; ** $p \leq 0.003$; *** $p \leq 0.004$ (t-Student pareada). La normalización de la fluorescencia se obtuvo al considerar la respuesta máxima tras la adición de Tritón X-100.

- **Registros de corriente iónica en espermatozoides de erizo de mar hinchados de las especies *L. pictus* y *S. purpuratus*.**

A partir de la implementación de la técnica de patch-clamp en espermatozoides de mamífero, se demostró que CatSper es débilmente dependiente del voltaje, se activa por alcalinización del pH_i (Kirichok et al, 2006) y se bloquea con Mibefradil (Mibe), NNC y RU1968 (RU) (Lishko et al, 2011; Rennhack et al, 2018). Con el objetivo de caracterizar electrofisiológicamente la expresión de este canal en espermatozoides de erizo de mar (hinchados), se implementaron algunas de las estrategias experimentales previamente descritas en espermatozoides de mamífero, tal como, el registro de corriente iónica en presencia de solución libre de cationes divalentes (DVF) (Kirichok et al, 2006; Carlson et al, 2009; Lishko et al, 2011; Strünker et al, 2011; Mannowetz et al, 2017; Orta et al, 2018; Rennhack et al, 2018). Bajo esta condición se comparo la corriente registrada con dos protocolos de estimulación (protocolo de pulsos y rampa de voltaje) (**Figura 10C**).

Cabe señalar que los múltiples intentos por establecer sellos de alta resistencia en la configuración de registro célula-completa no tuvieron éxito. Considerando lo anterior decidimos efectuar registros electrofisiológicos en la configuración célula unida (condición en la que los gigasellos se mantuvieron estables durante varios minutos). En esta configuración, la ejecución de ambos protocolos de estimulación en espermatozoides de erizo de mar de las especies *L. pictus* y *S. purpuratus*, generaron corrientes monovalentes levemente dependientes de voltaje, cuya magnitud y potencial de inversión fueron similares (**Figura. 10D-F**). La magnitud de la corriente registrada con el protocolo de pulsos de voltaje fue (**Tabla 2**): *L. pictus* ($n=4$): $-100\text{ mV}=-20.0\pm 7.7\text{ pA}$, $+100\text{ mV}=102.2\pm 7.5\text{ pA}$; *S. purpuratus* ($n=6$):

-100 mV=-40.7±1.7 pA, +100 mV=111.8±1.6 pA y con el protocolo de rampa de voltaje (**Tabla 3**): *L. pictus* (n=98): -100 mV=-34.3±1.5 pA, +100 mV=94.2±2.9 pA; *S. purpuratus* (n=120): -100 mV=-39.6±1.8 pA, +100 mV=112.1±2.3 pA. Mientras que el valor del potencial de inversión fue: *L. pictus* (n=4): -10±1 mV y *S. purpuratus* (n=6): -14±2 mV (en ambos casos no se encontraron diferencias significativas). Aunado a estos resultados, en la gráfica de conductancia-voltaje (G-V) de la corriente monovalente registrada con un protocolo de pulsos de voltaje antes (control, trazo representativo en color negro) y después de la adición de 10 mM de NH₄Cl (trazo representativo en color gris), el potencial al que se activa la mitad de los canales (V_{1/2}) se desplazó de 100±4 mV a 70±1 mV (**Figura 11A**), lo que corrobora la dependencia a la alcalinización del pH_i. Considerando que, la caracterización electrofisiológica de la corriente CatSper (I_{CatSper}) se puede obtener en tiempos más cortos con protocolos de rampa de voltaje (Lishko et al, 2011; Mannowetz et al, 2017), decidimos utilizar esta estrategia en el resto de los experimentos.

Especie	Potencial hiperpolarizante (-100 mV)	Potencial depolarizante (+100 mV)	Número de experimentos
<i>L. pictus</i>	-20.0±7.7 pA	102.2±7.5 pA	4
<i>S. purpuratus</i>	-40.7±1.7 pA	111.8±1.6 pA	6

Tabla 2. Magnitud de la corriente registrada con el protocolo de pulsos de voltaje en espermatozoides hinchados de erizo de mar de las especies *L. pictus* y *S. purpuratus*.

Especie	Potencial hiperpolarizante (-100 mV)	Potencial depolarizante (+100 mV)	Número de experimentos
<i>L. pictus</i>	-34.3±1.5 pA	94.2±2.9 pA	98
<i>S. purpuratus</i>	-39.6±1.8 pA	112.1±2.3 pA	120

Tabla 3. Magnitud de la corriente registrada con el protocolo de rampa de voltaje en espermatozoides hinchados de erizo de mar de las especies *L. pictus* y *S. purpuratus*.

o Caracterización de la corriente iónica registrada en espermatozoides de erizo de mar hinchados.

Con la intención de corroborar la expresión funcional del canal CatSper en espermatozoides de erizo de mar de las especies *S. purpuratus* y *L. pictus*, decidimos registrar (a partir de la ejecución de protocolos de rampa de voltaje) corriente monovalente (en presencia de solución DVF) de un mismo espermatozoide en tres condiciones diferentes: control (trazo representativo en color negro), en presencia de 10 mM de NH_4Cl (trazo representativo en color gris oscuro) y en presencia de tres bloqueadores del canal CatSper, Mibe (10 μM) (**Figura. 12A-B**); NNC (5 μM) (**Figura. 12C-D**) y RU (10 μM) (**Figura. 13A-B**) (trazos representativos en color gris claro). Los tres bloqueadores del canal CatSper inhibieron la corriente iónica estimulada por la alcalinización del pH_i , en espermatozoides de ambas especies (**Figuras. 12 y 13**). Estos resultados son consistentes con la expresión funcional del canal CatSper en espermatozoides de erizo de mar, el cual, posee las características biofísicas y farmacológicas descritas en espermatozoides de mamífero.

o Estimulación de la corriente CatSper (I_{CatSper}) con speract.

Una vez registrada la I_{CatSper} en espermatozoides de erizo de mar, se evaluó el efecto del speract sobre esta corriente. En la **Figura. 13C** se ilustra la estimulación de la I_{CatSper} con 100 nM de speract. La activación de la corriente fue más pronunciada a potenciales de membrana hiperpolarizantes. A -100 mV se observó una activación del 22%, mientras que a +100 mV fue del 17%.

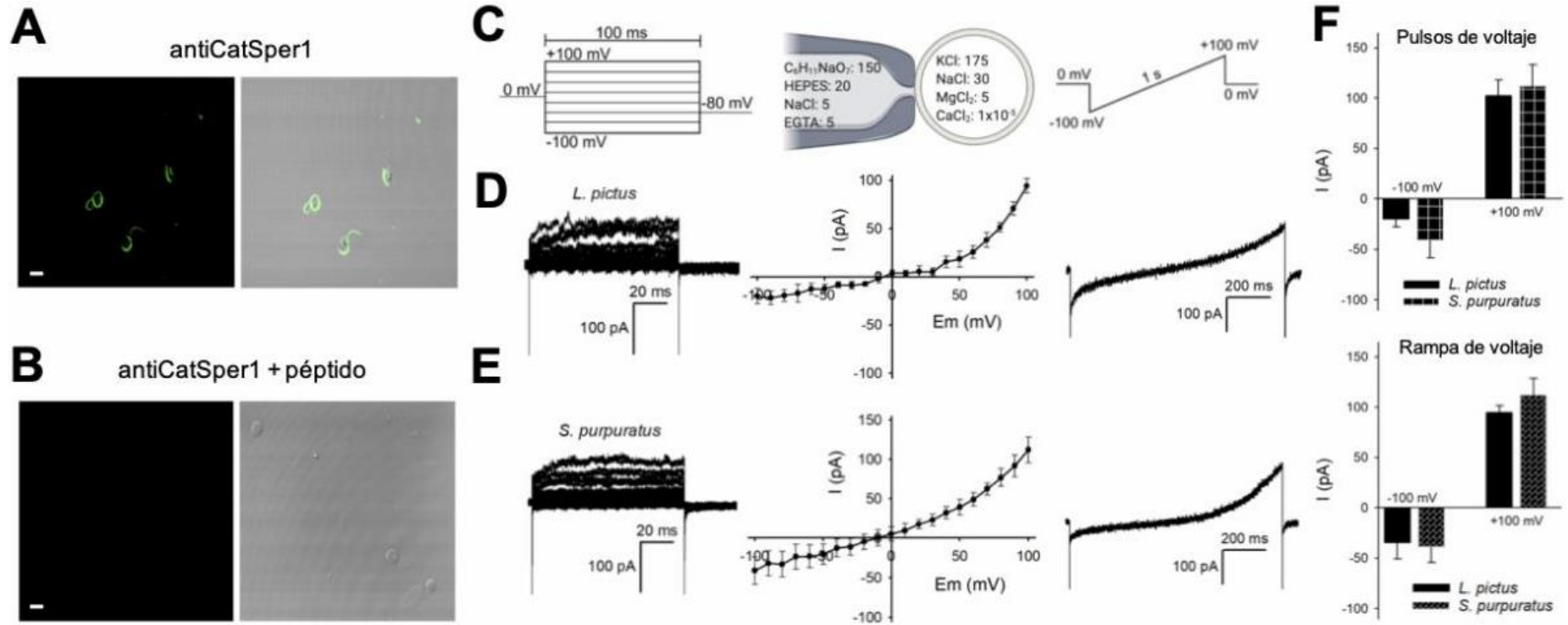


Figura 10. El canal CatSper se expresa en el flagelo de espermatozoides de erizo de mar. Inmunofluorescencia de espermatozoides hinchados de erizo de mar, con el anticuerpo anti- CatSper1, en ausencia **(A)** y presencia **(B)** del péptido antigénico (izquierda: imágenes obtenidas con microscopía de fluorescencia; derecha: superposición de imágenes obtenidas con microscopía de campo claro y fluorescencia). Barra de escala=4 μ m ($n=3$). **(C)** Protocolo de pulsos (izquierda) y rampa de voltaje (derecha) empleados en experimentos de fijación de voltaje, configuración célula unida. Condiciones iónicas de registro en [mM] (central). **(D-E)** Trazos representativos de la corriente monovalente registrada en espermatozoides de **(D)** *L. pictus* y **(E)** *S. purpuratus* (izquierda: corriente obtenida con protocolo de pulsos de voltaje; derecha: corriente obtenida con protocolo de rampa de voltaje; centro: relación I-V de la corriente obtenida con el protocolo de pulsos de voltaje, *L. pictus* ($n=4$) y *S. purpuratus* ($n=6$)). **(F)** Gráficas de barras de la corriente registrada con un protocolo de pulsos (superior: *L. pictus* ($n=4$) y *S. purpuratus* ($n=6$)) y rampa de voltaje (inferior: *L. pictus* ($n=98$) y *S. purpuratus* ($n=120$)). Las barras representan la media \pm s.e.m.

El RU1968, considerado el bloqueador más específico del canal CatSper reportado hasta el momento, inhibió (a un nivel inferior al de la condición control) la corriente estimulada con 100 nM de speract como se muestra en el trazo color gris claro de la **Figura. 13D**.

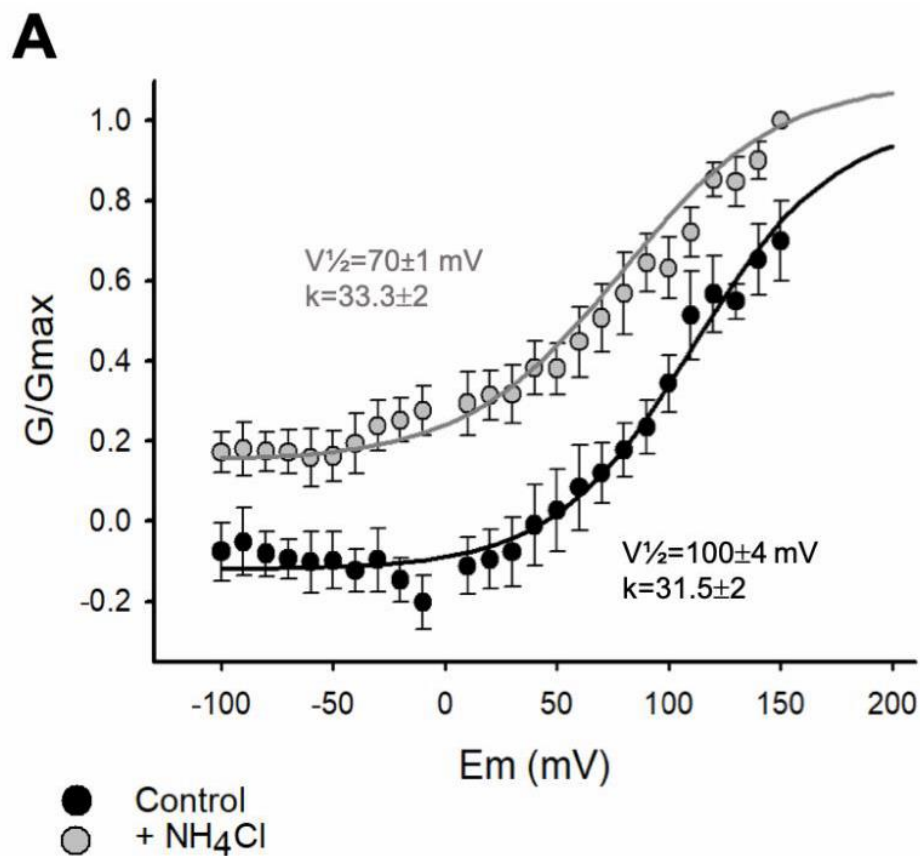


Figura 11. La corriente dependiente de voltaje, registrada con DVF en espermatozoides de erizo de mar, es estimulada por la alcalinización del pH. (A) Curva G-V de la corriente registrada en espermatozoides de la especie *S. purpuratus* ($n=3$) en dos condiciones diferentes: control (trazo representativo en color negro) y en presencia de 10 mM de NH_4Cl (trazo representativo en color gris). Posterior a la alcalinización intracelular, el potencial al que se activan la mitad de los canales ($V_{1/2}$) se desplazó de $100 \pm 4 \text{ mV}$ a $70 \pm 1 \text{ mV}$. Las líneas en color negro y gris representan el ajuste de Boltzmann (control: $k=31.5 \pm 2$; NH_4Cl : $k=33.3 \pm 2$). La conductancia se normalizó respecto a la conductancia máxima.

