



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Los canales de calcio activados por voltaje y su
participación en la reacción acrosomal inducida
por ZP3hr en espermatozoides de humano

T E S I S

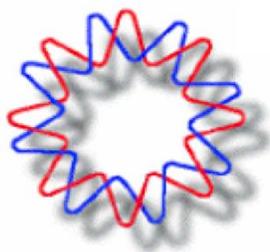
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

OMAR JOSÉ RAMÍREZ

DIRECTORA DE TESIS: Dra. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Este trabajo está dedicado a mis padres
y a mi hermana, las personas más importantes en mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Efraín y Romelia, por apoyarme siempre. Les debo todo lo que soy y lo que tengo.

A mi asesora de tesis, la Dra. Claudia Treviño Santa Cruz, por estos cuatro años de apoyo constante y por ser, académicamente, un excelente ejemplo a seguir. Muchas gracias por tu amistad.

Al Dr. Alberto Darszon Israel, por brindarme la oportunidad de formar parte de uno de los mejores laboratorios en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Al Dr. Takuya Nishigaki Shimizu, a la Dra. Mayel Chirinos Espín, a la Dra. Laura Palomares Aguilera y a la M. en C. Ana Ruth Pastor Flores, por todo el material y el apoyo técnico que me proporcionaron en distintas etapas de este proyecto.

Al Dr. Ignacio López-González, por todas las sugerencias hechas a este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente a Esteban, porque sin tu amistad el posgrado no habría sido tan divertido.

A los investigadores miembros del comité evaluador, por sus valiosos comentarios para mejorar la calidad de este trabajo: Dr. José Luis Puente García, Dra. Liliana Pardo López, Dr. Enrique Salas Vidal y Dr. Arturo Hernández-Cruz.

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

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado una educación de calidad excelente durante los últimos diez años.

A la vida, por colocarme en este camino y darme la oportunidad de dedicarme a la actividad que más me apasiona: la ciencia.

“ The scientist does not study nature because it is useful; he studies it because he delights in it, and he delights in it because it is beautiful. If nature were not beautiful, it would not be worth knowing, and if nature were not worth knowing, life would not be worth living “

Jules Henri Poincaré

Este trabajo se realizó en el laboratorio número catorce del Departamento de Biología de Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México), bajo la asesoría de la Dra. Claudia Treviño Santa Cruz, y con la colaboración de la Dra. Laura Palomares Aguilera del laboratorio diez del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, y de la Dra. Mayel Chirinos Espín del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (Ciudad de México, México). Se recibió financiamiento del NIH (R01HD03808207A1 para A. D.), CONACyT-México (49113 para A. D. y 99333 para C. T.) y DGAPA/UNAM (IN211809 para A. D. e IN204109 para C. T.).

I ÍNDICE

I ÍNDICE	1
II ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	3
III ABREVIATURAS	5
IV RESUMEN	7
1 INTRODUCCIÓN	9
1.1 <i>La hiperactivación</i>	10
1.2 <i>La capacitación</i>	11
1.3 <i>La progesterona</i>	11
1.4 <i>La zona pelúcida</i>	12
1.5 <i>Características de las glicoproteínas de la ZP</i>	13
1.6 <i>La reacción acrosomal</i>	15
2 ANTECEDENTES	19
2.1 <i>Las glicoproteínas recombinantes de la ZP</i>	19
2.2 <i>Los canales de calcio activados por voltaje</i>	20
2.3 <i>La farmacología de los canales Cav</i>	22
2.4 <i>El incremento transitorio de la [Ca²⁺]_i inducido por ZP3</i>	25
2.5 <i>Fluorimetría de mezclado rápido</i>	26
3 HIPÓTESIS	28
4 OBJETIVO GENERAL	28
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6 MATERIALES Y EQUIPO	29
6.1 <i>Reactivos</i>	29
6.2 <i>Biológicos</i>	30
6.3 <i>Equipo</i>	30
7 MÉTODOS	31
7.1 <i>Producción de ZP3hr</i>	31
7.1.1 <i>Infección de células Sf9 en suspensión</i>	31
7.1.2 <i>Purificación de ZP3hr</i>	31

7.1.3	Precipitación de ZP3hr con ácido tricloroacético.....	33
7.1.4	Concentrado, diálisis y cuantificación de ZP3hr.....	33
7.2	Pruebas con espermatozoides.....	34
7.2.1	Ensayos de reacción acrosomal.....	34
7.2.2	Ensayos en el espectrofluorómetro de mezclado rápido.....	35
7.2.3	Análisis estadístico.....	37
8	RESULTADOS	38
8.1	Producción de ZP3hr.....	38
8.1.1	Infecciones de células Sf9.....	38
8.1.2	Purificación de ZP3hr.....	38
8.2	Pruebas con espermatozoides.....	41
8.2.1	Curva dosis-respuesta de ZP3hr.....	41
8.2.2	Ensayos de RA con inhibidores de canales Cav.....	42
8.2.3	Registros de calcio con alta resolución temporal.....	45
9	DISCUSIÓN	59
10	CONCLUSIONES	65
11	MATERIAL SUPLEMENTARIO	66
11.1	Métodos.....	66
11.1.1	Ensayo en placa.....	66
11.1.2	Ensayo de viabilidad.....	67
11.1.3	Western blot.....	68
11.1.4	Nado hacia arriba y capacitación.....	68
11.2	Resultados.....	70
12	BIBLIOGRAFÍA	73
	APÉNDICE	79

II ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura del espermatozoide de humano.....	9
Figura 2. Estructura del óvulo de humano.....	13
Tabla I. Comparación de las glicoproteínas de la ZP de humano.....	13
Figura 3. Estructura de las glicoproteínas de la ZP de humano.....	15
Figura 4. Secuencia de eventos involucrados en la reacción acrosomal.....	15
Figura 5. Canales iónicos y moléculas involucradas en la RA del espermatozoide de mamífero.....	18
Tabla II. Desarrollo histórico de la clasificación de los canales de calcio activados por voltaje.	21
Figura 6. Estructura bidimensional de los canales Ca_v	22
Tabla III. Inhibidores de los canales Ca_v	35
Figura 7. Estructura del espectrofluorómetro de mezclado rápido.....	36
Figura 8. Identificación de ZP3hr en las fracciones eluidas durante las purificaciones.....	39
Figura 9. Identificación de ZP3hr en el producto final de las purificaciones.....	40
Figura 10. Curva dosis-respuesta de la RA inducida por ZP3hr.....	41
Figura 11. Los inhibidores de canales Ca_v no inducen por sí mismos la RA.....	43
Figura 12. Los bloqueadores de canales Ca_v1 y Ca_v3 inhiben la RA.....	44
Figura 13. Los bloqueadores de canales Ca_v2 no inhiben la RA.....	45
Figura 14. Determinación del volumen mínimo en el espectrofluorómetro de mezclado rápido.....	47
Figura 15. Determinación de la presión mínima en el espectrofluorómetro de mezclado rápido.....	48
Figura 16. Ensayos de viabilidad con distintas presiones.....	49
Figura 17. Ensayos de viabilidad con distintas concentraciones de células.....	50
Figura 18. Comparación de la respuesta de calcio inducida por progesterona utilizando dos sistemas de mezclado.....	52
Figura 19. Dinámica con alta resolución temporal de la respuesta de calcio inducida por progesterona.....	54
Figura 20. La respuesta de calcio inducida por ZP3hr es bifásica y depende de la	

concentración.....	
Figura 21. Picos máximos de fluorescencia obtenidos con ZP3hr.....	56
Figura 22. La respuesta generada por ZP3hr depende del calcio extracelular.....	57
Figura 23. El NiCl ₂ inhibe la respuesta de calcio inducida por ZP3hr.....	58
Figura suplementaria 1. Identificación de las placas que presentan la mayor cantidad de ZP3hr.....	70
Figura suplementaria 2. Ensayo de viabilidad número 1.....	71
Figura suplementaria 3. Ensayo de viabilidad número 2.....	72

III ABREVIATURAS

ACs	Adenilato ciclasa soluble (ing. Soluble adenylyl cyclase).
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario (ing. Complementary desoxyribonucleic acid).
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina (ing. Cyclic adenosine monophosphate).
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero (ing. Messenger RNA).
ATP	Trifosfato de adenosina (ing. Adenosine triphosphate).
BDZ	Benzodiazepina (ing. Benzodiazepine).
BSA	Albúmina sérica bovina (ing. Bovine serum albumin).
Ca²⁺	Calcio (ing. Calcium).
[Ca²⁺]_i	Concentración intracelular de calcio (ing. Intracellular concentration of calcium).
CatSper	Canal catiónico del espermatozoide (ing. Cation channel of sperm).
Ca_v	Canal de calcio activado por voltaje (ing. Voltage-gated calcium channel).
Cl⁻	Cloro (ing. Chloride).
DHP	Dihidropiridina (ing. Dihydropyridine).
EPAC	Proteína intercambiadora directamente activada por AMPc (ing. Exchange protein directly activated by cAMP).
HCO₃⁻	Bicarbonato (ing. Bicarbonate).
HVA	Canal de alto umbral de activación (ing. High voltage-activated channel).
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato (ing. Inositol 1,4,5-trisphosphate).
K⁺	Potasio (ing. Potassium).
kDa	Kilodalton (ing. Kilodalton).
LVA	Canal de bajo umbral de activación (ing. Low voltage-activated channel).
Ni²⁺	Niquel (ing. Nickel).
pH_i	Potencial intracelular de hidrógeno (ing. Intracellular hydrogen potential).
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-difosfato (ing. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate).
PKA	Proteína cinasa A (ing. Protein kinase A).
PLCδ4	Fosfolipasa Cδ4 (ing. Phospholipase Cδ4).
RA	Reacción acrosomal (ing. Acrosome reaction).

Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i> .
SNARE	Proteínas receptoras de unión a NSF soluble (ing. Soluble NSF attachment protein receptors).
SOC	Canal operado por poza (ing. Store operated channel).
STIM	Molécula de interacción con el estroma (ing. Stromal interaction molecule).
TRP	Receptor de potencial transitorio (ing. Transient receptor potential).
ZP	Zona pelúcida (ing. Zona pellucida).
ZP3hr	ZP3 humana recombinante (ing. Recombinant human ZP3).

IV RESUMEN

La fecundación es un evento fundamental para la generación de un nuevo individuo y sucede gracias a la fusión de un óvulo y un espermatozoide. El espermatozoide es una célula especializada cuya cabeza resguarda en la parte anterior al acrosoma, un organelo que contiene las proteasas encargadas de degradar parte de la zona pelúcida (i. e., matriz extracelular, ZP) del óvulo antes de la fecundación. De las cuatro glicoproteínas que conforman a la zona pelúcida del óvulo de humano, ZP3 es la principal encargada de inducir la exocitosis del acrosoma o reacción acrosomal (RA). Debido a que el espermatozoide presenta actividades transcripcional y traduccional muy bajas, su fisiología depende de segundos mensajeros como los iones. Desde hace tiempo se sabe que el Ca^{2+} cumple un papel esencial en procesos como la RA, y varias clases de canales permeables al Ca^{2+} permiten el movimiento de este catión del medio extracelular hacia el citoplasma. El modelo actual de la vía de señalización intracelular de la RA propone que la unión de ZP3 a su(s) receptor(es) en la membrana plasmática del espermatozoide, ocasiona dos ingresos de Ca^{2+} que son indispensables para que ocurra la exocitosis del acrosoma. Particularmente, la farmacología y cinética del primer ingreso de Ca^{2+} sugieren la participación de canales de Ca^{2+} activados por voltaje (Ca_v), sin embargo aún no se ha(n) identificado con certeza la(s) isoforma(s) Ca_v que posiblemente participa(n) en este proceso. Por tal motivo, el objetivo de este proyecto fue confirmar la participación y determinar la identidad de los canales Ca_v involucrados en la RA del espermatozoide de humano. Utilizando baculovirus recombinantes que contienen el gen de ZP3 humana (ZP3h), expresamos en células Sf9 y purificamos exitosamente la glicoproteína ZP3 humana recombinante (ZP3hr). Con la finalidad de determinar el perfil farmacológico de la inducción de la RA por la ZP3hr, inicialmente llevamos a cabo ensayos de RA utilizando inhibidores para las tres distintas subfamilias de canales de calcio activados por voltaje (Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3), en espermatozoides capacitados de humano. Los resultados obtenidos sugieren la participación de miembros de las subfamilias de canales Ca_v1 y Ca_v3 en la RA. En contraste, ningún miembro de la subfamilia de canales Ca_v2 parece participar en este proceso. Debido a la naturaleza transitoria del primer ingreso de Ca^{2+} durante la RA, hasta ahora había sido difícil estudiar su cinética utilizando los métodos convencionales de mezclado de sustancias, ya que es necesario medir este evento con alta resolución temporal. Por lo tanto, para estudiar la primera fase de la RA utilizamos un espectrofluorómetro de mezclado rápido. Después de determinar las condiciones necesarias para realizar pruebas con espermatozoides de humano,

registramos los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ originados por ZP3hr en células capacitadas. Los resultados confirmaron que dicha respuesta está integrada por un componente rápido, seguido de uno lento y sostenido. Finalmente demostramos que la respuesta de Ca^{2+} originada por ZP3hr depende del Ca^{2+} extracelular, y que es sensible al $NiCl_2$ a una concentración a la que se ha reportado que inhibe a los canales $Ca_v3.2$, lo que sugiere la participación de estos canales en la RA.