- **Caracterización del remanente de corriente resistente a los bloqueadores del canal CatSper.**

Los experimentos de patch-clamp en los cuales se evaluó el efecto de inhibidores del canal CatSper, revelaron la presencia de una corriente resistente a los bloqueadores de este canal (**Tabla 4**). Ante tales resultados, se procedió a la caracterización electrofisiológica de la corriente residual registrada posterior a la adición de Mibe (**Figura. 14A-B**). Al analizar la composición iónica de las soluciones de registro (**Material y métodos**) y el cambio en el potencial de inversión posterior al bloqueó de CatSper (de -10 ± 1 mV a -32 ± 1 mV), se consideró que un canal aniónico podría estar contribuyendo a la corriente residual. Tomando en cuenta dicha consideración se decidió evaluar el efecto del ácido niflúmico (NFA), un bloqueador general de canales de aniónicos. Esta decisión se basó en reportes en espermatozoides de las dos especies de erizo de mar estudiadas en este trabajo (*L. pictus* y *S. purpuratus*) en los cuales se demostró que el NFA altera significativamente las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por speract e inhibe la quimiotaxis (Guerrero et al, 2013).

Posterior a la estimulación con NH_4Cl y al bloqueo con Mibe de la $I_{CatSper}$, el NFA bloqueó una parte significativa de la corriente remanente (a -100 mV se observó un bloqueo del 62% y a $+100$ mV fue del 72%). El potencial de inversión cambió de -32 ± 1 mV a -23 ± 2 mV (**Figura. 14A**). Además, el NFA inhibió la corriente basal, a -100 mV se observó una inhibición del 39% para *L. pictus* y 51% para *S. purpuratus*, y a $+100$ mV fue del 34% para *L. pictus* y del 48% para *S. purpuratus*, como se muestra en la **Figura. 15A-B**. El conjunto de estos resultados sugiere la expresión funcional de un canal de Cl^- en el espermatozoide de erizo de mar.

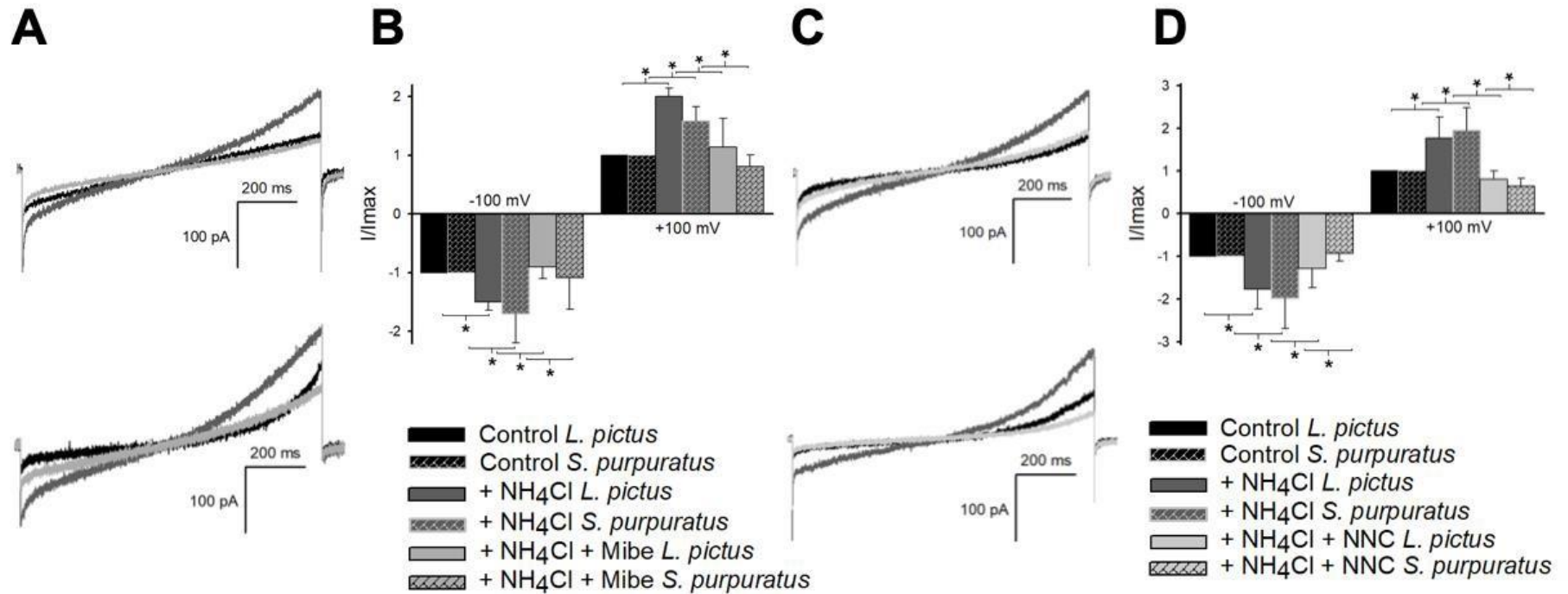


Figura 12. La corriente iónica registrada con DVF en espermatozoides hinchados de erizo de mar, se activa con NH₄Cl y se bloquea con Mibe y NNC. (A y C) Trazos representativos de la corriente monovalente registrada en espermatozoides de erizo de mar de las especies *L. pictus* (n=3) (superior) y *S. purpuratus* (n=4) (inferior). El protocolo de rampa de voltaje es el mismo mostrado en la Figura 8 (panel C, derecha). La corriente se registró en el mismo espermatozoide en tres condiciones diferentes: control (trazo representativo en color negro), en presencia de 10 mM de NH₄Cl (trazo representativo en color gris oscuro) y 10 μM de Mibe (trazo representativo en color gris claro, panel A) o 5 μM de NNC (trazo representativo en color gris claro, panel C). La estimulación de la corriente inducida por la alcalinización del pH_i se inhibe con los bloqueadores del canal CatSper, Mibe y NNC en ambas especies. **(B y D)** Gráficas de barras de la amplitud de la corriente normalizada respecto al valor de la corriente control a -100 y +100 mV bajo las condiciones experimentales descritas en el panel A y C. Los datos representados corresponden a la media ± s.e.m. *p<0.05 (ANOVA de una vía y prueba post hoc de Bonferroni).

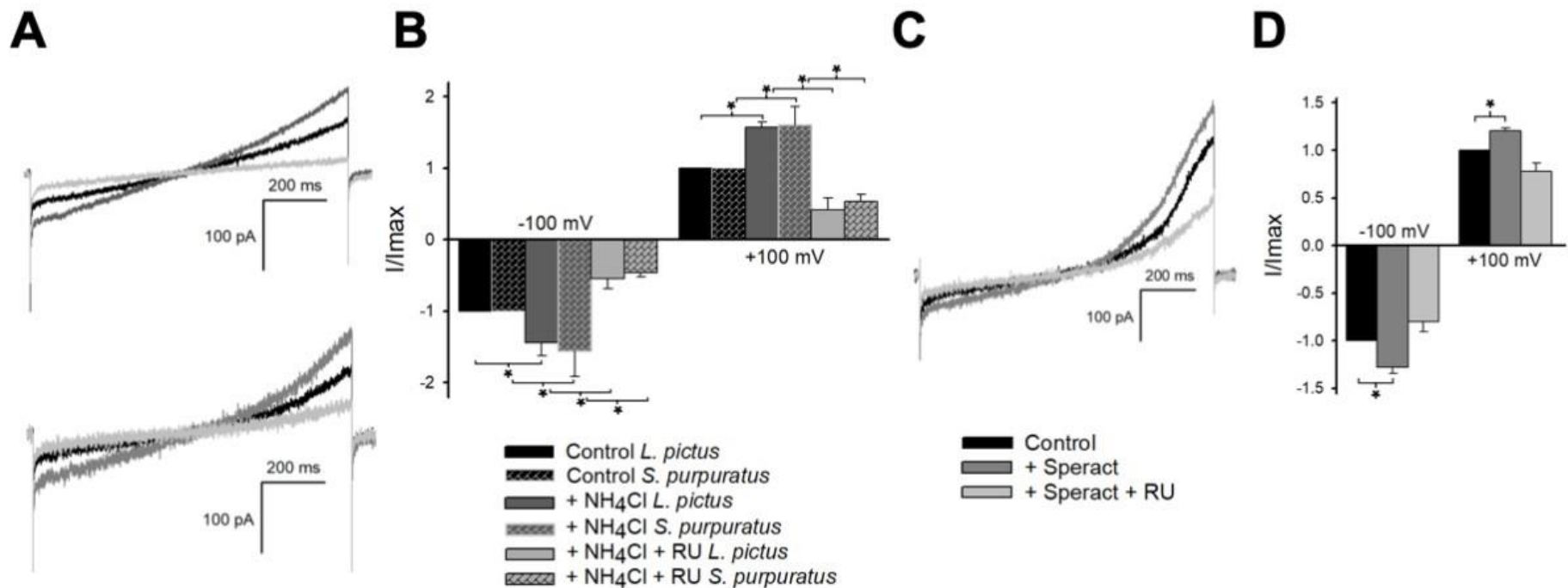


Figura 13. La corriente iónica registrada con DVF en espermatozoides hinchados de erizo de mar, se activa con speract y se bloquea con RU (inhibidor más específico del canal CatSper). (A y C) Trazos representativos de la corriente monovalente registrada en espermatozoides de erizo de mar de las especies *L. pictus* ($n=3$) (superior) y *S. purpuratus* ($n=3$) (inferior, panel A). La corriente se registró en el mismo espermatozoide en tres condiciones diferentes: control (trazo representativo en color negro), en presencia de 10 mM de NH₄Cl (trazo representativo en color gris oscuro, panel A) o en presencia de speract 100 nM (trazo representativo en color gris oscuro, panel C) y 10 μ M de RU (trazo representativo en color gris claro). El aumento en la amplitud de la corriente inducido por NH₄Cl o speract se inhibe con RU a un nivel inferior al de la condición control. **(B y D)** Gráficas de barras de la amplitud de la corriente normalizada respecto al valor de la corriente control a -100 y +100 mV bajo las condiciones experimentales descritas en el panel A y C. Los datos representados corresponden a la media \pm s.e.m. * $p \leq 0.05$ (ANOVA de una vía y prueba post hoc de Bonferroni).

Especie	Tipo de corriente	Corriente registrada/ total de registros	Porcentaje de registro
<i>L. pictus</i>	Ninguna	24/294	8%
	CatSper	102/294	35%
	No-CatSper	168/294	57%
<i>S. purpuratus</i>	Ninguna	42/423	10%
	CatSper	126/423	30%
	No-CatSper	254/423	60%

Tabla 4. Tipo de corriente iónica registrada con solución libre de cationes divalentes (DVF) y protocolo de rampa de voltaje en espermatozoides hinchados de erizo de mar.

○ **Bloqueo de la corriente aniónica residual con T16Ainh-A01 (bloqueador específico del canal TMEM16A).**

La expresión de un canal de cloro activado por calcio (TMEM16A) en espermatozoides de erizo de mar se ha demostrado a partir de estudios de biología molecular (Galindo et al, 2005) y análisis proteómico (Beltrán et al, 2016). Para corroborar la expresión funcional de este canal, se evaluó el efecto de un bloqueador específico del canal TMEM16A, el T16Ainh-A01 (T16Ainh).