En conjunto, estos resultados nos ayudan a comprender con mayor profundidad el modelo de la RA en espermatozoides de humano, y sientan las bases para desarrollar futuros proyectos que nos permitan estudiar con alta resolución temporal la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados de humano, al ser expuestos a distintos inductores fisiológicos de la RA.

1 INTRODUCCIÓN

La fecundación es un evento fundamental para la reproducción sexual y la generación de un nuevo individuo. Este proceso sucede gracias a la comunicación y posterior fusión de dos gametos maduros: el óvulo y el espermatozoide.

Debido a que el espermatozoide es una célula sumamente especializada cuya única función es transferir al óvulo la información genética que contiene su núcleo, presenta una morfología adaptada para cumplir esta tarea. El espermatozoide de humano es una célula con una longitud de ~55 μm y está conformado por dos regiones: la cabeza y el flagelo (**Figura 1**). La cabeza contiene el acrosoma y el núcleo. El acrosoma es un organelo que cubre la parte anterior del núcleo, está delimitado por las membranas acrosomal interna y externa, y contiene las enzimas que le permiten al espermatozoide degradar parte de la matriz extracelular del óvulo para facilitar su ingreso. Por otro lado, a lo largo del flagelo se encuentra el axonema que provee de movimiento al espermatozoide gracias a la hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP) y las mitocondrias se localizan únicamente dentro de la pieza media (parte superior del flagelo) [1].

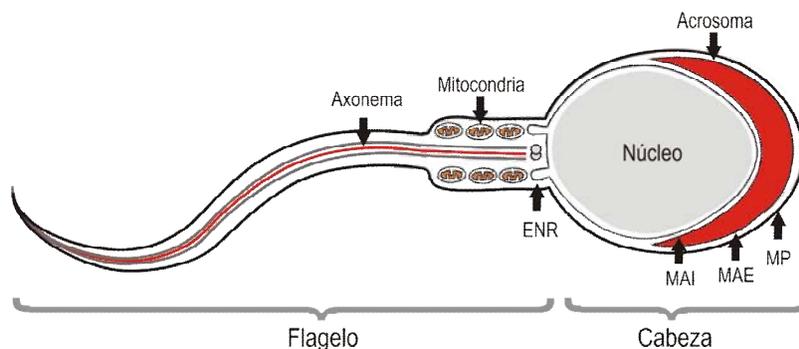


Figura 1. Estructura del espermatozoide de humano. La cabeza y el flagelo del espermatozoide están integrados por varios segmentos. ENR, Envoltura Nuclear Redundante; MAI, Membrana Acrosomal Interna; MAE, Membrana Acrosomal Externa; MP, Membrana Plasmática.

Durante su estancia en el tracto genital femenino y antes de la fecundación, deben llevarse a cabo tres eventos fundamentales en el espermatozoide de mamífero: **a)** la hiperactivación de la movilidad, que implica modificaciones en la simetría y fuerza del batido flagelar; **b)** la capacitación, que involucra a un conjunto de cambios fisiológicos que vuelven competente al espermatozoide para fecundar al óvulo y finalmente; **c)** la reacción acrosomal o proceso exocitótico de liberación de las

proteasas que contiene el acrosoma [2].

A pesar de que se ha detectado la presencia de una gran variedad de ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm's) en el espermatozoide de humano [3], este gameto tiene una actividad transcripcional y traduccional muy baja, por lo que su fisiología depende principalmente de la actividad de las proteínas que generó durante el proceso de diferenciación y, a su vez, la regulación de dichas proteínas frecuentemente se da a través de segundos mensajeros. Resultados acumulados durante años han demostrado que el calcio (Ca^{2+}) cumple un papel esencial en prácticamente todos los procesos intracelulares que ocurren en el espermatozoide después de la eyaculación (e. g., la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosomal), y varias clases de canales y bombas permeables al Ca^{2+} permiten el movimiento de este catión a través de la membrana plasmática o las membranas de reservorios intracelulares de Ca^{2+} en el espermatozoide [4].

Particularmente, se ha demostrado que los canales iónicos son fundamentales para desencadenar en milisegundos cambios eléctricos y de concentración de iones en prácticamente todos los tipos celulares, y su actividad se puede regular por factores como ligandos, nucleótidos cíclicos, presión, cambios en el voltaje o agotamiento del Ca^{2+} de reservorios intracelulares [5].

1.1 La hiperactivación. La movilidad es un requisito fundamental para que los espermatozoides se desplacen a través del tracto genital femenino y finalmente hagan contacto con el óvulo. Al ser depositados en la vagina, los espermatozoides inician su movilidad con un batido flagelar simétrico y de corta amplitud conocido como *movilidad activada* [6]. En contraste, se ha demostrado que en varias especies de mamíferos los espermatozoides aislados de zonas superiores del tracto presentan una *movilidad hiperactivada* [7]. Este tipo de movilidad se caracteriza por un batido flagelar asimétrico y de mayor amplitud. Se piensa que la adquisición de este tipo de nado más vigoroso le permite a los espermatozoides, entre otras cosas, continuar de manera progresiva su trayecto a través del moco cervical (un medio altamente viscoso) y atravesar con mayor facilidad la matriz extracelular del óvulo [8].

Además, distintas evidencias han demostrado que el Ca^{2+} es necesario para el inicio y mantenimiento de la movilidad hiperactivada, ya que regula de manera directa a la maquinaria molecular del axonema [1].

1.2 La capacitación. Los espermatozoides deben permanecer durante cierto tiempo dentro del tracto genital femenino antes de adquirir la capacidad de fecundar al óvulo. De esta forma, el término capacitación comprende a todos los cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos que se llevan a cabo en el espermatozoide durante su estancia dentro del tracto [6]. Este proceso de maduración usualmente se asocia con el surgimiento de la movilidad hiperactivada y las evidencias indican que ambos procesos ocurren de manera paralela [9]. La capacitación involucra una hiperpolarización del potencial de membrana al menos en los espermatozoides de ratón (la especie de mamífero en la que se han hecho los estudios clásicos sobre la fisiología del espermatozoide), así como la remoción de colesterol de la membrana plasmática e incrementos del pH intracelular (pHi) y la concentración intracelular de iones como Ca^{2+} , bicarbonato (HCO_3^-) y cloro (Cl^-) [1]. Este proceso también comprende la activación de una vía de señalización que involucra segundos mensajeros como el monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), el cual a su vez se asocia con la fosforilación de diversas proteínas por la acción de la proteína cinasa A (PKA) [1].

La capacitación de los espermatozoides de humano se puede llevar a cabo *in vitro* al incubarlos en un medio definido que contenga las concentraciones apropiadas de tres elementos principales: Ca^{2+} , HCO_3^- y albúmina sérica bovina (BSA) [6].

1.3 La progesterona. Los óvulos de humano se encuentran rodeados por una densa capa de células llamada *cumulus oophorus*, y una de las sustancias secretadas por las células de esta estructura es la progesterona. En años recientes se demostró que gracias a la viscosidad de las células del *cumulus*, esta hormona esteroidea forma y mantiene un gradiente que se distribuye desde el centro de la estructura celular hacia la periferia [10]. El gradiente de progesterona es capaz de atraer *in vitro* y mediante quimiotaxis a los espermatozoides capacitados de humano a partir de concentraciones tan bajas como 10-100 pM, por lo que este evento parece contribuir a dirigir a los espermatozoides en el último tramo de su trayecto hacia el óvulo. Además se sabe que la progesterona es capaz de estimular, entre otros eventos fisiológicos, la reacción acrosomal (RA) en los espermatozoides capacitados de humano. Por este motivo y por la carencia de ZP nativa, la progesterona se ha utilizado en diversos estudios como herramienta para estudiar los eventos moleculares involucrados en la RA.

1.4 La zona pelúcida. Al finalizar su trayecto a través del tracto genital femenino y después de atravesar el *cumulus oophorus*, el espermatozoide hace contacto con la ZP (**Figura 2**). Esta matriz desempeña un papel crucial durante y después del proceso de fecundación, ya que actúa como sustrato especie-específico para la unión del espermatozoide, es el agonista de la RA, evita la polispermia y protege al cigoto hasta que éste se implanta en la superficie del útero. La ZP es una matriz fibrosa y porosa que se sintetiza y secreta por el óvulo durante el desarrollo folicular. Gracias al uso de anticuerpos monoclonales específicos, se ha demostrado que la ZP de los óvulos de ratón está integrada por filamentos interconectados de 2-3 μm de longitud, cada uno con repeticiones estructurales de 14-15 nm. Esto significa que la ZP de ratón está conformada por filamentos de heterodímeros de las glicoproteínas ZP2 y ZP3, conectados mediante homodímeros de la glicoproteína ZP1 [11].

A diferencia de los óvulos de ratón en donde la ZP está integrada sólo por tres glicoproteínas (i. e., ZP1, ZP2 y ZP3), en los óvulos de otras especies como la humana, la ZP está formada por cuatro glicoproteínas: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 [12]. Las funciones propuestas para cada glicoproteína provienen principalmente de estudios en óvulos de ratón. De acuerdo con estos resultados, la ZP1 contribuye a mantener la integridad estructural de la ZP, actuando como la unión molecular entre los filamentos que conforman a la matriz extracelular [13], la ZP3 actúa como ligando para el/los receptor(es) de los espermatozoides con acrosoma intacto e induce la RA [14] y la ZP2 es el receptor responsable de la unión a los espermatozoides que han perdido el acrosoma [15]. Cada glicoproteína está formada por un polipéptido que se encuentra glicosilado de forma heterogénea con oligosacáridos unidos a Serina/Treonina (glicosilación tipo O) o a Asparagina (glicosilación tipo N), y hay evidencias que demuestran que las glicosilaciones al menos en ZP2 y ZP3, son indispensables para establecer la unión especie-específica con el espermatozoide [16]. Ensayos realizados recientemente utilizando ZP1 y ZP4 recombinantes, así como ZP4 nativa de óvulos de humano, indican que estas proteínas son capaces de inducir la RA probablemente a través de una vía de señalización independiente a la de ZP3, al menos en el caso de ZP4 [17-20].

A pesar de que los estudios clásicos de la RA sugieren que este proceso se inicia por la acción de una (ZP3 en el ratón) o dos glicoproteínas (ZP3 y ZP4 en el humano), también existen estudios que resaltan la importancia de la estructura tridimensional de la ZP durante este proceso. Utilizando espermatozoides de ratón, dichos estudios sugieren que el contacto inicial del espermatozoide con la ZP desencadena señales mecanosensoriales que son suficientes para iniciar

la RA [21]. En este modelo no se considera a la ZP3 como el inductor de la RA, por lo que es necesario profundizar en el mecanismo de acción de ambos modelos de inducción.

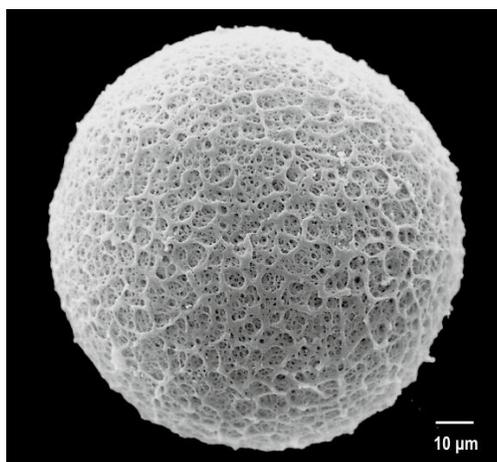


Figura 2. Estructura del óvulo de humano. Micrografía electrónica de barrido (SEM) que muestra la ultraestructura de la ZP de un óvulo de humano. La ZP es una extensa red fibrosa que contiene numerosos poros de tamaños variables. Dichos poros son más grandes en la superficie de la matriz, que en las capas internas. Cortesía del Dr. Hans Michelmann.