En la **Figura. 15C-D** se pueden apreciar registros de corriente iónica control (trazo representativo en color negro) y en presencia de 10 μ M de T16Ainh (trazo representativo en color gris claro), condición en la cual se indujo una inhibición de la corriente basal. A -100 mV se observó una inhibición del 53% y a +100 mV fue del 49%. Estas observaciones experimentales son consistentes con la expresión funcional del canal TMEM16A en espermatozoides de erizo de mar.

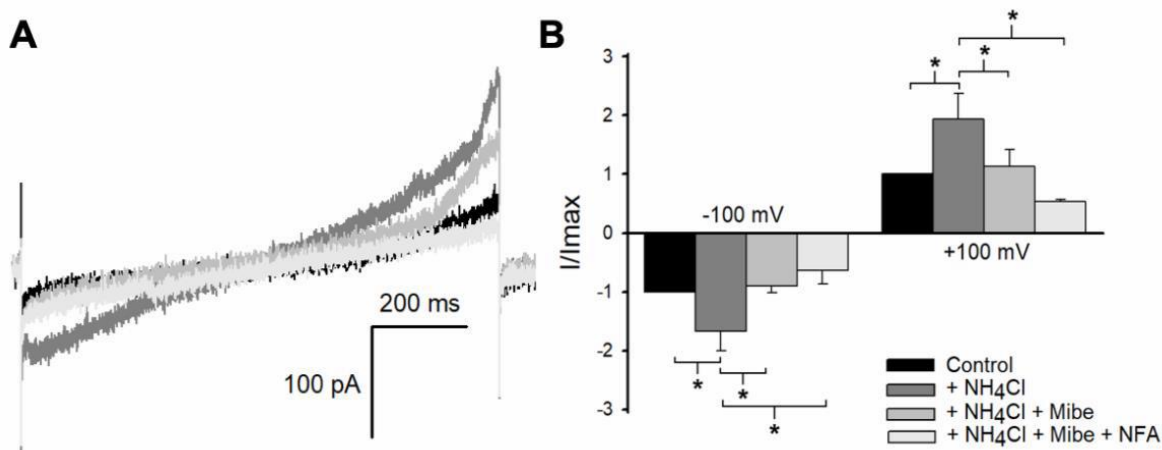


Figura 14. Caracterización del remanente de corriente resistente a los bloqueadores del canal CatSper (No-CatSper). (A) Trazos representativos de la corriente monovalente registrada de espermatozoides de erizo de mar de la especie *L. pictus* ($n=3$). La corriente se registró del mismo espermatozoide en cuatro condiciones diferentes: control (trazo representativo en color negro), en presencia de 10 mM de NH₄Cl (trazo representativo en color gris oscuro), 10 μ M de Mibe (trazo representativo en color gris) y 10 μ M de NFA (trazo representativo en color gris claro). Posterior al aumento en la amplitud de la corriente inducido por NH₄Cl y a la inhibición con Mibe, el NFA bloqueó significativamente el remanente de corriente. (B) Gráfica de barras de la amplitud de la corriente normalizada respecto al valor de la corriente control a -100 y +100 mV bajo las condiciones experimentales descritas en el panel A. Los datos representados corresponden a la media \pm s.e.m. * $p \leq 0.05$ (ANOVA de una vía y prueba post hoc de Bonferroni).

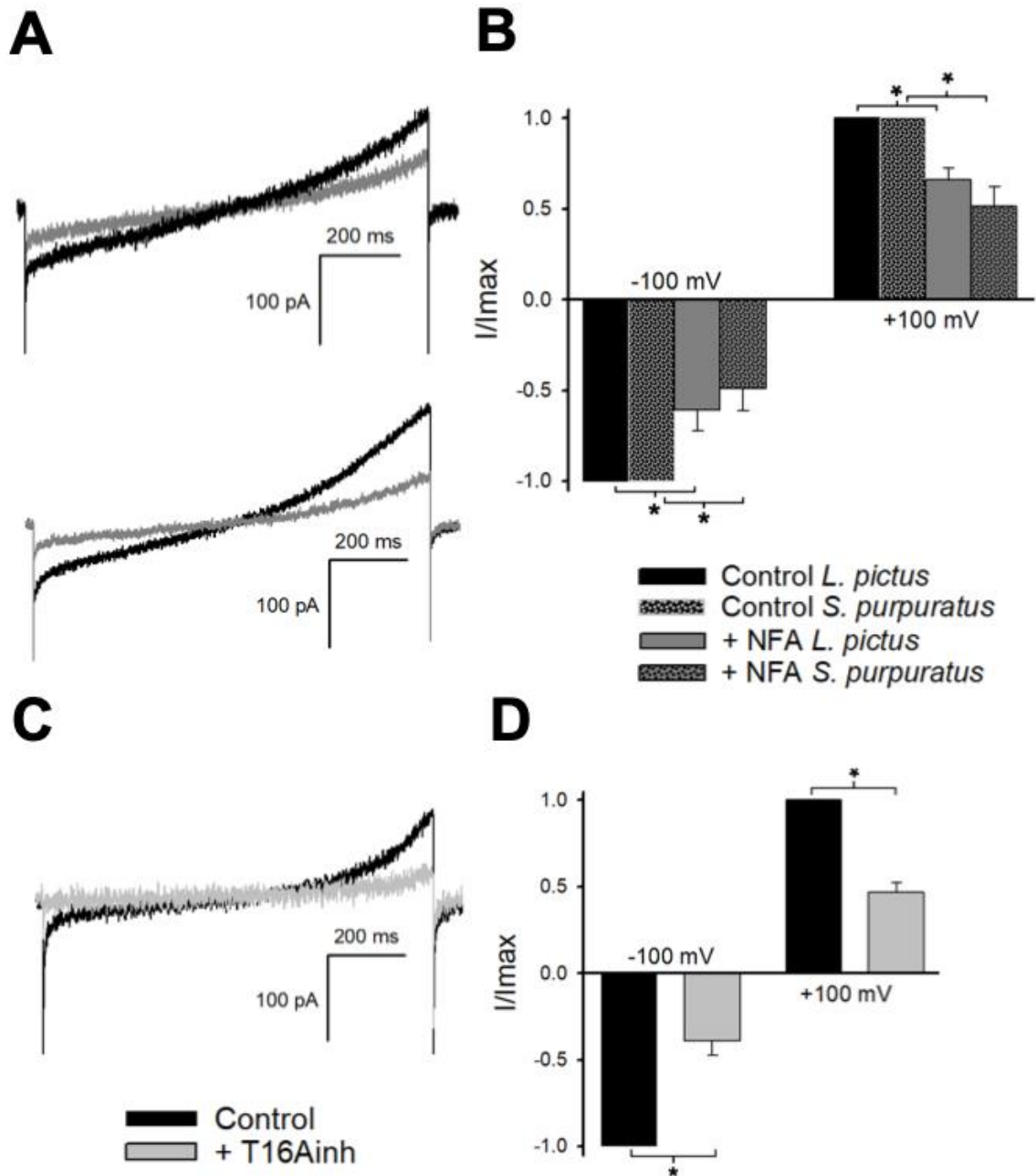


Figura 15. Bloqueo de la corriente aniónica residual con T16Ainh. (A y C) Trazos representativos de la corriente monovalente registrada en espermatozoides de erizo de mar de las especies *L. pictus* ($n=3$) (superior) y *S. purpuratus* ($n=4$) (inferior, panel A). La corriente se registró en el mismo espermatozoide en dos condiciones diferentes: control (trazo representativo en color negro) y en presencia de $10 \mu\text{M}$ de NFA (trazo representativo en color gris oscuro, panel A) o $10 \mu\text{M}$ de T16Ainh (trazo representativo en color gris claro, panel C). **(B y D)** Gráficas de barras de la amplitud de la corriente normalizada respecto al valor de la corriente control a -100 y $+100$ mV bajo las condiciones experimentales descritas en el panel A y C. Los datos representados corresponden a la media \pm s.e.m. $*p \leq 0.05$ (ANOVA de una vía y prueba post hoc de Bonferroni).

DISCUSIÓN

La caracterización electrofisiológica de canales iónicos en espermatozoides de erizo de mar ha sido un terreno poco explorado principalmente por las características morfológicas y el tamaño de estas células. En este sentido, se han implementado metodologías como los registros de corriente iónica a partir de la fusión de vesículas de la membrana plasmática de espermatozoides a una bicapa lipídica (Liévano et al, 1990; Morales et al, 1993; Labarca et al, 1996) o la formación de bicapas en la punta de una pipeta de patch-clamp (Liévano et al, 1985). No obstante, la necesidad de registrar la actividad eléctrica de canales iónicos directamente en espermatozoides de erizo de mar (Guerrero et al, 1987) dio lugar a la creación de estrategias como la descrita por Sánchez et al, 2001, la cual consiste en inducir hinchamiento aumentando así la tasa de éxito en la formación de gigasellos.

Una vez hinchados, los espermatozoides de erizo de mar conservan propiedades fisiológicas como el incremento de pH_i y $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al speract (Reynaud et al, 1993) y la activación de canales de K^+ (Babcock et al, 1992).

En el desarrollo de este proyecto, se utilizó la estrategia experimental descrita por Sánchez et al, 2001. También se emplearon enfoques bien establecidos que se generaron durante la caracterización de CatSper en espermatozoides de mamífero (Kirichok et al, 2006; Lishko et al, 2011; Brenker et al, 2012; Mannowetz et al, 2017; Orta et al, 2018; Rennhack et al, 2018; Hwang et al, 2019). Estas herramientas nos permitieron determinar la funcionalidad del canal CatSper en espermatozoides de erizo de mar.

Inicialmente efectuamos inmunotinciones en espermatozoides hinchados de erizo para verificar la expresión de CatSper. En estos experimentos observamos una distribución a lo largo del flagelo (el cual en espermatozoides de erizo de mar hinchados rodea la cabeza) como la descrita en espermatozoides de erizo de mar en condiciones fisiológicas (Seifert et al, 2015).

Posteriormente, procedimos a la caracterización electrofisiológica del canal CatSper mediante la técnica de patch-clamp en la configuración célula unida. En tales condiciones, logramos registrar una corriente macroscópica correspondiente a un canal permeable a Na^+ , dependiente de voltaje y pH_i , bloqueado por Mibefradil, NNC55-0396 y RU1968, la cual denominamos I_{CatSper} .

Cabe señalar que posterior a la alcalinización intracelular, el valor de $V_{1/2}$ cambió de 100 ± 4 mV a 70 ± 1 mV. En contraste, en espermatozoides de ratón sometidos a un protocolo equivalente a la adición de NH_4Cl , el cambio reportado es de 87 mV a 11 ± 1 mV (Kirichok et al, 2006). Esta diferencia podría deberse al hecho de que en la configuración de registro célula unida no controlamos el potencial de membrana en reposo ($E_m = E_r - E_c$, donde E_m =potencial de membrana, E_r =potencial de membrana en reposo, E_c =potencial ejecutado) el cual cambia al agregar NH_4Cl y elevar el pH_i (Li et al, 2020), parámetro que influye en la estimación del valor de $V_{1/2}$ (Sánchez et al, 2001).

Por otro lado, en los registros electrofisiológicos efectuados en solución libre de cationes divalentes (condición para detectar CatSper) no observamos actividad de canal unitario. Esta característica podría deberse a que la subunidad CatSper1

reside en microdominios de membrana tal como se reportó recientemente en espermatozoides de ratón (Ded et al, 2020). Además, la formación de balsas lipídicas se ha documentado ampliamente en estas células (Ohta et al, 2000; Maehashi et al, 2003; Vacquier et al, 2014). Por lo tanto, nuestra hipótesis es que los canales CatSper forman complejos (en espermatozoides de ratón mediante microscopía de alta resolución se ha reportado la formación de nanodominios a lo largo del flagelo) en los espermatozoides de erizo de mar hinchados lo que podría explicar porque obtuvimos principalmente registros de corriente macroscópica en la configuración de célula unida.

Una vez registrada la corriente de CatSper en espermatozoides de erizo de mar, examinamos el efecto del speract, péptido quimioatrayente que regula la movilidad del espermatozoide y lo guía hacia el óvulo mediante cambios bioquímicos y electrofisiológicos que conducen al incremento intracelular de Ca^{2+} , nucleótidos cíclicos (GMPc, AMPc) y pH_i (Babcock et al, 1992).

En estos experimentos demostramos que el speract incrementó la corriente de CatSper. Además, el efecto de speract sobre la $I_{CatSper}$ se bloqueó con RU1968, el bloqueador más específico que se conoce del canal CatSper, lo que nos hace sugerir que CatSper es la entidad molecular responsable de una fracción significativa de la corriente estimulada por speract.