1.5 Características de las glicoproteínas de la ZP. Las características de las glicoproteínas de la ZP de humano y los genes que las codifican, se presentan en la siguiente tabla:

Tabla I. Comparación de las glicoproteínas de la ZP de humano.

Gen [*]	Exones [*]	Proteína codificada [*]	Longitud (aa) [*]	Peso Molecular (kDa) ^{**}	Glicosilaciones ligadas a N (% de la masa molecular total) ^{**}	Glicosilaciones ligadas a O (% de la masa molecular total) ^{**}
Zp1	12	ZP1	638	-	-	-
Zp2	19	ZP2	745	~120	~37	~8
Zp3	8	ZP3	424	~58	~27	~9
Zp4	12	ZP4	540	~65	~18	No hay

* Gupta *et al.*, 2007; ** Chiu *et al.*, 2008; - Información no disponible. N; glicosilaciones unidas a Asparagina. O; glicosilaciones unidas a Serina o Treonina.

Los análisis de las glicoproteínas mediante electroforesis de dos dimensiones han demostrado que cada familia de glicoproteínas de la ZP está integrada por múltiples isómeros, lo que se debe principalmente a las variaciones en las glicosilaciones unidas a N (Asparagina) y a O (Serina/Treonina).

Los polipéptidos de las glicoproteínas de la ZP tienen características comunes (**Figura 3**) [11]. Las cuatro ZP's presentan los siguientes dominios:

- ◆ El **péptido señal** (longitud: 21-38 aa) en el extremo amino. Este dominio se encarga de dirigir las proteínas ZP a la vía secretora y se encuentra ausente en las proteínas maduras, sin embargo se desconoce en qué etapa del ensamblaje de la ZP se escinde el péptido señal [23].

- ◆ El **dominio ZP** (longitud: ~260 aa) con ocho residuos de cisteína conservados. En eucariontes este dominio se ha encontrado en un gran número de proteínas extracelulares involucradas en la formación de filamentos o matrices, por lo que se ha propuesto que es el responsable de la polimerización de las glicoproteínas de la ZP en filamentos [24]. Se sabe que el dominio ZP es una estructura formada por los subdominios amino y carboxilo (ZP-N y ZP-C, respectivamente) unidos por una región sensible a proteasas. Al analizar las secuencias de las cuatro proteínas de la ZP humana se descubrió que, con excepción de ZP3, las proteínas ZP1, ZP2 y ZP4 contienen (río arriba del dominio ZP) secuencias originadas a partir de copias divergentes del subdominio ZP-N [25]. Se ha demostrado que ZP-N es suficiente para que se lleve a cabo la polimerización de la ZP [26] y se sugiere que ZP-C podría actuar como regulador de este ensamblaje. Recientemente, se obtuvo la estructura cristalográfica de alta resolución (2.3 Å) del subdominio ZP-N de la ZP3 de ratón, gracias a la cual se concluyó que el plegamiento de esta región es el responsable de iniciar y dirigir la polimerización de los dímeros de ZP2 y ZP3 que forman los filamentos interconectados por ZP1 [27].

- ◆ El **sitio consenso de corte proteolítico**, localizado río arriba del dominio transmembranal e involucrado en la secreción y ensamblaje de las glicoproteínas ZP maduras.

- ◆ El **dominio transmembranal**, un dominio hidrofóbico de ~20 aa gracias al cual las glicoproteínas de la ZP se mantienen ancladas a la membrana del óvulo.

Además, ZP1 y ZP4 también presentan un **dominio de plegamiento o dominio P** (longitud: ~42 aa), cuya función parece estar relacionada con la resistencia a la degradación proteolítica.

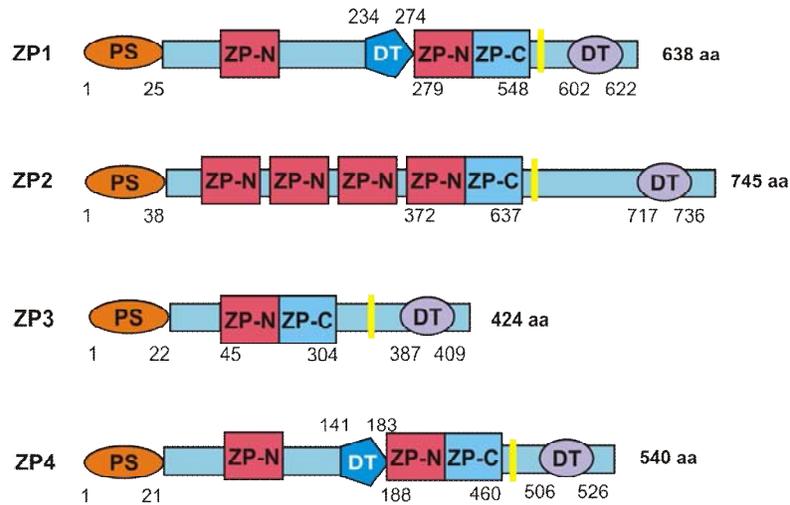


Figura 3. Estructura de las glicoproteínas de la ZP de humano. Se muestran los aminoácidos que delimitan a los principales dominios de las glicoproteínas. Código de colores: el péptido señal (PS) es naranja, el dominio de plegamiento (DP) es azul oscuro, el dominio ZP extremo amino (ZP-N) es rojo, el dominio ZP extremo carboxilo (ZP-C) es azul claro, el sitio consenso de corte proteolítico es amarillo y el dominio transmembranal (DT) es morado. Las estructuras no se muestran a escala. Modificado de Gupta *et al.*, 2007.

1.6 La reacción acrosomal. Este proceso es una forma de exocitosis celular que se caracteriza por la formación de múltiples puntos de fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, en la región anterior de la cabeza del espermatozoide (**Figura 4**) [6]. Únicamente el espermatozoide que se ha unido a la ZP y ha llevado a cabo la RA, puede penetrar la ZP y fusionarse con la membrana plasmática del óvulo. La vía de señalización intracelular que culmina en la RA aún no se comprende por completo; sin embargo, los resultados de varias investigaciones indican que la participación del Ca^{2+} es fundamental en este proceso.

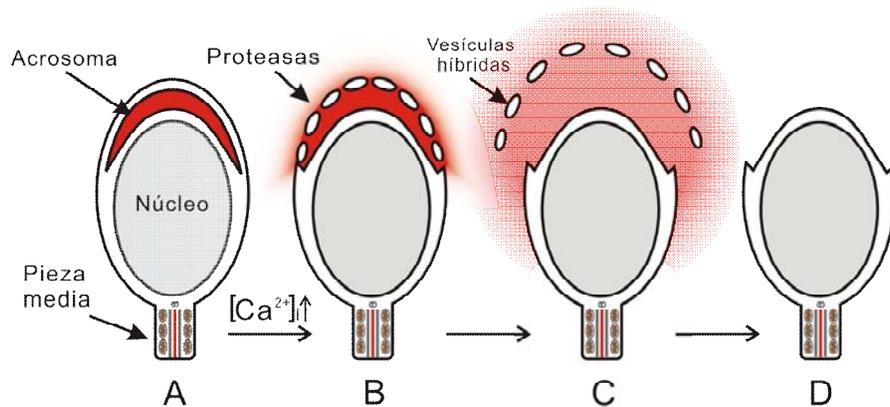


Figura 4. Secuencia de eventos involucrados en la reacción acrosomal. **A)** La unión de la ZP3 a su(s) receptor(es) en la membrana plasmática del espermatozoide, desencadena una vía de señalización intracelular dependiente de Ca^{2+} ; **B)** y **C)** La vía de señalización culmina con la fusión de las membranas acrosomales externa e interna, lo que ocasiona la formación de vesículas híbridas y la liberación de proteasas; **D)** El espermatozoide sin acrosoma está listo para fusionarse con la membrana plasmática del óvulo.

El modelo actual de la RA inducida por ZP3 (**Figura 5**) propone que la unión de esta glicoproteína a su(s) receptor(es) (e. g., β 1,4-galactosiltransferasa 1) en los espermatozoides de ratón ocasiona la activación de proteínas heterotriméricas G_{i1} y G_{i2} . Esta activación y la alcalinización que normalmente ocurre durante la RA se suprime al utilizar toxina pertusis (PTX), un antagonista específico de las proteínas G heterotriméricas de la clase G_i que además inhibe por completo la RA inducida por ZP3 [28]. Al tratar a los espermatozoides con una base débil permeable, la alcalinización transitoria y el ingreso de Ca^{2+} durante la RA inducida por ZP3 ocurren de manera normal en presencia de PTX, lo que sugiere que el incremento del pH_i mediado por un intercambiador sodio protón (Na^+/H^+) es la etapa que se bloquea durante la RA por la inhibición de las proteínas G [29]. En contraste, se ha demostrado que la PTX no es capaz de inhibir la RA inducida por ZP4 recombinante o nativa, lo que sugiere que esta vía de señalización es independiente de las proteínas G [17, 19].

Durante la RA, posteriormente ocurre una respuesta bifásica de Ca^{2+} que involucra al menos tres tipos de canales permeables a este catión, dos de los cuales se ubican en la membrana plasmática del espermatozoide. En el espermatozoide de ratón la despolarización inicial ocasionada por ZP3 provoca un incremento rápido y transitorio de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$), que alcanza su cúspide ($\sim 10 \mu M$) a los 50 ms y vuelve a su estado basal en 200 ms [30]. La farmacología y cinética de este ingreso son consistentes con la apertura de canales de Ca^{2+} activados por voltaje de la subfamilia 3 (Ca_v3); sin embargo, evidencias recientes obtenidas con ratones nulos para estos canales, pero fértiles, cuestionan la participación de los mismos durante la RA [31]. El Ca^{2+} que ingresa durante esta apertura activa a una fosfolipasa $\delta 4$ (PLC $\delta 4$) [32] que provoca un incremento de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) en el citoplasma. A su vez, el IP_3 se une a sus receptores ubicados en la membrana acrosomal externa y libera el Ca^{2+} que contiene este reservorio [33]. Mediante un mecanismo aún no definido por completo que podría involucrar a las moléculas de interacción con el estroma (STIM), esta liberación del Ca^{2+} acrosomal ocasiona un segundo aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la apertura en la membrana plasmática de canales operados por pozas (SOC's) [34]. Este segundo incremento de Ca^{2+} durante la RA se caracteriza por ser lento y sostenido, su duración puede ser de varios segundos e incluso minutos y los canales involucrados podrían pertenecer a la familia de canales de Ca^{2+} conocidos como receptores de potencial transitorio (TRP's); específicamente, los canales TRPC2 se han involucrado en la RA del espermatozoide de ratón [35], aunque TRPC1 y TRPC5 también se encuentran en la región acrosomal, por lo que no se

puede descartar su posible participación en este proceso [36]. Tampoco se puede descartar la posible participación de alguna(s) de las proteínas Orai1-3, ya que también funcionan como SOC's por sí mismas o en presencia de STIM y TRP's. Se ha demostrado que al menos STIM1 se encuentra en la pieza media de los espermatozoides de humano [5], mientras que STIM1 y Orai2 se encuentran en la membrana plasmática de los espermatozoides de ratón (*datos no publicados*).

La incubación en presencia de Ca^{2+} de espermatozoides de humano previamente permeabilizados con estreptolisina O, asemeja la apertura de los canales SOC's durante la RA, por lo que de esta manera se pueden analizar los eventos tardíos involucrados en este proceso. Utilizando esta metodología se han obtenido evidencias que sugieren la existencia de una segunda liberación de Ca^{2+} acrosomal, que es posterior a la apertura de los SOC's [37]. Se ha propuesto que después de la apertura de estos canales, el incremento de Ca^{2+} activa a una adenilato ciclasa soluble (ACs) que promueve la producción de AMPc. Este nucleótido que señala a través de un mecanismo dependiente de EPAC, activa directamente a la proteína G monomérica Rap1 e indirectamente a Rab3A. Por un lado, Rap1 estimula la síntesis de IP_3 a través de la actividad de una $\text{PLC}\epsilon$, y a su vez el IP_3 promueve la salida de Ca^{2+} de una poza interna (posiblemente el acrosoma). Finalmente, Rab3A promueve la unión en distintos puntos de las membranas acrosomal externa y plasmática, mediante el ensamblaje de las proteínas de fusión (i.e., SNAP-25, Sintaxina y Sinaptobrevina).