Durante el desarrollo de la caracterización electrofisiológica de CatSper en espermatozoides de erizo de mar, detectamos un remanente de corriente el cual nos dimos a la tarea de caracterizar. Al analizar la composición iónica de las soluciones de registro y el corrimiento del potencial inversión a potenciales más

hiperpolarizantes posterior al bloqueo de CatSper nos permitió suponer que se trataba de una corriente de cloruro, por lo cual evaluamos el efecto del NFA, bloqueador general de canales de Cl⁻, asociado a la inhibición de la quimiotaxis y alteración de las oscilaciones de [Ca²⁺]_i inducidas por speract (Guerrero et al, 2010). Al observar que el NFA provocó una disminución significativa en la magnitud del remanente de corriente (principalmente en el componente saliente) decidimos evaluar el efecto de T16Ainh-A01, un bloqueador específico de canales de Cl⁻ activados por calcio (Morales et al, 1993; Galindo y Vacquier, 2003). El canal TMEM16A se detectó mediante análisis proteómico (Beltrán et al, 2016) en espermatozoides de erizo de mar, se ha propuesto que este tipo de canal podría estar involucrado con el reinicio de la vía del speract a través de la inducción de una nueva hiperpolarización del potencial de membrana (Espinal-Enríquez et al, 2017).

CONCLUSIONES

La evidencia generada en este trabajo confirma la expresión funcional en espermatozoides de erizo de mar de:

- I. El canal de Ca²⁺ CatSper.
- II. El canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ (TMEM16A).

PERSPECTIVAS

En espermatozoides de erizo de mar de las especies *L. pictus* y *S. purpuratus*:

- I. Evaluar el efecto del AMPc en la corriente iónica registrada con solución libre de cationes divalentes para sumar evidencia que permita dilucidar el rol de la PKA en la fosforilación del canal CatSper.
- II. Desarrollar una estrategia experimental para transitar de la configuración de registro de célula unida a célula completa.
- III. Efectuar registros de canal unitario para determinar la conductancia (valor hasta ahora desconocido) del canal CatSper.

REFERENCIAS

- Babcock, D. F., Bosma, M. M., Battaglia, D. E., & Darszon, A. (1992). Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(13), 6001–6005. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.6001>
- Beltrán, C., Treviño, C. L., Mata-Martínez, E., Chávez, J. C., Sánchez-Cárdenas, C., Baker, M., & Darszon, A. (2016). Role of Ion Channels in the Sperm Acrosome Reaction. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, *220*, 35–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7_3
- Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N. D., Naruse, M., Krähling, M., Müller, A., Benjamin Kaupp, U., & Strünker, T. (2012). The CatSper channel: A polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO Journal*, *31*(7), 1654–1665. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.30>
- Cai, X., & Clapham, D. E. (2008). Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSpers and CatSper β . *PLoS ONE*, *3*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003569>
- Carlson, A. E., Burnett, L. a, del Camino, D., Quill, T. a, Hille, B., Chong, J. a, Moran, M. M., & Babcock, D. F. (2009). Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. *PloS One*, *4*(8), e6844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006844>
- Chang, H., & Suarez, S.S. (2010). Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biol Reprod*, *83*(4):507-13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.083113>
- Chávez, J. C., De la Vega-Beltrán, J. L., José, O., Torres, P., Nishigaki, T., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2018). Acrosomal alkalization triggers Ca²⁺ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(6), 4735–4747. <https://doi.org/10.1002/jcp.26262>
- Chung, J. J., Miki, K., Kim, D., Shim, S. H., Shi, H. F., Hwang, J. Y., Cai, X., Iseri, Y., Zhuang, X., & Clapham, D. E. (2017). Catsper γ regulates the structural continuity of sperm ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility. *ELife*, *6*, 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.23082>
- Darszon, A., Guerrero, A., Galindo, B. E., Nishigaki, T., & Wood, C. D. (2008). Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *International Journal of Developmental Biology*, *52*(5–6), 595–606. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072550ad>
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*, *91*(4), 1305–1355. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2010>
- Ded, L., Hwang, J. Y., Miki, K., Shi, H. F., & Chung, J.-J. (2020). 3D in situ imaging of the female reproductive tract reveals molecular signatures of fertilizing spermatozoa in mice. *ELife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.62043>

- Eisenbach, M., & Giojalas, L. C. (2006). Sperm guidance in mammals - An unpaved road to the egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(4), 276–285. <https://doi.org/10.1038/nrm1893>
- Espinal-Enríquez, J., Priego-Espinosa, D. A., Darszon, A., Beltrán, C., & Martínez-Mekler, G. (2017). Network model predicts that CatSper is the main Ca²⁺ channel in the regulation of sea urchin sperm motility. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03857-9>
- Galindo, B. E., & Vacquier, V. D. (2005). Phylogeny of the TMEM16 protein family: some members are overexpressed in cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 16(5), 919–924. <https://doi.org/10.3892/ijmm.16.5.919>
- Guerrero, A., Sánchez, J. A., & Darszon, A. (1987). Single-channel activity in sea urchin sperm revealed by the patch-clamp technique. *FEBS Letters*, 220(2), 295–298. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80833-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80833-5)
- Guerrero, Adán, Espinal, J., Wood, C. D., Rendón, J. M., Carneiro, J., Martínez-Mekler, G., & Darszon, A. (2013). Niflumic acid disrupts marine spermatozoan chemotaxis without impairing the spatiotemporal detection of chemoattractant gradients. *Journal of Cell Science*, 126(6), 1477–1487. <https://doi.org/10.1242/jcs.121442>
- Guerrero, Adán, Wood, C. D., Nishigaki, T., Carneiro, J., & Darszon, A. (2010). Tuning sperm chemotaxis. *Biochemical Society Transactions*, 38(5), 1270–1274. <https://doi.org/10.1042/BST0381270>
- Hamzeh, H., Alvarez, L., Strünker, T., Kierzek, M., Brenker, C., Deal, P. E., Miller, E. W., Seifert, R., & Kaupp, U. B. (2019). Kinetic and photonic techniques to study chemotactic signaling in sea urchin sperm. *Methods in Cell Biology*, 151, 487–517. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.12.001>
- Hwang, J. Y., Mannowetz, N., Zhang, Y., Everley, R. A., Gygi, S. P., Bewersdorf, J., Lishko, P. V., & Chung, J. J. (2019). Dual Sensing of Physiologic pH and Calcium by EFCAB9 Regulates Sperm Motility. *Cell*, 177(6), 1480–1494.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.047>
- Ji, Q., Guo, S., Wang, X., Pang, C., Zhan, Y., Chen, Y., & An, H. (2019). Recent advances in TMEM16A: Structure, function, and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 7856–7873. <https://doi.org/10.1002/jcp.27865>
- Kaupp, U. B., Kashikar, N. D., & Weyand, I. (2008). Mechanisms of Sperm Chemotaxis. *Annual Review of Physiology*, 70(1), 93–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100654>
- Kirichok, Y., Navarro, B., & Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature*, 439(7077), 737–740. <https://doi.org/10.1038/nature04417>
- Labarca, P., Santi, C., Zapata, O., Morales, E., Beltrán, C., Liévano, A., & Darszon, A. (1996). A cAMP regulated K⁺-selective channel from the sea urchin sperm plasma membrane. *Developmental Biology*, 174(2), 271–280. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0072>
- Li, F., Eriksen, J., Finer-Moore, J., Chang, R., Nguyen, P., Bowen, A., Myasnikov, A., Yu, Z., Bulkley, D., Cheng, Y., Edwards, R. H., & Stroud, R.

- M. (2020). Ion transport and regulation in a synaptic vesicle glutamate transporter. *Science*, 368(6493), 893–897. <https://doi.org/10.1126/science.aba9202>
- Liévano, A., Sanchez, J. A., & Darszon, A. (1985). Single-channel activity of bilayers derived from sea urchin sperm plasma membranes at the tip of a patch-clamp electrode. *Developmental Biology*, 112(1), 253–257. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90140-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90140-X)
- Liévano, A., Vega-Saenzdemiera, E. C., & Darszon, A. (1990). Ca²⁺ channels from the sea urchin sperm plasma membrane. *Journal of General Physiology*, 95(2), 273–296. <https://doi.org/10.1085/jgp.95.2.273>
- Lin, J., & Nicastro, D. (2018). Asymmetric distribution and spatial switching of dynein activity generates ciliary motility. *Science*, 360(6387), 1–29. <https://doi.org/10.1126/science.aar1968>
- Lin, S., Ke, M., Zhang, Y., Yan, Z., & Wu, J. (2021). Structure of a mammalian sperm cation channel complex. *Nature*, 595(7869), 746–750. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03742-6>
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387–392. <https://doi.org/10.1038/nature09767>
- Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J.-J., & Clapham, D. E. (2012). The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annual Review of Physiology*, 74, 453–475. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153258>
- Maehashi, E., Sato, C., Ohta, K., Harada, Y., Matsuda, T., Hirohashi, N., Lennarz, W. J., & Kitajima, K. (2003). Identification of the sea urchin 350-kDa sperm-binding protein as a new sialic acid-binding lectin that belongs to the heat shock protein 110 family: Implication of its binding to gangliosides in sperm lipid rafts in fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42050–42057. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307493200>
- Mannowetz, N., Miller, M. R., & Lishko, P. V. (2017). Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(22), 5743–5748. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700367114>
- Morales, E., De La Torre, L., Moy, G. W., Vacquier, V. D., & Darszon, A. (1993). Anion channels in the sea urchin sperm plasma membrane. *Molecular Reproduction and Development*, 36(2), 174–182. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080360208>
- Ohta, K., Sato, C., Matsuda, T., Toriyama, M., Vacquier, V. D., Lennarz, W. J., & Kitajima, K. (2000). Co-localization of receptor and transducer proteins in the glycosphingolipid-enriched, low density, detergent-insoluble membrane fraction of sea urchin sperm. *Glycoconjugate Journal*, 17(3–4), 205–214. <https://doi.org/10.1023/A:1026589223811>
- Orta, G., Ferreira, G., José, O., Treviño, C.L., Beltrán, C., Darszon, A. (2012). Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that

- may participate in the acrosomal reaction. *J Physiol*, 590(11):2659-75.
[https://doi.org/ 10.1113/jphysiol.2011.224485](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224485)
- Orta, G., De La Vega-Beltrán, J. L., Martín-Hidalgo, X. D., Santi, C. M., Visconti, P. E., & Darszon, X. A. (2018). CatSper channels are regulated by protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16830–16841.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001566>
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L., & Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603–609.
<https://doi.org/10.1038/35098027>
- Rennhack, A., Schiffer, C., Brenker, C., Fridman, D., Nitao, E. T., Cheng, Y. M., Tamburrino, L., Balbach, M., Stölting, G., Berger, T. K., Kierzek, M., Alvarez, L., Wachten, D., Zeng, X. H., Baldi, E., Publicover, S. J., Benjamin Kaupp, U., & Strünker, T. (2018). A novel cross-species inhibitor to study the function of CatSper Ca²⁺ channels in sperm. *British Journal of Pharmacology*, 175(15), 3144–3161. <https://doi.org/10.1111/bph.14355>
- Reynaud, E., De de La Torre, L., Zapata, O., Lievano, A., & Darszon, A. (1993). Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS Letters*, 329(1–2), 210–214. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80223-H](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80223-H)
- Sánchez, D., Labarca, P., & Darszon, A. (2001). Sea urchin sperm cation-selective channels directly modulated by cAMP. *FEBS Letters*, 503(1), 111–115. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02713-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02713-2)
- Seifert, R., Flick, M., Bönigk, W., Alvarez, L., Trötschel, C., Poetsch, A., Müller, A., Goodwin, N., Pelzer, P., Kashikar, N. D., Kremmer, E., Jikeli, J., Timmermann, B., Kuhl, H., Fridman, D., Windler, F., Kaupp, U. B., & Strünker, T. (2015). The C at S per channel controls chemosensation in sea urchin sperm . *The EMBO Journal*, 34(3), 379–392.
<https://doi.org/10.15252/embj.201489376>
- Smith, J. F., Syritysyna, O., Fellous, M., Serres, C., Mannowetz, N., Kirichok, Y., & Lishko, P. V. (2013). Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6823–6828. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216588110>
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., & Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature*, 471(7338), 382–386.
<https://doi.org/10.1038/nature09769>
- Vacquier, V. D., Loza-Huerta, A., García-Rincón, J., Darszon, A., & Beltrán, C. (2014). Soluble adenylyl cyclase of sea urchin spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(12), 2621–2628. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.011>
- Wood, C. D., Nisihigaki, T., Furuta, T., Baba, S. A., & Darszon, A. (2005). Real-time analysis of the role of Ca²⁺ in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *Journal of Cell Biology*, 169(5), 725–731.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200411001>

APÉNDICE

Artículo publicado:

Loyo-Celis, V., Orta, G., Beltrán, C., & Darszon, A. (2021). CatSper channels in sea urchin sperm. *Cell Calcium*, 99(August).
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102466>



CatSper channels in sea urchin sperm

Verónica Loyo-Celis, Gerardo Orta, Carmen Beltrán, Alberto Darszon*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Calcium
CatSper
Patch-clamp
Sea urchin
Sperm

ABSTRACT

Sea urchin sperm swimming is regulated by speract, a decapeptide released from egg jelly that induces chemotaxis and triggers membrane potential (E_m) changes, intracellular increases in cyclic nucleotides (cGMP, cAMP), pH (pH_i) and calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$). The identity of the ionic transporters associated with the $[Ca^{2+}]_i$ changes required for chemotaxis is not fully known. CatSper, a sperm exclusive Ca^{2+} channel has been detected by proteomic analysis and immunofluorescence in sea urchin sperm and there is evidence for its involvement in chemotaxis. This work presents an electrophysiological characterization of a CatSper channel in sea urchin sperm. By swelling sperm suspending them in 10-fold diluted artificial sea water (ASW) we achieve on-cell patch-clamp recordings that document a mildly voltage and pH_i dependent Na^+ permeable channel (in absence of divalent ions in the pipette), sensitive to speract, and blocked by Mibefradil (Mibe), NNC55-0396 (NNC) and RU1968 (RU) resembling CatSper. We also recorded a voltage dependent Cl^- channel inhibited by Niflumic Acid and the TMEM16A blocker.