2 ANTECEDENTES

2.1 Las glicoproteínas recombinantes de la ZP. Hasta ahora la actividad de cada una de las cuatro glicoproteínas que conforman a la ZP humana no se ha logrado caracterizar debido a consideraciones éticas que imposibilitan el obtener una gran cantidad de óvulos para cumplir este fin. Por esta razón, desde hace tiempo algunos grupos de investigación han comenzado a producir glicoproteínas recombinantes de la ZP del óvulo de humano. Particularmente los esfuerzos se han enfocado en clonar y expresar la ZP3hr. Inicialmente se demostró que el polipéptido (no glicosilado) de ZP3hr expresado en *Escherichia coli* era capaz de inducir la RA en espermatozoides de humano [38, 39], sin embargo los niveles de inducción fueron variables en ambos casos. Con respecto a los sistemas de expresión en células eucariontes, la ZP3hr expresada en células de ovario de hámster chino [40] demostró poder inducir la RA en espermatozoides de humano [41, 42] e incluso promover la fusión de estos gametos con ovocitos de hámster libres de ZP [43]. Por otro lado, la ZP3hr expresada en células de teratocarcinoma de ovario humano (PA-1) también fue capaz de inducir la RA [44]; sin embargo, la utilidad de cada sistema de expresión se debe de investigar con mayor profundidad ya que, por ejemplo, la expresión de ZP3hr en la línea celular 293T no tiene ningún efecto en la RA [45].

En los últimos años la importancia de producir ZP's glicosiladas de manera correcta ha impulsado a otros grupos a utilizar sistemas de expresión más eficientes. Utilizando el sistema de expresión de baculovirus y células *Sf21*, un grupo obtuvo ZP2hr, ZP3hr y ZP4hr con glicosilaciones unidas a N y O. Además demostraron que de las tres, ZP3hr y ZP4hr inducen de manera significativa la RA [17].

Un grupo de investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) también empleó el sistema de expresión en baculovirus, pero con células *Sf9* de insecto, para expresar las glicoproteínas ZP2hr, ZP3hr y ZP4hr [18]. Se determinó que las tres presentan una masa molecular e inmunoreactividad muy parecida a la de las ZP's nativas. Al igual que en el estudio citado previamente [17], en este caso solamente ZP3hr y ZP4hr pueden inducir la RA en espermatozoides de humano, siendo los valores netos de RA más altos (~10%) los correspondientes a ZP3hr. Estas tres glicoproteínas recombinantes se sometieron a un análisis de afinidad a distintas lectinas (i. e., Con A, DBA, RCA120, PNA, WGA, UEA-I, SBA, AAA y jacalina) y se determinó que poseen carbohidratos similares a los de las glicoproteínas nativas, si bien los

patrones de glicosilación no son idénticos [46]. Este hecho es muy importante, debido a que hay evidencias que sugieren que los residuos de carbohidratos presentes en ZP3 cumplen un papel importante al menos en la unión al espermatozoide en especies como la humana [47]. Con la finalidad de estudiar la participación de los carbohidratos de las glicoproteínas ZP2hr, ZP3hr y ZP4hr en la RA, las proteínas se trataron con las enzimas N-glicosidasa F, O-glicosidasa y neuraminidasa para eliminar las glicosilaciones y posteriormente se llevaron a cabo ensayos de RA. Los resultados obtenidos indican que las glicosilaciones de ZP3hr son indispensables para inducir la RA en espermatozoides capacitados, mientras que las glicosilaciones de ZP4hr no se requieren para inducir este proceso [46]. Estos resultados son consistentes con estudios previos que sugieren que las vías de señalización inducidas por ZP3 y ZP4 durante la RA, son distintas [19].

Gracias a una colaboración con el grupo del INCMNSZ, decidimos producir la ZP3hr en nuestro laboratorio para cumplir los objetivos planteados en este proyecto.

2.2 Los canales de calcio activados por voltaje. Desde su descubrimiento, los canales Ca_v se han clasificado de acuerdo con diferentes criterios [48]. La primera clasificación se basó en propiedades farmacológicas y electrofisiológicas, por lo que los canales de Ca^{2+} se dividieron en activados por bajo (**LVA**) o alto (**HVA**) voltaje. Los canales **LVA** se activan a voltajes ≥ -70 mV y debido a la corta amplitud de su conductancia y su rápido decaimiento, estos canales también se conocen como canales de Ca^{2+} tipo **T** (i. e., **T**ransitorio). Por otro lado, los canales **HVA** tienen un umbral de activación ≥ -20 mV y por la gran amplitud de su conductancia y la cinética lenta de decaimiento de su corriente, también reciben el nombre de canales de Ca^{2+} tipo **L** (i. e., **L**arga duración). Experimentos realizados en los años 80's con células neuronales revelaron la existencia de nuevos canales de Ca^{2+} , con conductancias ubicadas entre aquellas de los canales tipo T y L. En un inicio estos canales se nombraron canales de Ca^{2+} tipo **N** (i. e., **n**euronal); sin embargo, más tarde se demostró que estos canales se podían clasificar a su vez en subtipos, de acuerdo con su sensibilidad a toxinas aisladas de caracoles marinos y arañas. Por lo tanto, los canales sensibles a la ω -Conotoxina GVIA conservaron el nombre de canales tipo N, mientras que los sensibles a la ω -Agatoxina IVA se nombraron canales tipo **P/Q** (i. e., células de **P**urkinje, en donde se caracterizaron primero estos canales). Los canales resistentes a ambas toxinas se nombraron canales tipo **R** (i. e., **r**esistentes) [49].

La segunda clasificación de los canales Ca_v está basada en la clonación de los ácidos desoxirribonucleicos complementarios (ADNc) que codifican a cada tipo de canal [50, 51]. Con

respecto a esto, distintas pruebas han revelado que los canales Cav están conformados por las subunidades α_1 , β , $\alpha_2\delta$, y γ . La subunidad α_1 es responsable de las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas básicas en las que se basaron las primeras clasificaciones de canales. Hasta ahora se han identificado diez subunidades α_1 y mientras el número de subunidades conocidas se ha incrementado, ha surgido la necesidad de utilizar una nomenclatura sistemática. Se acordó que las subunidades α_1 individuales se nombrarían de acuerdo con el esquema $Cavx.y$ [52] (**Tabla II**), en donde "Cav" significa canal de Ca^{2+} activado por voltaje, "x" es el número que designa a la subfamilia del canal, y "y" es el número que designa a los miembros individuales de cada subfamilia.

Tabla II. Desarrollo histórico de la clasificación de los canales de calcio activados por voltaje.

Tipo de canal de Ca^{2+}	Tipo de corriente*	Tipo de subunidad α **	Nomenclatura estructural***	Antagonistas
HVA	L	α_{1S}	$Cav1.1$	Dihidropiridinas,
	L	α_{1C}	$Cav1.2$	Benzodiazepinas y
	L	α_{1D}	$Cav1.3$	Fenilalquilaminas
	L	α_{1F}	$Cav1.4$	
	P/Q	α_{1A}	$Cav2.1$	ω -Agatoxina IVA
	N	α_{1B}	$Cav2.2$	ω -Conotoxina GVIA
	R	α_{1E}	$Cav2.3$	SNX-482
LVA	T	α_{1G}	$Cav3.1$	
	T	α_{1H}	$Cav3.2$	Ni^{2+} , Mibefradil, Nifedipina,
	T	α_{1I}	$Cav3.3$	Pimozida

* Tsien *et al.*, 1995; ** Snutch *et al.*, 1990 y Birnbaumer *et al.*, 1994; *** Ertel *et al.*, 2000.

Las subunidades α_1 se localizan en la membrana celular y forman el poro conductor de iones. Son proteínas organizadas en cuatro dominios repetidos (I a IV), cada uno conformado por seis segmentos transmembranales (S1 a S6) y un asa que forma el poro entre los segmentos transmembranales S5 y S6. La región del poro contiene un filtro de selectividad, lo que le confiere al poro del canal una alta selectividad por los iones de Ca^{2+} . Los segmentos S4 contienen de cinco a seis lisinas y argininas cargadas positivamente por lo que tienen una carga neta positiva y pueden actuar como parte del sensor de voltaje, controlando la apertura de los Cav . Además, la secuencia de la subunidad α_1 contiene sitios de interacción con subunidades auxiliares, sitios de unión para varios activadores y bloqueadores, y varios sitios consenso de fosforilación [53].

Las subunidades β , α_2 , δ , y γ son subunidades auxiliares, sin embargo no todas se encuentran necesariamente en cada canal. La subunidad β es una subunidad auxiliar intracelular coexpresada con las subunidades α_1 de todos los canales HVA. La subunidad α_2 tiene varios sitios de glicosilación y secuencias hidrofóbicas, pero estudios de biosíntesis indican que es una proteína extracelular adherida a la membrana mediante un puente disulfuro que la conecta con la subunidad δ . La subunidad δ se codifica por el extremo 3' del mismo gen que codifica a la subunidad α_2 , y las formas maduras de estas dos subunidades se producen mediante procesamiento proteolítico postraduccional y la formación de un puente disulfuro [54]. La subunidad γ es una proteína integral de membrana. Distintos análisis revelaron la existencia de cuatro hélices transmembranales, con extremos amino y carboxilo situados intracelularmente.

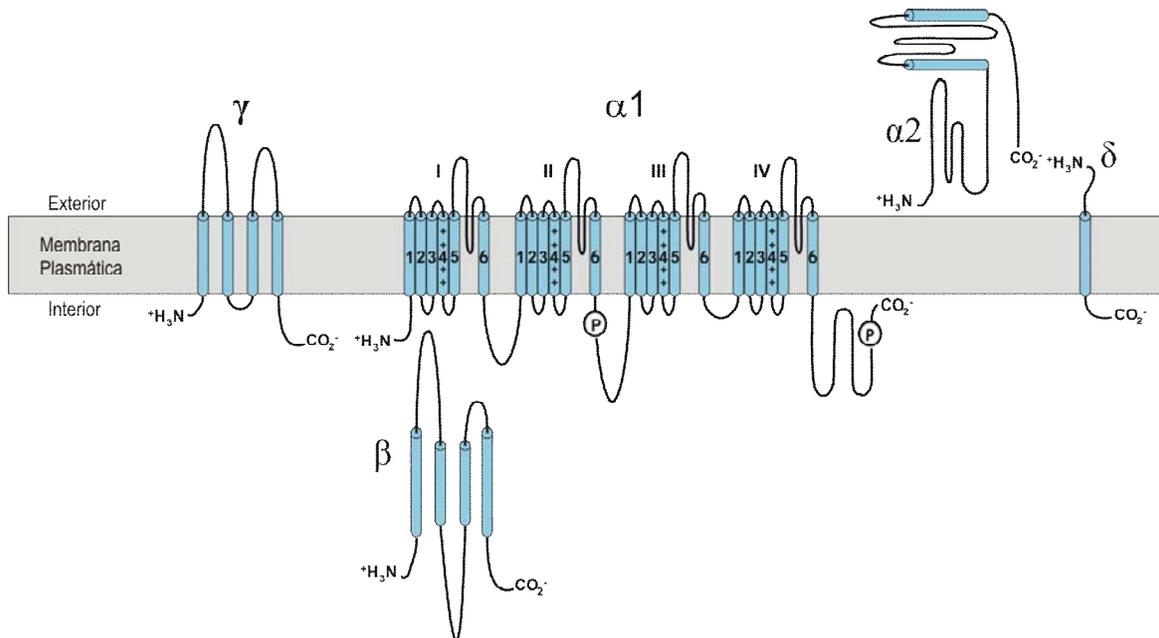


Figura 6. Estructura bidimensional de los canales Ca_v . La subunidad principal α_1 es una proteína transmembranal formada por cuatro dominios, cada uno constituida por seis segmentos transmembranales. Entre los segmentos 5 y 6 se encuentra el poro conductor a través del cual ingresan los iones Ca^{2+} . La subunidad α_1 se encuentra regulada por subunidades auxiliares: la subunidad β intracelular, la subunidad γ transmembranal, y un complejo integrado por la subunidad extracelular α_2 y la subunidad transmembranal δ , las cuales se encuentran unidas por un puente disulfuro. Modificado de Catterall *et al.*, 2005.

2.3 La farmacología de los canales Ca_v . Dos de las clases más importantes de fármacos que bloquean a los canales Ca_v son compuestos orgánicos como las dihidropiridinas (DHP's) y las benzodiacepinas (BDZ's) [55]. Las DHP's constituyen un grupo de compuestos cuya estructura central es la piridina e incluye compuestos como la **nifedipina**, **nimodipina**, nitrendipina, isradipina, amlodipina, felodipina y nocardipina. Las DHP's pueden actuar como activadores o inhibidores, por lo

que se piensa que actúan alostéricamente al cambiar el estado del canal de abierto a cerrado. A pesar de que en un principio se consideró a estos compuestos como bloqueadores específicos para los canales Ca_v1 , ahora se sabe que los canales Ca_v3 también son sensibles a algunos de ellos (e. g., nifedipina). La localización del sitio de unión de las DHP's a la subunidad α_1 del canal Ca_v1 de músculo esquelético, reveló que el sitio receptor comprende dos regiones separadas (i. e., las regiones S5 y S6 de los dominios III y IV) [56]. Los resultados de varios estudios sugieren que el sitio de unión a las DHP's comprende varios micrositos localizados en los dominios III y IV, y distintos agonistas y antagonistas parecen requerir interacciones con distintos residuos de aminoácidos dentro de estos micrositos [57-60]. Debido a que los residuos que comprenden al receptor de DHP's en los canales Ca_v1 no se encuentran conservados en los canales Ca_v3 , se desconoce cuáles son los determinantes estructurales para la acción de las DHP's en este tipo de canales.