1. Introduction

In many marine organisms such as sea urchins, fertilization requires chemotaxis between the sperm and egg. Chemotaxis involves flagellar beat fine regulation to allow sperm to swim towards the source of chemical attractant, the egg [1,2,3]. During chemotaxis, a signaling cascade triggers intertwined biochemical and electrophysiological processes that result in membrane potential (E_m) changes, intracellular increases in cyclic nucleotides (cGMP, cAMP), pH (pH_i) and calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) that control flagellar beating [4,5].

The main molecular entity associated with the transport of Ca^{2+} into mammalian and sea urchin sperm is the CatSper channel, a flagella-specific and Ca^{2+} -selective channel. In mammals, it consists of four alpha (α) subunits (CatSper1–4), six transmembrane segments (S1–S6), amongst which S4 constitutes the voltage-sensor and the pore (P) is located between S5–S6 [6]. In addition, CatSper has six accessory subunits (β , γ , δ , ϵ , ζ and EFCAB9) [7], while in *S. purpuratus* sperm, only CatSper1, 2, 4 and β , ϵ (initially reported as δ) and γ , were identified by proteomic analysis [4].

CatSper-KO male mice [8] and humans with certain mutations in the CatSper1 subunit (CatSper1^{-/-}) [9] are sterile, since their sperm are unable to develop the hyperactivated motility pattern during capacitation. Due to the physiological relevance of CatSper channels, their

biophysical properties have been characterized in mammalian sperm. They are mildly voltage-dependent, activated by alkaline pH_i [10], by progesterone (in human sperm) [11,12], modulated by cAMP via PKA (in mouse sperm) [13] and blocked with HC-056456 (HC), NNC55-0396 (NNC), Mibefradil (Mibe) and RU1968 (RU) [11,14,15]. Notably, it has not been possible to express this channel functionally in heterologous systems, which has made it difficult to study its structure-function relationship.

In recent years by bioinformatic assays, fluorescence measurements and biochemical techniques, the presence of CatSper has been documented in sea urchin sperm [4,16]. Nonetheless, this channel has not been electrophysiologically characterized in these cells possibly due to their morphology (absence of cytoplasmic droplet) and small size (2–4 μm of head diameter and 50 μm in flagellum length). In this work, the functionality of the CatSper channel in sea urchin sperm was determined for the first time by patch-clamp recordings in the cell-attached configuration.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and sources

CaCl₂, EDTA, EGTA, HEPES, KCl, MgCl₂, Mibefradil, NaCl, Na

* Corresponding author at: Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad #2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, CP 62250, México.

E-mail address: alberto.darszon@ibt.unam.mx (A. Darszon).

<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102466>

Received 24 May 2021; Received in revised form 13 August 2021; Accepted 26 August 2021

Available online 31 August 2021

0143-4160/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

gluconate, NH_4Cl , NNC55–0396 and Triton X-100 from Sigma-Aldrich (Toluca, Estado de México, México). Fluo-4 from (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Speract was provided by Dr. Yoshiro Tatsu and RU1968 by Prof. Dr. Timo Strünker. Artificial sea water's (ASW) composition was in mM: 465 NaCl, 26 MgCl_2 , 30 MgClO_4 , 10 CaCl_2 , 2.5 NaHCO_3 , 0.1 EDTA and 10 HEPES (pH=8.0 adjusted with NaOH). 1CaASW is ASW containing 1 mM CaCl_2 (pH=7.4). The osmolarity of both ASW was 980–1000 mOsm. The composition of artificial sea water diluted 10-fold (DSW) was in mM: 49 NaCl, 1 CaCl_2 , 25 MgCl_2 , 1 KCl, 10 HEPES, 0.1 EDTA (pH=7.4 adjusted with NaOH and the osmolarity was 155 mOsm).

2.2. Sea urchin and sperm collection

The animal procedures were conducted in compliance with local, state, and national regulations for the use of animals. *L. pictus* sea urchin species were obtained from Marinus Scientific LLC (Long Beach, California, USA) and *S. purpuratus* from Pamanes Inc. (Ensenada, Baja California, México), both species were maintained at 15–16 °C in commercial sea water from Instant Ocean® (Blacksburg, Virginia, USA). Sperm were obtained by intracoelomic injection of the sea urchins with 0.5 M KCl (0.5–1.0 mL), collected and kept on ice as dry sperm until used.

2.3. Antibodies

The polyclonal anti-CatSper1 serum was prepared by Bio-Synthesis Inc (www.biosyn.com), injecting a rabbit with a mixture of two antigenic peptides (AB1327–1: NH₂-CERDALRKAALKEAEDALFDDCOOH and AB1327–2: NH₂-CNQQGLDKVLLVQDTVDD-COOH) synthesized based on the predicted sequence (XP_030854941.1; calculated MW=54,440 Da) for CatSper1 from the *S. purpuratus* genome. Secondary antibody: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.4. Immunofluorescence

Sperm were diluted 1:100 in DSW to induce swelling as described. Hypotonically swollen sperm can be loaded with fluorescent probes for pH_i and $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Once swollen, sperm preserve many of their physiological properties like responding to speract by increasing their pH_i and $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and activating K^+ channels [17,18,19]. The reasons just stated indicate that swollen sea urchin sperm are a suitable functional model to study ion signal transduction.

The immunofluorescence protocol was performed as described [20], swollen sperm were incubated overnight at 4 °C with anti-CatSper1 (diluted 1:100 in PBS) or anti-CatSper1+antigenic peptides (AB1327–1+AB1327–2).

2.5. Fluorometric determinations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in sperm populations

Sperm fluorescence measurements were done in a SLM 8000 Aminco Spectrofluorometer (SLM Instruments, INC, Urbana, IL, USA) as described [21].

2.6. Electrophysiology

Ion currents were recorded and analyzed in swollen sea urchin sperm using the patch-clamp technique in the cell-attached configuration as described [13]. A voltage-step protocol from -100 mV to +100 mV in 10 mV increments with a holding potential of 0 mV (100 ms of duration) and a voltage-ramp protocol from -100 mV to +100 mV with a holding potential of 0 mV (1 s of duration) were used. Fire-polished patch-clamp pipettes had a final resistance between 20 and 30 M Ω and an estimated inner diameter of 0.4 μm . The pipette solution (divalent free solution) composition in mM was: 150 Na gluconate, 5 NaCl, 20 HEPES, 5 EGTA

(pH = 7 adjusted with NaOH) and the bath solution was: 49 NaCl, 1 CaCl_2 , 25 MgCl_2 , 1 KCl, 10 HEPES, 0.1 EDTA (pH=7.4 adjusted with NaOH). The osmolarity of bath solution was 155 mOsm.

2.7. Data analysis

Results were expressed as the mean \pm s.e.m, indicating the corresponding number (n) of independent experiments. The One-Way ANOVA and Bonferroni post hoc test were used for statistical evaluations in the data obtained from the patch-clamp recordings, and the paired Student's *t*-test was used only in the data obtained from fluorescence measurements. In all tests, differences were considered significant when $*p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Studying CatSper in swollen sea urchin sperm

Detailed studies about the distribution of the sperm exclusive Ca^{2+} channel CatSper have been reported in the flagellum of mouse and human sperm [6,7]. In sea urchin sperm, CatSper was initially detected by bioinformatics and then shown to be present by proteomic analysis, biophysical and immunofluorescence techniques [4,16,22]. In spite of this, and its reported fundamental participation in chemotaxis, until now this channel has not been electrophysiologically characterized due to the morphology and small size of these cells. To surmount these intrinsic limitations, we decided to employ the experimental strategy devised by [17] which consisted of swelling sea urchin sperm in 1/10 diluted sea water (see Materials and Methods), thus increasing the success rate of gigaseal formation (Table 1) (the success rate of gigaseal formation without swelling is ~3% [23]). Once this methodology was implemented, CatSper was localized by immunofluorescence in swollen sea urchin sperm. The resulting swollen spherical sperm display the end piece of the flagellum on one side. It turns out CatSper is located on the entire region of the flagellum, part of which is incorporated in the sphere (Fig. 1A). These experiments were performed utilizing an antibody generated against a sea urchin sperm CatSper1 sequence (see Materials and Methods) whose specificity was corroborated using the corresponding peptides, as shown in Fig. 1B. Taking these observations into account, seals were always obtained in this area. The functional presence of CatSper in sea urchin sperm has been documented measuring $[\text{Ca}^{2+}]_i$ with fluorescent dyes in populations and in individual cells [4, 15,24]. Before beginning our electrophysiological studies, we corroborated the functional expression of CatSper in sea urchin sperm. We performed fluorometric determinations in sea urchin sperm with the Ca^{2+} indicator Fluo-4. CatSper's characteristic activation with alkaline pH_i was employed to stimulate it [6,7]. An NH_4Cl addition was used to elevate pH_i and activate CatSper. Figure S1A-B illustrates a representative response of an *S. purpuratus* sperm population to NH_4Cl (light gray trace) and to the CatSper blocker NNC55–0396 (NNC, dark gray trace). As reported earlier, NNC by itself induces a large $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase which does not return to the basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level [4]. The mechanism by which NNC raises intracellular calcium is not known but the hypothesis proposed is that NNC as other weak bases can accumulate into the cytoplasmic space and elevate pH from acidic Ca^{2+} stores such as the acrosome, and trigger Ca^{2+} release. We report this effect in [25]. This collateral effect complicates estimating the CatSper inhibiting ability of the blocker. To estimate the inhibition caused by NNC on the activation

Table 1

Success rate of gigaseal formation in swollen sea urchin sperm of *L. pictus* and *S. purpuratus* species.

Species	Seals/attempts	Success rate
<i>L. pictus</i>	372/893	42%
<i>Spurpuratus</i>	565/940	60%

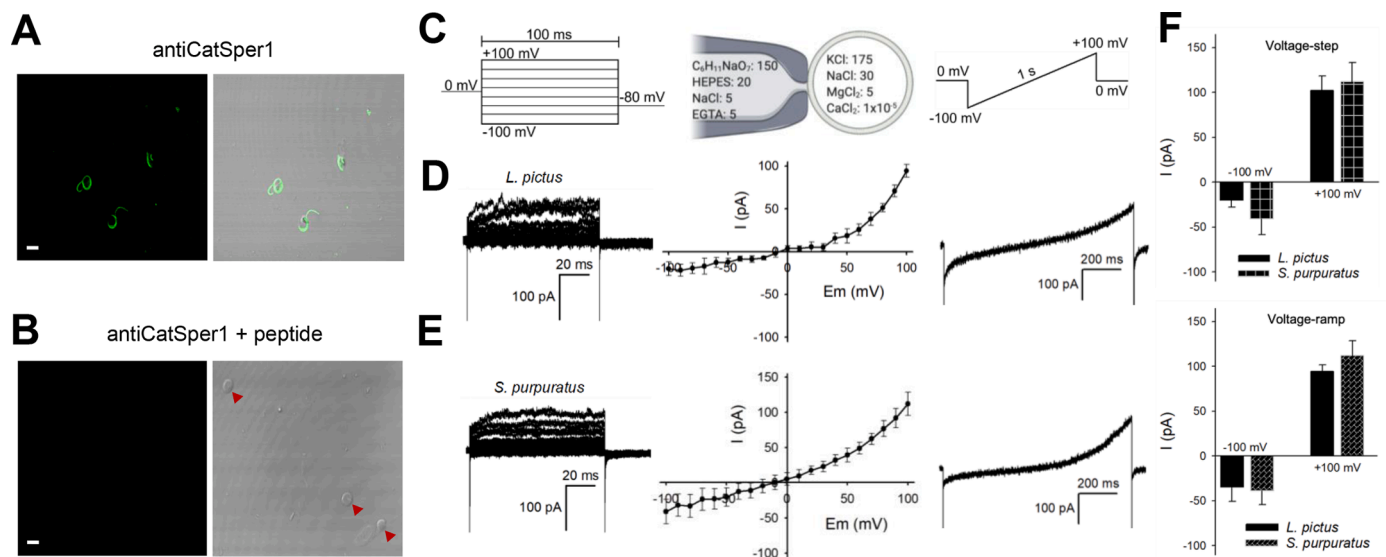


Fig. 1. The CatSper channel is expressed in the flagellum of swollen sea urchin sperm. The polyclonal anti-CatSper1 serum was synthesized based on the predicted sequence for CatSper1 from the *S. purpuratus* genome (see Materials and Methods). Anti-CatSper1 immunofluorescence in (A) absence (CatSper expression in the flagellum is detected) and (B) presence of the antigenic peptides. Left: Images obtained by fluorescence microscopy. Right: Superposition of images obtained by bright-field and fluorescence; red arrows point to swollen sea urchin sperm in images obtained by bright-field. Scale bar=4 μm ($n=3$). (C) Voltage-step (left) and voltage-ramp protocol (right) used for recording monovalent current in cell-attached voltage-clamp experiments, ion conditions in [mM] (central). (D-E) Representative monovalent cell-attached current recorded from (D) *L. pictus* and (E) *S. purpuratus* sperm (left: voltage-step; right: voltage-ramp; central: current-voltage relation of recordings as in left, *L. pictus* ($n=4$) and *S. purpuratus* ($n=6$)). (F) Bars represent the mean \pm s.e.m of recordings as in (D-E) (upper: voltage-step, *L. pictus* ($n=4$) and *S. purpuratus* ($n=6$); lower: voltage-ramp, *L. pictus* ($n=98$) and *S. purpuratus* ($n=120$)). Note that the application of both protocols generated a voltage-dependent ion current with similar magnitude and the reversal potential is the same in voltage-step recordings of both species.

of CatSper induced by adding NH_4Cl , the data were normalized as follows. The reference value considered was the maximum response obtained by the addition of Triton X-100 which allows external Ca^{2+} to saturate Fluo-4. The fluorescence change induced by the addition of 10 mM NH_4Cl was expressed relative to the reference. NNC inhibited 25% of the NH_4Cl response (Figure S1C-D). These findings suggest, as anticipated, that CatSper is functionally present in sea urchin sperm. However, our results are consistent with the proposal that sea urchin sperm possess other pH_i sensitive Ca^{2+} uptake systems in addition to CatSper [26].

3.2. Recording ion currents in swollen sea urchin sperm of *L. pictus* and *S. purpuratus* species

CatSper channels in mammalian sperm have been shown by patch-clamp to display a mild voltage-dependence, alkali-activation [10] and blockade by Mibefradil (Mibe), NNC and RU [11,15]. To electrophysiologically explore their presence in sea urchin sperm, we implemented experimental strategies similar to those previously described in mammalian sperm. The success rate of gigaseal formation in swollen sea urchin sperm is presented in (Table 1). Our multiple attempts to establish a stable whole-cell configuration in the swelling media or in other media were unsuccessful. Considering this result, we decided to record in the cell-attached voltage-clamp configuration, which was stable for minutes. The external solution that has been extensively used in electrophysiological recordings of CatSper channels in mammalian sperm is free of divalent cations (DVF), containing only monovalents [10–15,27]. Under these ionic conditions in the patch pipette, considering the on-cell configuration, we compared the currents obtained with two voltage protocols, one using voltage-steps from -100 mV to +100 mV in 10 mV increments with a holding potential of 0 mV (100 ms of duration) and another employing a voltage-ramp protocol from -100 mV to +100 mV, also with a holding potential of 0 mV and a 1 s duration (Fig. 1C). These two protocols were tested on sperm from both *L. pictus* and *S. purpuratus* sea urchins. The application of the two protocols in

both species generated mildly voltage-dependent monovalent currents whose amplitude and reversal potential (*L. pictus* ($n=4$): -10 ± 1 mV and *S. purpuratus* ($n=6$): -14 ± 2 mV) were similar (Fig. 1D-E). The current magnitudes recorded with voltage-steps were: *L. pictus* ($n=4$): -100 mV= -20.0 ± 7.7 pA, +100 mV= 102.2 ± 7.5 pA and *S. purpuratus* ($n=6$): -100 mV= -40.7 ± 1.7 pA, +100 mV= 111.8 ± 1.6 pA, while the voltage-ramp protocols yielded: *L. pictus* ($n=98$): -100 mV= -34.3 ± 1.5 pA, +100 mV= 94.2 ± 2.9 pA; *S. purpuratus* ($n=120$): -100 mV= -39.6 ± 1.8 pA, +100 mV= 112.1 ± 2.3 pA. No statistically significant difference was found either between voltage protocols or species (Fig. 1F). In addition, we generated conductance-voltage curves of monovalent currents recorded with the voltage-step protocol from the same sperm before (control, black trace) and after adding 10 mM NH_4Cl (gray trace). Under these conditions the potential at which half of the channels are activated ($V_{1/2}$) shifted from 100 ± 4 mV to 70 ± 1 mV. The conductance increase caused by NH_4Cl is shown in Figure S2A. Because the sea urchin sperm seals are not long lasting and the information required to electrophysiologically identify and characterize CatSper currents can be obtained in shorter times with the voltage-ramp protocol, we decided to use this strategy in the following experiments.

3.3. Monovalent currents in sea urchin sperm consistent with active CatSper channels

To strengthen the evidence for the presence of functional CatSper channels in sea urchin sperm, we performed voltage-ramp protocols to record monovalent current from the same sperm under three different conditions: Control (black trace), in presence of 10 mM NH_4Cl to alkalinize pH_i and stimulate CatSper currents (dark gray trace) and in the presence of three CatSper blockers (gray traces) (Mibe (10 μM) (Fig. 2A-B); NNC (5 μM) (Fig. 2C-D) and RU (10 μM) (Fig. 3A-B)). This latter blocker is the most specific inhibitor of CatSper channels so far [15]. These experiments were performed using *S. purpuratus* and *L. pictus* swollen sea urchin sperm. The alkali-stimulated ion current was inhibited by all three CatSper blockers in sperm from both species

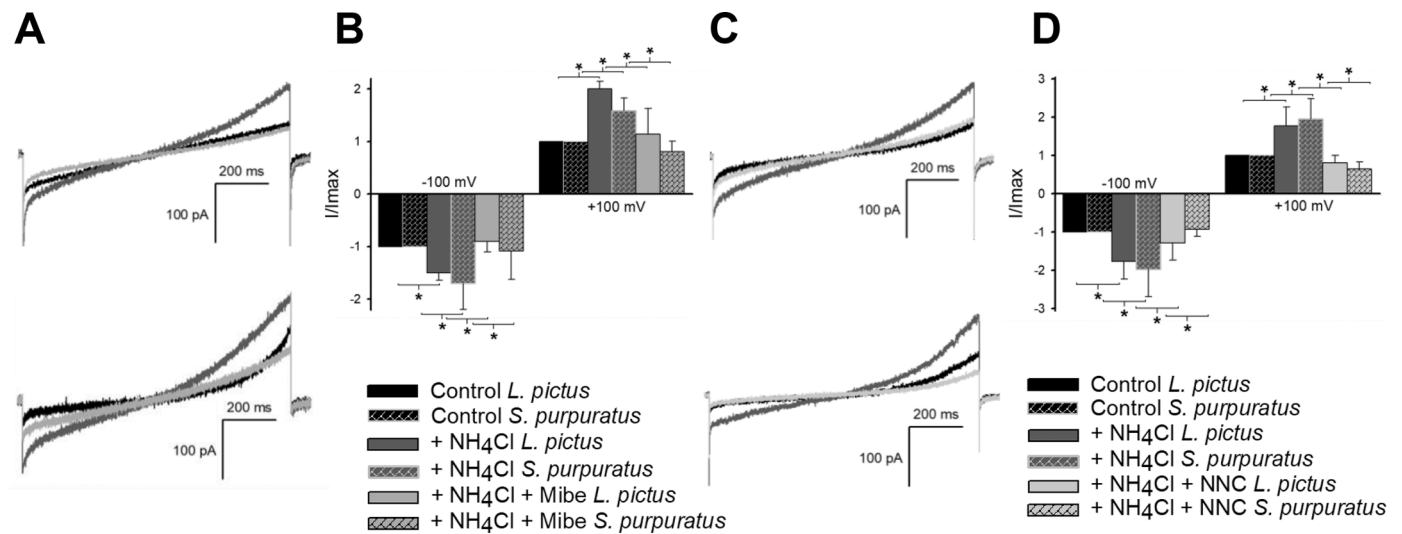


Fig. 2. The DVF ion current recorded in swollen sea urchin sperm is activated with NH_4Cl and blocked by Mibe and NNC. (A and C) Representative monovalent current recordings in sea urchin sperm of *L. pictus* ($n=3$) (upper) and *S. purpuratus* ($n=4$) (lower). The voltage-ramp protocol is the same as shown in Fig. 1 (panel C, right). Current recorded from the same spermatozoa under three different conditions: control (black trace), in presence of 10 mM NH_4Cl (dark gray trace) and 10 μM Mibe (gray trace, panel A) or 5 μM NNC (gray trace, panel C). The alkali-stimulated ion current is inhibited by the CatSper channel blockers Mibe and NNC in both species. (B and D) Bars represent normalized current amplitudes with respect to control measurement at -100 and +100 mV under different experimental conditions shown in panel A and C. The data plotted are the mean \pm s.e.m. $*p \leq 0.05$ (One-Way ANOVA and Bonferroni post hoc test).

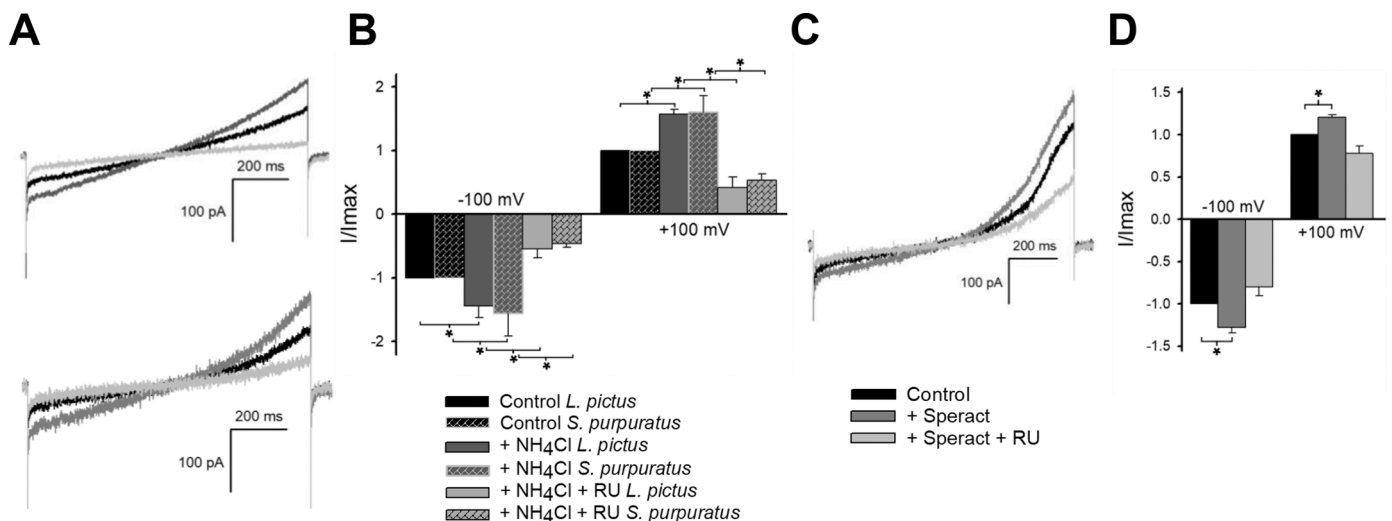


Fig. 3. The DVF ion current recorded in swollen sea urchin sperm is activated with NH_4Cl or speract and blocked up with the specific CatSper channel blocker RU1968 (RU). (A and C) Representative monovalent current recordings in sea urchin sperm of *L. pictus* ($n=3$) (upper) and *S. purpuratus* ($n=3$) (lower, panel A). Current recorded from the same spermatozoa under three different conditions: control (black trace), in presence of 10 mM NH_4Cl (dark gray trace, panel A) or 100 nM speract (dark gray trace, panel C) and 10 μM RU (light gray trace). Note that in the presence of RU, the current fell below the initial control (recorded before NH_4Cl (A) or speract (C) additions). (B and D) Bars represent normalized current amplitudes with respect to control measurement at -100 and +100 mV under the different experimental conditions shown in panel A and C. The data plotted are the mean \pm s.e.m. $*p \leq 0.05$ (One-Way ANOVA and Bonferroni post hoc test).

studied (see Figs. 2,3). These results are consistent with the presence of a functional CatSper channel in sea urchin sperm displaying the most salient biophysical and pharmacological characteristics described in mammals.