El sitio receptor a BDZ's interactúa con agentes clínicos estructuralmente únicos como el **diltiazem** y la tetrandrina, que se utilizan para tratar padecimientos cardiacos como la angina. Originalmente se consideró a las BDZ's como bloqueadores selectivos para los canales Ca_v1 ; sin embargo, actualmente esta afirmación se considera errónea, ya que también son capaces de inhibir a los canales Ca_v3 . Además, es un hecho que sólo los canales Ca_v1 presentan una inhibición dependiente de estado, lo que indica que los mecanismos de bloqueo de los canales Ca_v1 son distintos de aquellos presentes en los demás tipos de canales. Estudios sugieren que el sitio de unión a BDZ's podría estar formado, al menos en parte, por porciones del enlace entre las regiones S5-S6 del dominio III y partes de la región S6 del dominio IV [61, 62].

Los miembros de la subfamilia de canales Ca_v2 son relativamente insensibles a las DHP's, pero se bloquean con gran afinidad por toxinas de arañas y caracoles marinos [63]. El conopéptido bloqueador arquetípico, **ω -conotoxina GVIA**, es un péptido de 27 aminoácidos aislado del caracol marino *Conus geographus* [64]. Este péptido es altamente selectivo para los canales $Ca_v2.2$ de varias especies y tejidos nerviosos, ocasionando un bloqueo virtualmente irreversible a concentraciones nanomolares [65]. *Conus geographus* también produce ω -conotoxinas adicionales (GVIB, GVIC, GVIIA y GVIIIB); sin embargo, su efecto en los canales $Ca_v2.2$ aún no se ha caracterizado por completo.

Una familia de péptidos aislados del veneno de la araña *Agenelopsis aperta*, también es capaz de bloquear canales de Ca^{2+} . Al igual que las conotoxinas, las ω -agatoxinas se encuentran espacialmente restringidas por varios puentes disulfuro pero tienden a ser sustancialmente más grandes y presentan mayor variabilidad en tamaño y estructura. De manera específica, la ω -

agatoxina IVA (48 aminoácidos) se considera hasta ahora como el único bloqueador específico de canales $Ca_v2.1$ [66]. Por otro lado, la toxina **SNX-482** aislada del veneno de la tarántula *Hysteroocrates gigas* es un bloqueador altamente selectivo para los canales $Ca_v2.3$ [67].

Con respecto a la forma de bloqueo de estas toxinas, se reconocen dos mecanismos distintos: el bloqueo del poro y la modificación de apertura. Las toxinas que modifican la apertura previenen la activación de los canales de Ca^{2+} al impedir el movimiento del sensor de voltaje. En esta clase de toxinas se encuentran la ω -agatoxina IVA [68] y el SNX-482 [69]. A pesar de que no se tiene información detallada sobre los requerimientos estructurales en los canales para permitir el bloqueo, hay evidencias de que la ω -agatoxina IVA interactúa con las regiones S3 y S4 del dominio IV en la subunidad α_{1A} [69]. En el caso del SNX-482, el bloqueo depende de la presencia de los dominios III y IV en la subunidad α_{1E} . En contraste, la ω -conotoxina GVIA parece actuar ocluyendo directamente el poro del canal y su sitio de acción parece situarse principalmente en el dominio III.

Los miembros de la subfamilia de canales Ca_v3 son poco sensibles a la mayoría de DHP's y toxinas que bloquean a los canales Ca_v1 y Ca_v2 , respectivamente. Aunque no hay agentes farmacológicos totalmente eficientes para bloquear las corrientes de los canales Ca_v3 , existen compuestos como el **mibefradil** y el Ni^{2+} , los cuales son hasta cierto punto más selectivos para este tipo de canales que para los demás [53, 70]. De hecho, en un estudio en el que se expresaron por separado los tres tipos de canales Ca_v3 en ovocitos de *Xenopus* y en células HEK-293, se obtuvieron las IC_{50} de inhibición por $NiCl_2$ para los tres tipos de canales y se determinó que únicamente la subunidad α_1 del canal $Ca_v3.2$ se bloquea con una baja concentración de este compuesto (13 μM), mientras que las subunidades α_1 de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ se bloquean con concentraciones más altas (250 y 216 μM , respectivamente) [70].

Es importante mencionar que la búsqueda de nuevos inhibidores para los canales Ca_v3 condujo a la identificación de una nueva toxina llamada **kurtoxina** [71]. Inicialmente se determinó que este péptido era altamente selectivo para bloquear a los canales Ca_v3 expresados en ovocitos de *Xenopus*; sin embargo, se descubrió posteriormente que su selectividad no es absoluta ya que en neuronas la kurtoxina inhibe además a los canales Ca_v1 , $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ (aunque con diferente potencia) [72].

Como se mencionó previamente, a pesar de que varios fármacos son capaces de bloquear la actividad de más de una subfamilia de canales Ca_v (e. g., Ca_v1 y Ca_v3), lo hacen con distintas IC_{50} de inhibición, por lo que utilizando la concentración adecuada es posible determinar la identidad de la subfamilia de canales Ca_v que participa en un evento fisiológico determinado.

2.4 El incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ZP3. En algunas especies como el ratón, el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ durante la fase transitoria de la RA se puede inhibir con bloqueadores como las dihidropiridinas (e. g., Nifedipina), las benzodiazepinas (e. g., Diltiazem), las fenilalquilaminas (e. g., Verapamil) y el níquel (Ni^{2+}) [73]. Debido a que varios de estos antagonistas se consideraban específicos para los canales Ca_v1 , inicialmente se pensó que este tipo de canales estaba involucrado en la RA, sin embargo ahora se sabe que a las concentraciones probadas estos bloqueadores también pueden inhibir a los canales Ca_v3 [74]. Dos miembros de esta subfamilia ($Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$) se han inmunolocalizado con anticuerpos específicos en la cabeza de espermatozoides de ratón, por lo que podrían participar en el primer incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ZP3 [75]. A pesar de esto aún es necesario llevar a cabo estudios para comprobar su participación en la RA, ya que ratones nulos para cualquiera de los genes que codifican para estos dos canales, son fértiles [76, 77].

También se han realizado registros de fijación de área de membrana (patch-clamp) en espermatozoides de epidídimo de ratón para determinar qué tipo de canales Ca_v2 son funcionales en esta etapa del desarrollo celular. Los resultados sugieren que los canales $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$ contribuyen a la actividad observada [78], por lo que podrían participar durante la RA. Por otro lado, ensayos de inmunocitoquímica llevados a cabo en el mismo estudio han confirmado la presencia de la subunidad α_1 del canal $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática de espermatozoides de ratón.

En el espermatozoide de humano, la participación de alguno de los canales Ca_v3 durante la RA es aún menos clara ya que a pesar de que las tres isoformas se encuentran en estas células [75], su relevancia funcional se ha estudiado principalmente de manera indirecta y usualmente en poblaciones de espermatozoides. Las adiciones de potasio (K^+) externo en presencia del ionóforo valinomicina, despolarizan a los espermatozoides de humano e inducen un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ que se ha detectado con fluoróforos sensibles a Ca^{2+} . Dichos incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ son insensibles a la Nifedipina y al Verapamil, pero se bloquean por Ni^{2+} . Una posibilidad es que estos canales sean $Ca_v1.2$ y/o $Ca_v2.3$, ya que se han inmunolocalizado en la pieza media y el segmento ecuatorial de espermatozoides de humano, respectivamente [75].

Por otro lado, varios grupos de investigación han demostrado que la RA inducida por neoglicoproteínas utilizadas como análogos de ZP (e. g., albúmina sérica bovina manosilada), se inhibe por concentraciones micromolares de fármacos que se sabe que afectan la actividad de los canales Ca_v3 , como el Mibefradil, el Ni^{2+} y la Nifedipina [79, 80]. Además, previamente realicé

ensayos de RA en espermatozoides de humano utilizando distintos inhibidores de los canales Ca_v3 y ZP3hr como inductor, los cuales sugieren que en la RA de los espermatozoides de humano posiblemente participa el canal $Ca_v3.2$ [81].

Es importante resaltar que los espermatozoides también expresan un grupo de canales llamados CatSper. Las seis proteínas CatSper reportadas hasta ahora (CatSper1-4, CatSper β y CatSperG) integran canales selectivos para el Ca^{2+} cuyo mecanismo de activación es la alcalinización del medio intracelular [40, 82]. La presencia de estos canales se encuentra restringida a los espermatozoides de varias especies (e. g., ratón y humano) y, de manera específica, sólo se localizan en la pieza media de estas células. En consistencia con su localización, se ha demostrado que el funcionamiento de estos canales es fundamental al menos durante el proceso de hiperactivación. Se ha descubierto que los ratones que carecen del gen *CatSper1* no incrementan su $[Ca^{2+}]_i$ después de aumentar la $[K^+]_e$ en medio alcalino, por lo que se ha propuesto que posiblemente los canales estudiados anteriormente usando despolarizaciones inducidas por K^+ podrían pertenecer a esta familia y no a la de los Ca_v [83]. Recientemente se realizó un estudio en el que se llevaron a cabo tanto registros electrofisiológicos en la configuración de célula completa en células espermatogénicas, como registros de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de ratón, después de exponer las células a ZP solubilizada. En los registros obtenidos no se detectaron corrientes Ca_v , pero sí corrientes que pertenecen a los canales CatSper. Además, aunque los canales Ca_v se encuentran en las células, su participación parece no ser necesaria en los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la ZP. Por otro lado, las imágenes de fluorescencia obtenidas sugieren que el ingreso de Ca^{2+} inducido por la ZP inicia en el flagelo, posiblemente a través de los canales CatSper y no en la cabeza a través de los canales Ca_v3 [84].

También es importante mencionar que los espermatozoides de los ratones que carecen de cualquiera de los canales CatSper son infértiles; sin embargo, al llevar a cabo ensayos de fecundación *in vitro* estos espermatozoides son capaces de fecundar ovocitos sin ZP.

2.5 Fluorometría de mezclado rápido. Un espermatozoide capacitado responde a la ZP del óvulo inmediatamente después de establecerse el contacto físico entre ambos gametos, por lo que es necesario llevar a cabo registros con alta resolución temporal si se pretende determinar el orden secuencial de los eventos tempranos en la vía de señalización intracelular de la RA (e. g., la posible participación de los canales Ca_v en este proceso). Desafortunadamente esto no se puede lograr utilizando un espectrofluorómetro convencional, pues el tiempo que se requiere para llevar a cabo el

mezclado de las células con sus agonistas, ocasiona que se pierda información inicial importante.

Este problema se puede resolver utilizando la técnica de *fluorimetría de mezclado rápido*, gracias a la cual se puede obtener la cinética de una reacción con resolución temporal de milisegundos [85]. Esta estrategia se ha aplicado exitosamente en el estudio de los eventos tempranos ocasionados en poblaciones de espermatozoides de distintas especies de erizo de mar al estar en contacto con los ligandos naturales que regulan su movilidad [86, 87]. Además, recientemente se realizó un estudio en el que se registraron los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ generados en poblaciones de espermatozoides de humano expuestas a distintas moléculas de progesterona enjaulada [88].

Tomando en cuenta estos antecedentes y las ventajas que ofrece la técnica de fluorimetría de mezclado rápido, resulta prometedor utilizarla para investigar los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ de los espermatozoides de humano al exponerlos a la ZP3hr.

3 HIPÓTESIS

Algunas subfamilias de canales de calcio activados por voltaje participan en la reacción acrosomal inducida por ZP3hr en los espermatozoides de humano.

4 OBJETIVO GENERAL

Confirmar la participación y determinar la identidad de los canales de calcio dependientes de voltaje vinculados con la vía de señalización de la reacción acrosomal inducida por ZP3hr en espermatozoides de humano.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Expresar y purificar la glicoproteína ZP3hr, a partir de los baculovirus recombinantes proporcionados por el INCMNSZ.
2. Establecer el perfil farmacológico de la RA inducida por ZP3hr con respecto a los canales Cav.
3. Determinar con alta resolución temporal la cinética del ingreso transitorio de Ca²⁺ durante la RA inducida por ZP3hr en poblaciones de espermatozoides de humano.
4. Determinar farmacológica y cinéticamente, la contribución de distintos canales de Ca²⁺ a los cambios en la concentración intracelular de Ca²⁺ inducidos por ZP3hr.