3.4. Speract stimulates a monovalent cation current inhibited by CatSper channel blockers

Having documented on-cell currents consistent with the main properties of CatSper, it became necessary to explore if they would, as anticipated, be stimulated by speract. Fig. 3C illustrates that 100 nM speract does stimulate the current recorded under CatSper conditions. We show representative responses for the *L. pictus* sea urchin species.

The current activation was more pronounced at negative membrane potentials (at -100 mV was 22% and at +100 mV was 17%). The speract stimulated current was sensitive to RU as shown in Fig. 3D.

3.5. Characterization of the main CatSper blocker resistant current

Our on cell-attached patch-clamp experiments employing CatSper channel inhibitors revealed the presence of a blocker resistant current (see Table 2). We therefore proceeded to electrophysiologically characterize this remaining current recorded after adding the CatSper blocker, Mibe (Fig. 4A-B). Considering the composition of the recording media (see Materials and Methods) and how the reversal potential shifted when CatSper was blocked (from -10 ± 1 mV to -32 ± 1 mV), it

Table 2
Current type recording in swollen sea urchin sperm with DVF and voltage-ramp protocol.

Species	Current type	Recording current/ total recordings	Recording percentage
<i>L. pictus</i>	None	24/294	8%
	CatSper	102/294	35%
	Non-CatSper	168/294	57%
<i>S. purpuratus</i>	None	42/423	10%
	CatSper	126/423	30%
	Non-CatSper	254/423	60%
	CatSper		

seemed likely that the residual current was anionic. This residual current is outwardly rectifying. Taking these observations into account we decided to test a not very specific anion channel blocker, Niflumic Acid (NFA). Furthermore, this antagonist had been shown to significantly alter the $[Ca^{2+}]_i$ oscillations triggered by speract in sea urchin sperm from the two sea urchin sperm species studied here, and inhibited chemotaxis [28]. After stimulating the CatSper current with NH_4Cl and blocking it with Mibe, NFA blocked the remaining current (62% at -100 mV and 72% at +100 mV), and the reversal potential shifted (from -32 ± 1 mV to -23 ± 2 mV) as shown in Fig. 4A, it also inhibited basal current (at -100 mV 39% for *L. pictus* and 51% for *S. purpuratus* and at +100 mV 34% for *L. pictus* and 48% for *S. purpuratus*) (Fig. 5A-B). These data suggest the functional expression of a Cl^- channel in sea urchin sperm.

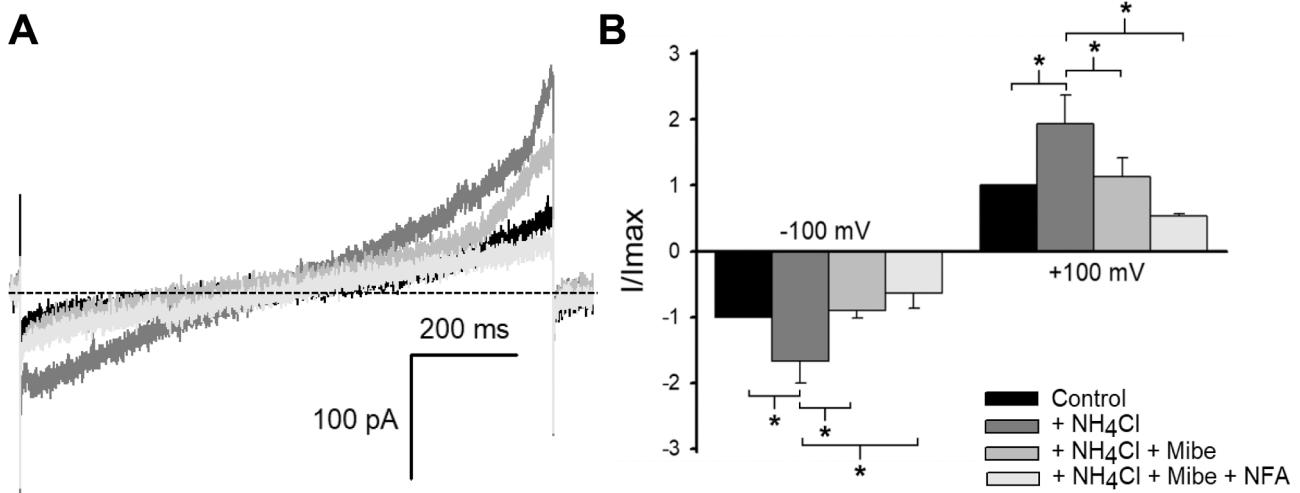


Fig. 4. Remaining current (non-CatSper) characterization. (A) Representative monovalent current recordings in sea urchin sperm of *L. pictus* ($n=3$). Current recorded from the same spermatozoa under four different conditions: control (black trace), in presence of 10 mM NH_4Cl (dark gray trace), 10 μM Mibe (gray trace) and 10 μM Niflumic Acid (NFA) (light gray trace). After the effect of NH_4Cl (increase) and Mibe (block) in the monovalent current, NFA blocks the remaining current. (B) Bars represent normalized current amplitudes with respect to control measurement at -100 and +100 mV under the different experimental conditions shown in A. The data plotted are the mean \pm s.e.m. $*p \leq 0.05$ (One-Way ANOVA and Bonferroni post hoc test).

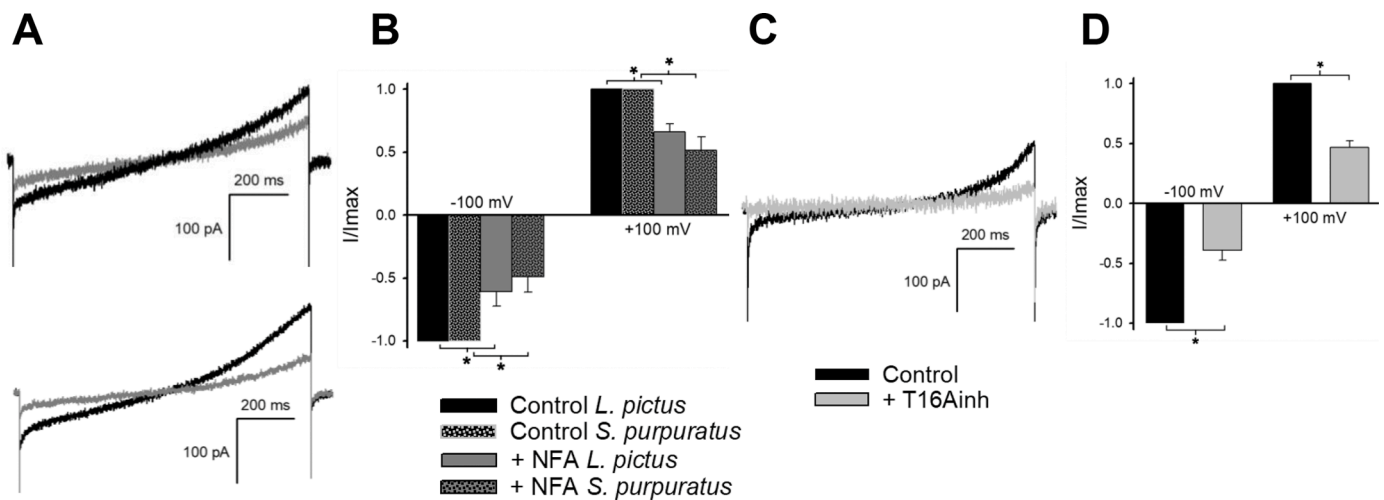


Fig. 5. TMEM16A inhibitors block the non-CatSper current in sea urchin sperm. (A and C) Representative monovalent current recordings in sea urchin sperm of *L. pictus* ($n=3$) (upper) and *S. purpuratus* ($n=4$) (lower, panel A). Basal current recorded from the same spermatozoa under two different conditions: control (black trace) and in presence of 10 μM NFA (dark gray trace, panel A) or 10 μM TMEM16A inhibitor (T16Ainh) (light gray trace, panel C). (B and D) Bars represent normalized current amplitudes with respect to control measurement at -100 and +100 mV under the different experimental conditions shown in panel A and C. The data plotted are the mean \pm s.e.m. $*p \leq 0.05$ (One-Way ANOVA and Bonferroni post hoc test). Note that monovalent current in control condition is inhibited by NFA and T16Ainh.

3.6. TMEM16 inhibitor blocks the residual anionic current in sea urchin sperm

The main target of NFA is a Ca^{2+} activated Cl^- channel (CaCC) [29]. On the other hand, Molecular Biology [30] and proteomics of isolated flagella membranes from *S. purpuratus* sea urchin sperm had revealed that this channel is expressed in this cell [31]. To corroborate the functional expression of this channel in sea urchin sperm, we examined if the currents we recorded from sea urchin sperm were sensitive to a very specific blocker for CaCC (TMEM16A), TMEM16Ainh (T16Ainh). **Fig. 5C-D** show representative control currents (black trace) and in the presence of 10 μM T16Ainh (light gray trace). T16Ainh appears to be more potent against currents in sperm from *L. pictus* ($n=3$) than *S. purpuratus* ($n=2$). However, as the difference is not statistically significant, it is only suggestive of expression differences for these channels between species. These experimental observations are consistent with the functional expression of TMEM16A channels in sea urchin sperm.

4. Discussion

The electrophysiological characterization of ion channels in sea urchin sperm has been scantily explored due to the absence of a cytoplasmic droplet and their small size (2–4 μm of head diameter and less than 1 μm of flagellar width). To surmount these vicissitudes, we have implemented various methodologies such as the fusion of sperm plasma membranes into lipid bilayers [32] and bilayer formation at the tip of patch-clamp electrodes derived from isolated sperm plasma membranes [33]. Nonetheless, the need to record electrical activity of ion channels directly in sea urchin sperm [23] generated alternative strategies such as those described by [17] where these cells were swollen to improve the success rate of gigaseal formation. Once swollen, sperm preserve many of their physiological properties like responding to speract by increasing their pH_i and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and activating K^+ channels [18,19]. Taking this into account, we decided to utilize this approach [17], as well as experimental conditions employed in the characterization of CatSper channels in mammalian sperm [10–15,27], in order to determine the functionality of CatSper in sea urchin sperm.

Since our strategy involves swelling sea urchin sperm, we used immunofluorescence to examine the location of CatSper in the swollen cells. We detected CatSper staining in the remaining flagellum and the plasma membrane surrounding it, where gigaseals were obtained. Here we report the electrophysiological characterization of a CatSper channel present in sea urchin sperm swollen by suspending these cells in 10-fold diluted artificial sea water. Under such conditions our on-cell patch-clamp recordings revealed a mildly voltage and pH_i dependent Na^+ permeable channel, blocked by Mibefradil, NNC55–0396 and RU1968 resembling CatSper. After intracellular alkalization $V_{1/2}$ shifts from 100 ± 4 mV to 70 ± 1 mV in contrast to what was described in mouse sperm (from 87 to 11 ± 1 mV) [10]. This difference could be due to the fact that in the on-cell configuration we do not control the resting membrane potential which most certainly will change upon adding NH_4Cl and elevating pH_i [34] that according to convention influences $V_{1/2}$ estimation [17].

It is notable that in our recordings in swollen sea urchin sperm, under conditions to detect CatSper, we have seldomly observed single channel activity. This finding could be explained, at least in part, by a recent report indicating that the mouse sperm CatSper1 subunit was found to reside in membrane microdomains [35]. Furthermore, lipid raft formation has been widely documented in these cells [36,37,38]. Therefore, it seems reasonable that CatSper channels may be forming large complexes and or aggregates in swollen sea urchin sperm, which could be the reason why we mostly obtained macroscopic currents in our cell-attached voltage-clamp recordings. Additionally, as the CatSper single channel conductance is unknown, it could be smaller than our detection capabilities.

Having found CatSper currents in swollen sea urchin sperm, in which

a previous study detected single K^+ channels activated by speract [18], we examined if under CatSper recording conditions this peptide would activate such currents. We found that speract indeed stimulated currents that were blocked by the most specific CatSper blocker, RU1968. These findings altogether are consistent with CatSper being responsible for a significant fraction of the currents stimulated by speract under these conditions, as they were inhibited by blockers of this channel.

During the electrophysiological study of the CatSper currents in swollen sea urchin sperm, we documented a CatSper blocker resistant current that was also characterized. Bearing in mind that in the ionic recording conditions used in this work, the main ions were Na^+ , K^+ and Cl^- , we initially assessed the effect of Niflumic Acid (NFA), a general Cl^- channel blocker. This blocker had been shown to inhibit sea urchin sperm chemotaxis and alter the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations induced by speract [1]. We observed that NFA caused a significant decrease in the magnitude of the remaining current which is mainly an outward current. Since NFA is not very specific, we evaluated the effect of T16Ainh, a much more specific blocker of the calcium-activated Cl^- channels (CaCCs) TMEM16A. It is worth pointing out that the sequence of TMEM16 was first detected in sea urchin sperm even before it was known to be a Cl^- channel [30]. The protein has been detected by proteomic assays in sea urchin sperm [31]. As the speract pathway results in an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, it has been suggested from modeling efforts that calcium-activated K^+ (CaKC) and CaCCs are activated to restart the pathway through a new hyperpolarization [4].

5. Conclusion

The evidence generated in this work confirms the functional expression in sea urchin sperm of CatSper currents and TMEM16A, a channel activated by Ca^{2+} that permeates Cl^- .

Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [grant number: Frontiers 71 to A.D.]; Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM) [grant number: IN200919 to A.D. and IN215519 to C.B.]. Verónica Loyo-Celis is a PhD. student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a fellowship 435022 from CONACYT.

CRedit authorship contribution statement

Verónica Loyo-Celis: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – original draft. **Gerardo Orta:** Conceptualization, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Carmen Beltrán:** Funding acquisition, Methodology, Resources, Writing – review & editing. **Alberto Darszon:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome. We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us. We confirm that we have given due consideration to the protection of intellectual property associated with this work and that there are no impediments to publication, including the timing of publication, with respect to intellectual property. In so doing we confirm that we have

followed the regulations of our institutions concerning intellectual property. We further confirm that any aspect of the work covered in this manuscript that has involved experimental animals has been conducted with the ethical approval of all relevant bodies and that such approvals are acknowledged within the manuscript. We understand that the Corresponding Author is the sole contact for the Editorial process (including Editorial Manager and direct communications with the office). He is responsible for communicating with the other authors about progress, submissions of revisions and final approval of proofs. We confirm that we have provided a current, correct email address which is accessible by the Corresponding Author. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank Xóchitl del Carmen Alvarado Affantranger, Yoloxóchitl Sánchez Guevara and José Luis De la Vega-Beltrán for technical assistance, and Timo Strünker for providing us with RU1968. Graphical abstract was created with BioRender.com.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ceca.2021.102466](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102466).

References

- Guerrero, C.D. Wood, T. Nishigaki, J. Carneiro, A. Darszon, Tuning sperm chemotaxis, *Biochem. Soc. Trans.* 38 (2010) 1270–1274, <https://doi.org/10.1042/BST0381270>.
- Wachten, J.F. Jikeli, U.B. Kaupp, Sperm sensory signaling, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9 (2017), <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028225>.
- H.V. Ramírez-Gómez, V.J. Sabinina, M.V. Pérez, C. Beltrán, J. Carneiro, C.D. Wood, I. Tuval, A. Darszon, A. Guerrero, Sperm chemotaxis is driven by the slope of the chemoattractant concentration field, *Elife* 9 (2020) 1–32, <https://doi.org/10.7554/eLife.50532>.
- J. Espinal-Enríquez, D.A. Priego-Espinosa, A. Darszon, C. Beltrán, G. Martínez-Mekler, Network model predicts that CatSper is the main Ca²⁺ channel in the regulation of sea urchin sperm motility, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–14, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03857-9>.
- D.A. Priego-Espinosa, A. Darszon, A. Guerrero, A.L. González-Cota, T. Nishigaki, G. Martínez-Mekler, J. Carneiro, Modular analysis of the control of flagellar Ca²⁺-spike trains produced by CatSper and Ca^v channels in sea urchin sperm, 2020. 10.1371/journal.pcbi.1007605.
- P.V. Lishko, Y. Kirichok, D. Ren, B. Navarro, J.-J. Chung, D.E. Clapham, The control of male fertility by spermatozoan ion channels, *Annu. Rev. Physiol.* 74 (2012) 453–475, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153258>.
- J.Y. Hwang, N. Mannowetz, Y. Zhang, R.A. Everley, S.P. Gygi, J. Bewersdorf, P. V. Lishko, J.J. Chung, Dual sensing of physiologic pH and calcium by EFCAB9 regulates sperm motility, *Cell* 177 (2019) 1480–1494, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.047>, e19.
- H. Qi, M.M. Moran, B. Navarro, J.A. Chong, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky, Y. Kirichok, I.S. Ramsey, T.A. Quill, D.E. Clapham, All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility, (2006).
- J.F. Smith, O. Syrtysyna, M. Fellousc, C. Serres, N. Mannowetz, Y. Kirichok, P. V. Lishko, Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110 (2013) 6823–6828, <https://doi.org/10.1073/pnas.1216588110>.
- Y. Kirichok, B. Navarro, D.E. Clapham, Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel, *Nature* 439 (2006) 737–740, <https://doi.org/10.1038/nature04417>.
- P.V. Lishko, I.L. Botchkina, Y. Kirichok, Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm, *Nature* 471 (2011) 387–391, <https://doi.org/10.1038/nature09767>.
- T. Strünker, N. Goodwin, C. Brenker, N.D. Kashikar, I. Weyand, R. Seifert, U. B. Kaupp, The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm, *Nature* 471 (2011) 382–386, <https://doi.org/10.1038/nature09769>.
- G. Orta, J.L. De La Vega-Beltrán, X.D. Martín-Hidalgo, C.M. Santi, P.E. Visconti, X. A. Darszon, CatSper channels are regulated by protein kinase A, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 16830–16841, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001566>.
- A.E. Carlson, L.A. Burnett, D. del Camino, T.A. Quill, B. Hille, J.A. Chong, M. M. Moran, D.F. Babcock, Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation, *PLoS ONE* 4 (2009), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006844>.
- A. Rennhack, C. Schiffer, C. Brenker, D. Fridman, E.T. Nitao, Y.M. Cheng, L. Tamburrino, M. Balbach, G. Stölting, T.K. Berger, M. Kierzek, L. Alvarez, D. Wachten, X.H. Zeng, E. Baldi, S.J. Publicover, U. Benjamin Kaupp, T. Strünker, A novel cross-species inhibitor to study the function of CatSper Ca²⁺ channels in sperm, *Br. J. Pharmacol.* 175 (2018) 3144–3161, <https://doi.org/10.1111/bph.14355>.
- R. Seifert, M. Flick, W. Bönigk, L. Alvarez, C. Trötschel, A. Poetsch, A. Müller, N. Goodwin, P. Pelzer, N.D. Kashikar, E. Kremmer, J. Jikeli, B. Timmermann, H. Kuhl, D. Fridman, F. Windler, U.B. Kaupp, T. Strünker, The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm, *EMBO J.* 34 (2015) 379–392, <https://doi.org/10.15252/embj.201489376>.
- D. Sánchez, P. Labarca, A. Darszon, Sea urchin sperm cation-selective channels directly modulated by cAMP, *FEBS Lett.* 503 (2001) 111–115, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02713-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02713-2).
- D.F. Babcock, M.M. Bosma, D.E. Battaglia, A. Darszon, Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 (1992) 6001–6005, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.6001>.
- E. Reynaud, L. De La Torre, O. Zapata, A. Lievano, A. Darszon, Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm, *FEBS Lett.* 329 (1993) 210–214, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80223-H](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80223-H).
- G. Granados-Gonzalez, I. Mendoza-Lujambio, E. Rodriguez, B.E. Galindo, C. Beltrán, A. Darszon, Identification of voltage-dependent Ca²⁺ channels in sea urchin sperm, *FEBS Lett.* 579 (2005) 6667–6672, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.035>.
- C. Beltrán, E. Rodríguez-Miranda, G. Granados-González, L. García de La Torre, T. Nishigaki, A. Darszon, Zn(2+) induces hyperpolarization by activation of a K(+) channel and increases intracellular Ca(2+) and pH in sea urchin spermatozoa, *Dev. Biol.* 394 (2014) 15–23, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.07.017>.
- X. Cai, D.E. Clapham, Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSper and CatSperβ, *PLoS ONE* 3 (2008) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003569>.
- A. Guerrero, J.A. Sánchez, A. Darszon, Single-channel activity in sea urchin sperm revealed by the patch-clamp technique, *FEBS Lett.* 220 (1987) 295–298, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80833-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80833-5).
- H. Hamzeh, L. Alvarez, T. Strünker, M. Kierzek, C. Brenker, P.E. Deal, E.W. Miller, R. Seifert, U.B. Kaupp, Kinetic and photonic techniques to study chemotactic signaling in sea urchin sperm, *Methods Cell Biol.* 151 (2019) 487–517, <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.12.001>.
- J.C. Chávez, J.L. De la Vega-Beltrán, O. José, P. Torres, T. Nishigaki, C.L. Treviño, A. Darszon, Acrosomal alkalization triggers Ca²⁺ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa, *J. Cell. Physiol.* 233 (2018) 4735–4747, <https://doi.org/10.1002/jcp.26262>.
- A.L. González-Cota, P.Á. Silva, J. Carneiro, A. Darszon, Single cell imaging reveals that the motility regulator speract induces a flagellar alkalization that precedes and is independent of Ca²⁺ influx in sea urchin spermatozoa, *FEBS Lett.* 589 (2015) 2146–2154, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.024>.
- N. Mannowetz, M.R. Miller, P.V. Lishko, Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114 (2017) 5743–5748, <https://doi.org/10.1073/pnas.1700367114>.
- A. Guerrero, J. Espinal, C.D. Wood, J.M. Rendón, J. Carneiro, G. Martínez-Mekler, A. Darszon, Niflumic acid disrupts marine spermatozoan chemotaxis without impairing the spatiotemporal detection of chemoattractant gradients, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 1477–1487, <https://doi.org/10.1242/jcs.121442>.
- F. Espinosa, J.L. De La Vega-Beltrán, I. López-González, R. Delgado, P. Labarca, A. Darszon, Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl⁻ channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction, *FEBS Lett.* 426 (1998) 47–51, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00305-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00305-6).
- B.E. Galindo, V.D. Vacquier, Phylogeny of the TMEM16 protein family: some members are overexpressed in cancer, *Int. J. Mol. Med.* 16 (2005) 919–924, <https://doi.org/10.3892/ijmm.16.5.919>.
- C. Beltrán, C.L. Treviño, E. Mata-Martínez, J.C. Chávez, C. Sánchez-Cárdenas, M. Baker, A. Darszon, Role of ion channels in the sperm acrosome reaction, *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 220 (2016) 35–69, https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7_3.
- A. Darszon, P. Labarca, T. Nishigaki, F. Espinosa, D. De Gene, Ion Channels in Sperm Physiology, 79 (1999) 481–511.
- A. Lievano, J.A. Sanchez, A. Darszon, Single-channel activity of bilayers derived from sea urchin sperm plasma membranes at the tip of a patch-clamp electrode, *Dev. Biol.* 112 (1985) 253–257, [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90140-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90140-X).
- F. Li, J. Eriksen, J. Finer-Moore, R. Chang, P. Nguyen, A. Bowen, A. Myasnikov, Z. Yu, D. Bulkley, Y. Cheng, R.H. Edwards, R.M. Stroud, Ion transport and regulation in a synaptic vesicle glutamate transporter, *Science* (80-) 368 (2020) 893–897, <https://doi.org/10.1126/science.aba9202>.
- L. Ded, J.Y. Hwang, K. Miki, H.F. Shi, J.-J. Chung, 3D in situ imaging of the female reproductive tract reveals molecular signatures of fertilizing spermatozoa in mice, *Elife* 9 (2020), <https://doi.org/10.7554/eLife.62043>.
- K. Ohta, C. Sato, T. Matsuda, M. Toriyama, V.D. Vacquier, W.J. Lennarz, K. Kitajima, Co-localization of receptor and transducer proteins in the glycosphingolipid-enriched, low density, detergent-insoluble membrane fraction of

- sea urchin sperm, *Glycoconj. J.* 17 (2000) 205–214, <https://doi.org/10.1023/A:1026589223811>.
- [37] E. Maehashi, C. Sato, K. Ohta, Y. Harada, T. Matsuda, N. Hirohashi, W.J. Lennarz, K. Kitajima, Identification of the sea urchin 350-kDa sperm-binding protein as a new sialic acid-binding lectin that belongs to the heat shock protein 110 family: implication of its binding to gangliosides in sperm lipid rafts in fertilization, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 42050–42057, <https://doi.org/10.1074/jbc.M307493200>.
- [38] V.D. Vacquier, A. Loza-Huerta, J. García-Rincón, A. Darszon, C. Beltrán, Soluble adenylyl cyclase of sea urchin spermatozoa, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842 (2014) 2621–2628, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.011>.