6 MATERIALES Y EQUIPO

6.1 REACTIVOS

La calciseptina, la nimodipina, la nifedipina, la ω -conotoxina GVIA y la ionomicina se obtuvieron de Alomone labs (Israel, Jerusalén). La acrilamida ($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$), la bis-acrilamida ($(\text{CH}_2\text{CHCONH})_2\text{CH}_2$), el persulfato de amonio (APS; $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), el sodio dodecil sulfato (SDS; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}^+$), el TEMED ($(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), el Tween-20, el Tris y el Azul de Coomassie R-250 se obtuvieron de BIO-RAD (California, Estados Unidos). La ω -agatoxina IVA se obtuvo de Calbiochem (California, Estados Unidos). La agarosa de bajo punto de fusión y el medio SF900II se obtuvieron de GIBCO® (California, Estados Unidos). La mezcla de inhibidores de proteasas (Complete) se adquirió en Roche (Mannheim, Alemania). El Na_2EDTA , el ácido acético (CH_3COOH), el isopropanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$), el metanol (CH_3OH), el ácido tricloroacético (CCl_3COOH) y la D-Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) se obtuvieron de J. T. Baker (New Jersey, Estados Unidos). El etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) se obtuvo de Merck (Dramstadt, Alemania). Las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon™ y las columnas Amicon Ultra-15 M. W. 30 kDa y Amicon Ultra-4 M. W. 10 kDa se obtuvieron de Millipore (Massachussets, Estados Unidos). El kit SuperSignal West Chemiluminiscent Substrate se obtuvo de Pierce Biotechnology (Illinois, Estados Unidos). El ionóforo de Ca^{2+} , A-23187, el cloruro de calcio (CaCl_2), la aglutinina de *Pisum sativum* acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), la albúmina sérica bovina (BSA), el azul de tripan al 0.4%, el diltiazem, el dimetil sulfóxido (DMSO; CH_3SOCH_3), el medio HAM's F-10, el medio Grace, el MTT, el rojo neutro, el rojo ponceau, el SNX-482, el Trisma-base, el β -mercaptoetanol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), la urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), el cloruro de sodio (NaCl), el cloruro de potasio (KCl), el bicarbonato de sodio (NaHCO_3), el HEPES, el cloruro de magnesio (MgCl_2), el cloruro de manganeso (MnCl_2), el lactato de sodio, el piruvato de sodio, el Tritón X-100, el imidazol, el clorhidrato de guanidina ($\text{NH}_2\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$), el glicerol ($\text{HOCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$), la lisozima, la progesterona y la eosina Y se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos). La resina de ácido nitrilotriacético acoplada a Niquel (Ni-NTA) se adquirió de Quiagen. Las membranas con M.W.C.O de 12-14,000 para diálisis se obtuvieron de Spectra/Por® (Texas, Estados Unidos). El Fluo-3 AM y el Fura-2 se obtuvieron de Invitrogen.

6.2 BIOLÓGICOS

Los baculovirus recombinantes con el ADNc de ZP3h y el anticuerpo policlonal de conejo anti-ZP de cerdo, fueron proporcionados por la Dra. Mayel Chirinos (INCMNSZ, Ciudad de México). Las células *Sf9* fueron proporcionadas por la Dra. Laura Palomares y la M. en C. Ana Ruth Pastor (IBT, UNAM, Cuernavaca, Mor.). Las muestras de semen se obtuvieron de donadores sanos con abstinencia sexual de 3 a 5 días. Además se verificó que las muestras, obtenidas por masturbación, cumplieran con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud [89].

6.3 EQUIPO

En los experimentos destinados a registrar la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de humano, se utilizó un espectrofluorómetro de mezclado rápido modelo SX.17MV (Applied Photophysics Ltd., Reino Unido) equipado con una lámpara de Xenón de 150W.

7 MÉTODOS

7.1 PRODUCCIÓN DE ZP3hr

Antes de iniciar la producción de ZP3hr, se llevaron a cabo ensayos en placa y de viabilidad cuyo objetivo fue obtener únicamente virus infecciosos y calcular el título viral, respectivamente (ver **MATERIAL SUPLEMENTARIO/MÉTODOS**).

7.1.1 Infección de células *Sf9* en suspensión

Después de calcular la concentración y viabilidad de un cultivo de células *Sf9* montado previamente, se tomó el volumen necesario para obtener en el cultivo una concentración de 6.3×10^5 células/ml en un volumen final de 200 ml. Al cultivo se le agregó el volumen necesario del stock viral para obtener la multiplicidad de infección (MDI) deseada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen viral} = \frac{\text{MDI (ufp/ml)} \times \text{número de células}}{\text{Título del virus/ml}}$$

El matraz se incubó a 27°C en agitación constante durante 96 horas. Transcurridos los 4 días y sólo cuando se verificó la ausencia de contaminantes en el cultivo, el volumen se colectó en tubos falcon de 50 ml que se centrifugaron a 1,200 r.p.m. durante 10 minutos y a 4°C. Los sobrenadantes del cultivo (ahora pasaje 4) se almacenaron a 4°C y protegidos de la luz, mientras que las pastillas de células se conservaron a -70°C hasta el momento de la purificación de la ZP3hr.

7.1.2 Purificación de ZP3hr

Cada pastilla de células *Sf9* obtenida de las infecciones con baculovirus se diluyó en 9 ml de **amortiguador salino de fosfatos (PBS; Na₂HPO₄ 3.2 mM, KH₂PO₄ 0.5 mM, KCl 1.3 mM, NaCl 135 mM, pH 7.4)** previamente suplementado con una **mezcla de inhibidores de proteasas** (PMSF 1 mM, pepstatina 1 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml, aprotinina 4 µg/ml, benzamidina 50 µg/ml, inhibidor de tripsina 10 µg/ml, yodoacetamida 100 µg/ml y Complete® 10 µg/ml). El volumen se sometió a ciclos

de congelamiento/descongelamiento para disociar parcialmente la membrana plasmática de las células y posteriormente se prepararon alícuotas de la mezcla, las cuales se centrifugaron en frío y a 16,000 xg (14,000 r.p.m. en microcentrifuga eppendorf) durante 30 minutos. Las pastillas se pesaron y se utilizaron únicamente 360 mg para iniciar la purificación. Esta cantidad se resuspendió en 2 ml de **amortiguador de lisis** (Urea 2M, Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, Tritón X-100 2%, pH 8.0) y se mezcló dando 20 golpes con un homogenizador. El volumen se dividió en dos tubos, los cuales se agitaron con vórtex y después se colocaron en hielo durante 1 hora.

Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 11,750 xg (12,000 r.p.m. en microcentrifuga eppendorf) y cada pastilla se resuspendió en 2 ml de **amortiguador de solubilización** (Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, clorhidrato de guanidina 6 M y agregar al uso β -mercaptoetanol 10 mM). Los tubos se colocaron dentro de un horno de hibridación y se dejaron en agitación constante durante 3 horas. Transcurrido el tiempo se centrifugaron durante 30 minutos a 200 xg (1,200 r.p.m. en centrifuga eppendorf), los sobrenadantes se mezclaron con 4 ml de Ni-NTA (previamente lavada con agua y amortiguador de solubilización) y el volumen total se mantuvo en agitación suave a 4°C durante toda la noche.

El sobrenadante o volumen muerto (que ya no contiene ZP3hr) se separó de la resina (ahora unida a la proteína recombinante) centrifugando a 200 xg durante 5 minutos. Posteriormente se lavó la resina 2 veces con 4 ml de amortiguador de solubilización y 3 veces más con 4 ml de **amortiguador de lavado** (Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, urea 6 M, pH 8.0 y agregar al uso β -mercaptoetanol 10 mM). Al finalizar los lavados, la Ni-NTA se resuspendió en 3 ml de amortiguador de lavado + β -mercaptoetanol 1 mM y la ZP3hr se renaturalizó adicionando en intervalos de 10 minutos y con agitación ocasional, volúmenes cada vez mayores de **amortiguador de replegamiento** (Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, glicerol 1%, pH 7.8 y agregar al uso β -mercaptoetanol 1 mM) hasta obtener una concentración final de urea de 0.5 M. El volumen final se centrifugó durante 10 minutos a 200 xg, la resina se resuspendió con 4 ml de amortiguador de replegamiento y se dejó en frío durante toda la noche.

La Ni-NTA se centrifugó nuevamente y se llevaron a cabo 2 lavados más con 4 ml de amortiguador de replegamiento. Finalmente la ZP3hr renaturalizada se eluyó lavando dos veces la resina con 5 ml de **amortiguador de elución** (Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 500 mM, glicerol 0.5%, pH 7.0 y agregar al uso β -mercaptoetanol 1 mM) e incubando a 4°C y en agitación constante durante 30 minutos antes de cada centrifugación. Las dos eluciones se almacenaron a -20°C hasta el momento de verificar la presencia de la ZP3hr.

7.1.3 Precipitación de ZP3hr con ácido tricloroacético

Al finalizar la purificación de ZP3hr, se tomaron 200 µl de cada elución obtenida y se llevaron con agua bidestilada a un volumen final de 750 µl. Posteriormente, se adicionaron 30 µg de lisozima y después 750 µl de ácido tricloroacético (TCA) frío al 25%. Los volúmenes se homogenizaron y se colocaron en hielo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, las mezclas se centrifugaron en frío a 13,800 xg (i. e., 13,000 r.p.m. en microcentrifuga eppendorf) durante 10 minutos, se les retiró cuidadosamente el sobrenadante y a las pastillas se les hicieron tres lavados con etanol frío. Después del último lavado, los tubos con las pastillas se centrifugaron a vacío durante 10 minutos para eliminar los residuos de etanol y las muestras se almacenaron a 4°C hasta el momento de verificar la presencia de ZP3hr mediante un SDS-PAGE.

7.1.4 Concentrado, diálisis y cuantificación de ZP3hr

Las eluciones en las que se detectó la ZP3hr se juntaron y se mantuvieron en hielo. Después el volumen total se centrifugó en frío a 200 xg durante 5 minutos para eliminar los posibles residuos de Ni-NTA. El sobrenadante recuperado se concentró parcialmente utilizando una columna Amicon Ultra-15, hasta obtener un volumen final de ~15 ml. Posteriormente, el concentrado se colocó dentro de una membrana Spectra/Por® (Ver **Materiales y Equipo**) y se dializó en frío utilizando 2 litros de **amortiguador de diálisis** (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, glicerol 0.2% y pH 8.0) durante 24 horas. Al terminar este tiempo, el amortiguador se cambió por uno nuevo con la misma composición y la diálisis continuó durante 24 horas más.

Después de dializar, se determinó la concentración de ZP3hr mediante el método de Bradford y se procedió a concentrar nuevamente el volumen con una columna Amicon Ultra-4. Tomando en cuenta la concentración obtenida de la proteína, se calculó el volumen final para tratar de obtener una concentración mínima de 100 ng/µl. Esta última concentración se verificó utilizando nuevamente el método de Bradford. A partir del volumen final se prepararon alícuotas de 30 µl, las cuales se almacenaron a -20°C hasta el momento de verificar nuevamente la presencia de ZP3hr mediante SDS-PAGE teñido con azul de coomassie y mediante western blot. Sólo cuando se comprobó la presencia de ZP3hr, las alícuotas se utilizaron para elaborar ensayos de RA u obtener registros de la cinética del Ca²⁺ durante la RA en poblaciones de espermatozoides.

7.2 PRUEBAS CON ESPERMATOZOIDES

7.2.1 Ensayos de reacción acrosomal

En cada ensayo de RA se utilizaron espermatozoides obtenidos mediante la técnica de nado hacia arriba, y posteriormente se capacitaron como se indica en **MATERIAL SUPLEMENTARIO/MÉTODOS**. En cada experimento se colocó el volumen necesario de cada inhibidor para canales Cav (**Tabla III**) dentro de un tubo eppendorf. Después se adicionó medio HAM's F-10 suplementado, el volumen con 300,000 células capacitadas y se resuspendió. La prueba se incubó durante 15 minutos dentro de una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂ para permitir el bloqueo de los canales de Ca²⁺ en los espermatozoides y después el volumen se transfirió a un tubo nuevo en el cual se colocó previamente la cantidad necesaria de ZP3hr. La prueba se incubó durante 30 minutos en una cámara húmeda a 37°C y 5% de dióxido de carbono (CO₂), con la finalidad de estimular la RA en las células. Posteriormente se agregaron 100 µl de PBS al tubo y se centrifugó durante 5 minutos a 735 xg (i. e., 3,000 r.p.m. en centrifuga eppendorf). El sobrenadante se descartó y se adicionaron 40 µl de metanol frío. Inmediatamente después la prueba se agitó en un vórtex y se colocó en hielo para permeabilizar las membranas, plasmática y acrosomal externa, de los espermatozoides. El volumen se transfirió a su respectivo pozo sobre un portaobjetos con cubierta de teflón y se dejó secar durante toda la noche.

Posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 10 µl de FITC-PSA (25 µg/ml en PBS) y la placa se colocó en ambiente húmedo dentro de una cámara oscura durante 30 minutos. Después el portaobjetos se introdujo en un frasco oscuro con agua bidestilada fría y se mantuvo en agitación constante durante 15 minutos, cambiando el agua cada 5 minutos para eliminar el exceso de FITC-PSA. El agua se descartó del portaobjetos y la placa se dejó secar sobre una plancha a 37°C y protegida de la luz. Finalmente los espermatozoides se observaron en un microscopio de fluorescencia con un objetivo 100X y se evaluó el estado del acrosoma en por lo menos 200 células elegidas al azar.

Tabla III. Inhibidores de los canales Cav

Canal	Inhibidor (IC ₅₀)	Referencia
Cav1.1	Calciseptina (1 μ M)	[90]
Cav1.2	Diltiazem (10 μ M)	[91]
Cav1.3	Nimodipina (1 μ M)	[92]
Cav1.4		[93]
Cav2.1	ω -Agatoxina IVA (20 nM)	[66]
Cav2.2	ω -Conotoxina GVIA (0.7 nM)	[65]
Cav2.3	SNX-482 (30 nM)	[67]
Cav3.1	Mibefradil (5 μ M)	[94]
Cav3.2	Nifedipina (0.4 μ M)	[95]
Cav3.3	Ni ²⁺ (13-250 μ M)	[70]

7.2.2 Ensayos en el espectrofluorómetro de mezclado rápido.

La **Figura 7** muestra los elementos básicos que conforman a un espectrofluorómetro de mezclado rápido. Al utilizar el dispositivo, el primer paso consiste en colocar las sustancias a mezclar (si se utilizan células, éstas se deben cargar previamente con una sonda fluorescente) dentro de sus respectivas jeringas. La mezcla se lleva a cabo por el desplazamiento de los émbolos de las jeringas, los cuales se mueven por la presión que ejerce sobre ellos un transductor conectado a un tanque con gas nitrógeno. Ambas sustancias se unen en una celda de mezclado (rodeada por una cámara con agua a 37°C) que está acoplada a un monocromador de excitación, conectado a su vez a una lámpara de Xenón. La celda de mezclado también se encuentra conectada a una jeringa de paro, que se encarga de determinar el volumen final de mezcla que se obtiene después de cada disparo. Finalmente, la fluorescencia producto de la respuesta se detecta con un fotomultiplicador de alta resolución temporal que amplifica la señal y la envía hacia un ordenador en donde se pueden observar los cambios en la intensidad de la fluorescencia.

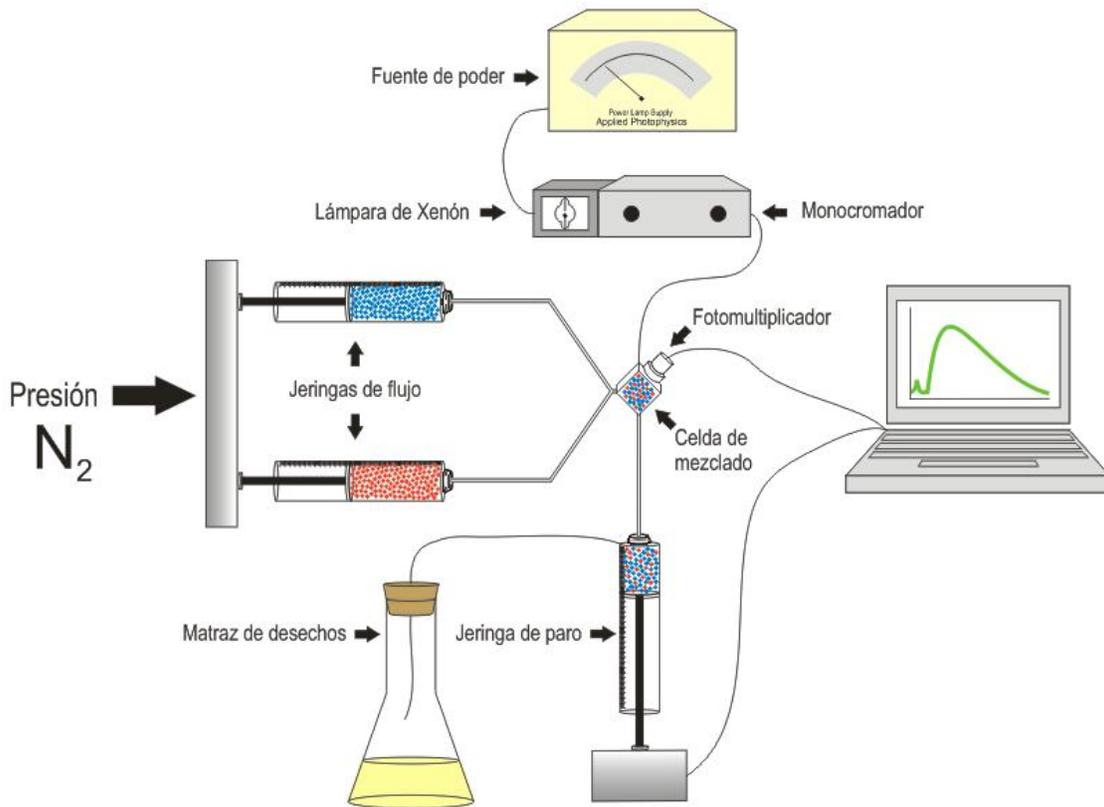


Figura 7. Estructura del espectrofluorómetro de mezclado rápido. La presión inmediata que se ejerce sobre las jeringas, permite que se mezclen rápidamente las sustancias que contienen. Esto favorece la detección temprana y con alta resolución temporal de los cambios en la intensidad de la fluorescencia que ocurren dentro de la celda de mezclado.

En los ensayos en este dispositivo, se utilizaron espermatozoides previamente capacitados como se describe en **MATERIAL SUPLEMENTARIO/MÉTODOS**. Al finalizar la capacitación, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 735 xg y posteriormente se resuspendieron en solo 1 ml de medio Ham's F-10 con 2 μ M de Fluo-3 AM. Las células se incubaron durante 30 minutos y después de transcurrido el tiempo de cargado con la sonda, se centrifugaron nuevamente durante 5 minutos a 735 xg. Finalmente se descartó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en **medio de registro (MR;** en mM, KCl 4, $NaHCO_3$ 15, D-glucosa 5, L-lactato de sodio 10, HEPES 10, NaCl 120, Piruvato de Sodio 1, $MgCl_2$ 1, pH 7.4) teniendo una concentración final de 10×10^6 células/ml.

Al llevar a cabo los registros de Ca^{2+} con **Fura-2** se utilizó siempre una longitud de onda de excitación de 340 nm. En las pruebas con **Fluo-3 AM** se utilizaron longitudes de onda de excitación y emisión de 505 nm y 525 nm, respectivamente.

7.2.3 Análisis estadístico

Se realizaron experimentos independientes utilizando muestras de al menos cinco donadores distintos. El procesamiento de los datos se hizo utilizando el programa KyPlot 2.0 (Qualest, Japan). Las diferencias entre los valores experimentales crudos y los valores controles crudos se analizaron mediante pruebas t-Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando $*P < 0.05$.

8 RESULTADOS

8.1 PRODUCCIÓN DE ZP3hr

8.1.1 Infecciones de células *Sf9*

Inicialmente se llevaron a cabo tres infecciones de células *Sf9*, cada una con un volumen final de 200 ml y concentraciones de 6.3×10^5 ó 7×10^5 células/ml. El volumen a utilizar del concentrado viral pasaje 3 proporcionado por el INCMNSZ se calculó utilizando la fórmula descrita en **MÉTODOS**, con una MDI = 1 y una ufp/ml = 8.9×10^7 (valor que se obtuvo como se indica en la **Figura S2**). Tomando en cuenta estos valores, se determinó que en las dos infecciones con concentración de 6.3×10^5 células/ml se requería un volumen viral de **1.46 ml**, mientras que en la infección con 7×10^5 células/ml se utilizó un volumen de **1.57 ml**. Después de mantener los cultivos en incubación a 27°C y con agitación constante, las células se separaron del medio de cultivo mediante centrifugación y se almacenaron a -70°C hasta el momento de utilizarlas.

8.1.2 Purificación de ZP3hr

Con las pastillas de células *Sf9* obtenidas de las infecciones montadas anteriormente, se llevaron a cabo ciclos de congelamiento y descongelamiento. Al inicio del protocolo de purificación se utilizaron sólo 360 mg de la pastilla de células y el resto del procedimiento se llevó a cabo como se describe en **MÉTODOS**.

Al final de la purificación se hicieron dos eluciones (para recuperar la mayor cantidad posible de ZP3hr) de las cuales se tomaron fracciones mínimas para precipitar con TCA. Después las fracciones se utilizaron para verificar la presencia de ZP3hr mediante un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. En la **Figura 8** se muestra la presencia de la proteína recombinante en las eluciones obtenidas. En todos los casos se observan (con intensidades variables) tres bandas que se conservan desde los volúmenes muertos. Las bandas señaladas con rojo, azul y verde corresponden a proteínas con pesos moleculares promedio de **62 ± 1 , 55 ± 1 y 35 ± 1 kDa**, respectivamente, lo que es consistente con datos reportados previamente [18].

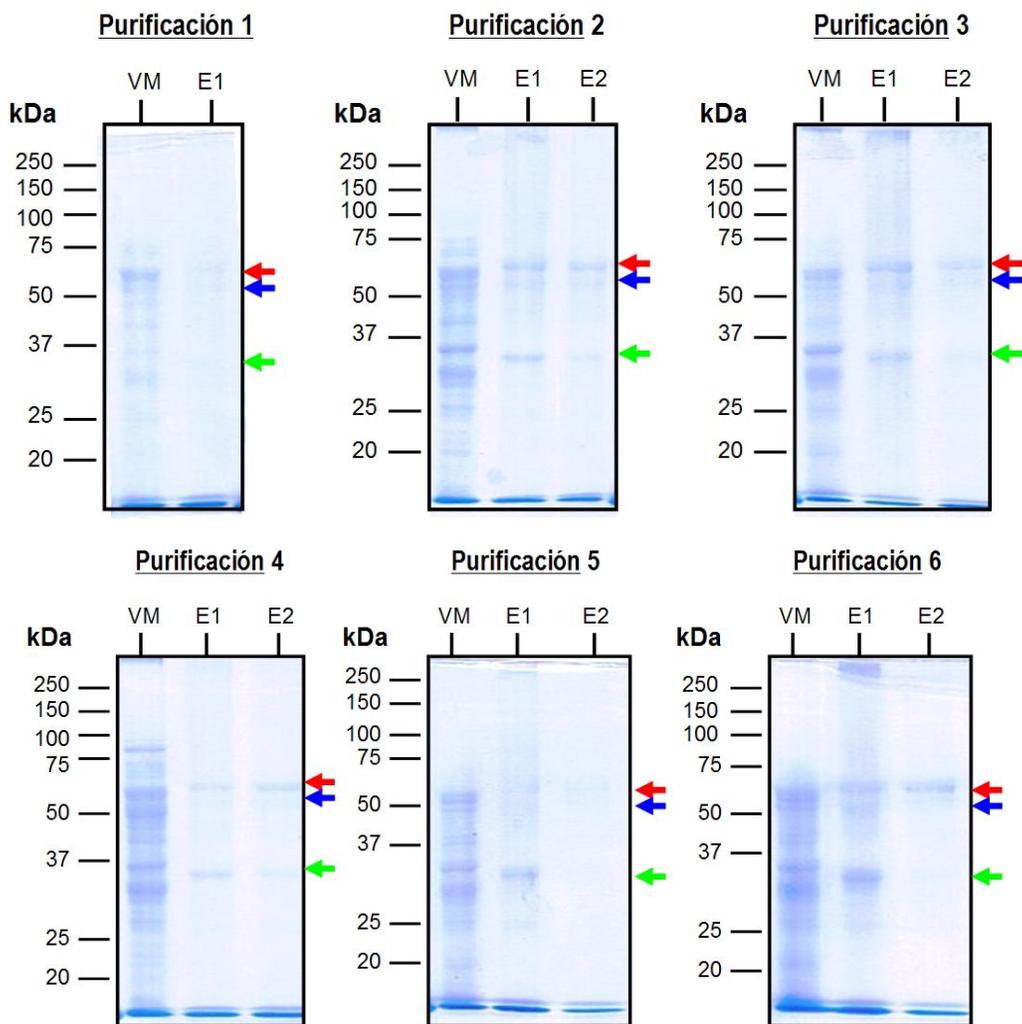


Figura 8. Identificación de ZP3hr en las fracciones eluidas durante las purificaciones. Después de finalizar cada ciclo de purificación, pequeñas fracciones del volumen muerto (VM) y de las eluciones (E1 y E2) se precipitaron con TCA al 25%. Las proteínas de las pastillas obtenidas se separaron posteriormente mediante un SDS-PAGE con poliacrilamida al 10% y finalmente los geles se tiñeron con azul de Coomassie. En las eluciones hay tres bandas que se observan incluso en los volúmenes muertos. Las bandas rojas, azules y verdes corresponden a proteínas con pesos moleculares promedio de 62 ± 1 , 55 ± 1 y 35 ± 1 kDa, respectivamente.

Después de verificar la presencia de la ZP3hr en las 6 purificaciones, se unieron las doce eluciones y se obtuvo un volumen total de ~55 ml. Dicho volumen se centrifugó en frío para descartar los residuos de la Ni-NTA y posteriormente se concentró utilizando una columna con punto de corte de 30 kDa, hasta obtener un volumen final de ~11 ml. Este concentrado se colocó dentro de una membrana con punto de corte de 12-14 kDa, y se dializó en frío durante dos días para eliminar por completo el imidazol. Al finalizar la diálisis se determinó la concentración de proteína recombinante utilizando el método de Bradford. La concentración promedio obtenida a partir de cinco mediciones distintas, y normalizada con respecto al amortiguador de diálisis, fue de 71 ± 0.1 ng/ μ l.

Considerando este valor, el volumen se concentró nuevamente pero utilizando en esta ocasión una columna con punto de corte de 10 kDa. Finalmente se obtuvo un volumen de ~1.5 ml, cuya concentración promedio obtenida a partir de cinco mediciones distintas y utilizando el método de Bradford fue de **783 ± 0.1 ng/μl**.

Con una fracción del concentrado final se procedió a realizar un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie y un western blot (**Figura 9**) mediante los cuales se comprobó nuevamente la presencia de la ZP3hr.

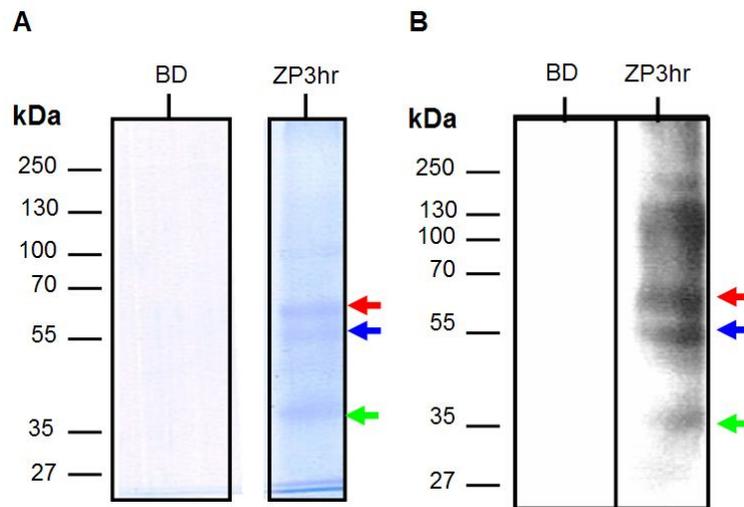


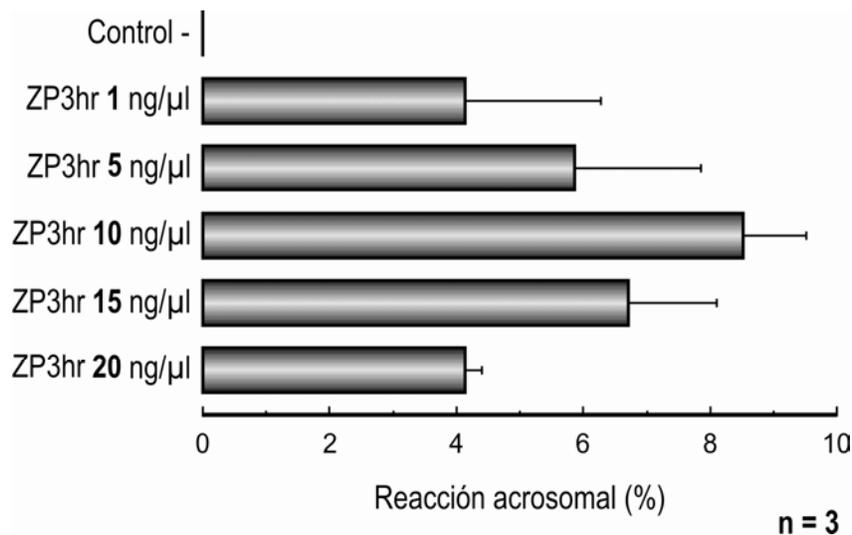
Figura 9. Identificación de ZP3hr en el producto final de las purificaciones. **A)** 5 μg de proteína se separaron mediante un SDS-PAGE con poliacrilamida al 10% y posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie (Derecha) **B)** 2 μg de proteína se separaron en un SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a una membrana PVDF. Después de bloquear la membrana, ésta se incubó con el anticuerpo de conejo anti-ZP de cerdo (1:2,000) y posteriormente con el anticuerpo de cabra anti-conejo acoplado a HRP (1:10,000), cuya señal se detectó al exponer la membrana a una placa fotográfica (Derecha). En **A** y **B** se utilizó amortiguador de diálisis (BD; el tipo de amortiguador en el que se encuentra diluida la ZP3hr) como control negativo y en ambos casos nuevamente se detectaron tres bandas principales (ver **Figura 8**). Las bandas señaladas con rojo, azul y verde presentaron pesos moleculares de 62, 55 y 35 kDa, respectivamente.

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de RA con FITC-PSA para comprobar la funcionalidad de este lote de ZP3hr.

8.2 PRUEBAS CON ESPERMATOZOIDES

8.2.1 Curva dosis-respuesta de ZP3hr

Los ensayos de RA se llevaron a cabo como se describe en el apartado de **MÉTODOS**, y en todos se utilizó el mismo lote de ZP3hr. Inicialmente se determinó la concentración de ZP3hr que genera el mayor porcentaje de RA utilizando cinco concentraciones distintas de la proteína recombinante. Es importante mencionar que todos los valores de RA mostrados en este trabajo corresponden a la diferencia obtenida de sustraer el porcentaje promedio de RA espontánea (RA = 4.5 ± 0.76 , $n = 12$) a los porcentajes promedio crudos de RA obtenidos en cada condición. Por esta razón el valor del control negativo (Control -) siempre es cero. Así mismo, en todos los experimentos se utilizó como control positivo el ionóforo de Ca^{2+} A-23187 (10 μM) [18], con el que se obtuvo un valor promedio de RA = 40 ± 2 ($n = 12$). En la **Figura 10** se muestra la curva dosis-respuesta obtenida con ZP3hr:



Concentración de ZP3hr	1 ng/μl	5 ng/μl	10 ng/μl	15 ng/μl	20 ng/μl
% de RA ± S.E.M.	4.13 ± 2.13	5.86 ± 1.99	8.52 ± 0.98	6.7 ± 1.41	4.13 ± 0.26

Figura 10. Curva dosis-respuesta de la RA inducida por ZP3hr. Ensayos de RA utilizando espermatozoides capacitados de humano incubados en presencia de cinco concentraciones distintas de ZP3hr. El mayor porcentaje de RA se obtuvo utilizando 10 ng/μl de ZP3hr, por lo que esta concentración se utilizó en los experimentos posteriores de RA. Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea y se presentan como promedio ± error estándar del promedio (S.E.M.). $n = 3$.

En la gráfica se observa que la proteína recombinante es capaz de inducir la RA desde 1 ng/μl, sin embargo la máxima actividad se observa al utilizar una concentración de 10 ng/μl, por lo que se utilizó esta concentración en todos los ensayos de RA posteriores.

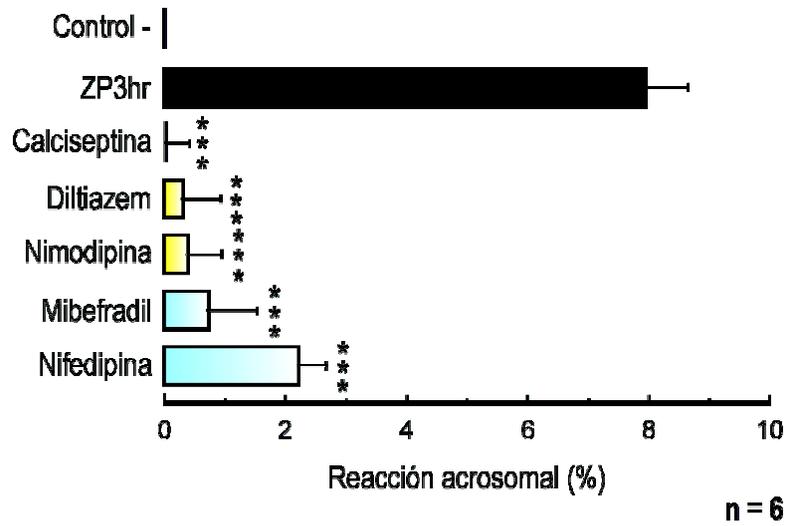
Al igual que en este caso, en ocasiones anteriores se ha observado una disminución en la inducción de la RA al utilizar concentraciones de ZP3hr mayores que 10 ng/μl. Aunque se desconoce el origen de este fenómeno, probablemente se debe a la baja solubilidad de ZP3hr a concentraciones altas y/o a la formación de agregados de la glicoproteína, aunque ninguna de estas hipótesis se ha comprobado hasta ahora.

8.2.2 Ensayos de RA con inhibidores de canales Cav

Una vez establecida la concentración óptima de ZP3hr a utilizar, el siguiente objetivo fue determinar la identidad de las subfamilias de los canales Cav que participan en la RA. En estudios previos utilicé algunos inhibidores de estos canales, por lo que en este trabajo se completó el perfil farmacológico utilizando una batería más amplia de inhibidores. Como primer paso se elaboraron los controles necesarios para comprobar que ninguno de los inhibidores de canales Cav es capaz de inducir la RA *per se* (**Figura 11**). Por lo tanto, se utilizaron bloqueadores de canales **Cav1** (**Calciseptina, Diltiazem, Nimodipina**), **Cav2** (**ω-Agatoxina IVA, ω-Conotoxina GVIA, SNX-482**) y **Cav3** (**Mibefradil, Nifedipina**). Es importante mencionar que algunos de los inhibidores de canales Cav1 también son capaces de inhibir a miembros de la familia de canales Cav3 (y viceversa); sin embargo, en este trabajo se utilizaron las concentraciones reportadas que son relativamente específicas para bloquear a cada familia Cav.

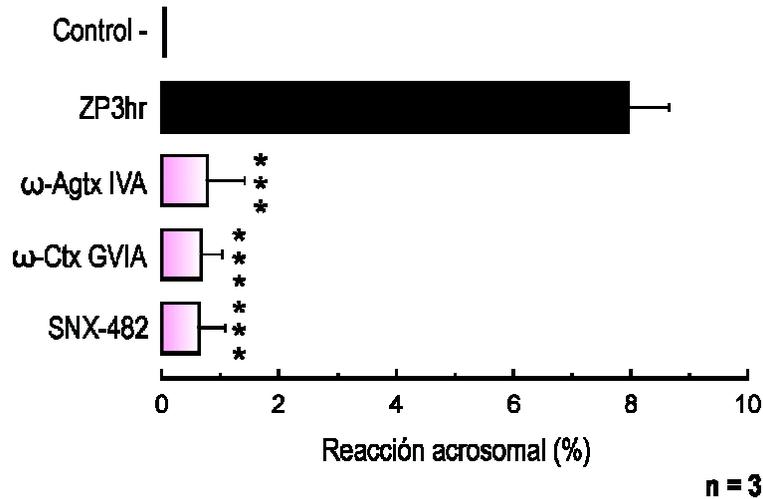
Tanto en estos experimentos como en los subsecuentes la concentración que utilizamos de cada inhibidor fue su IC₅₀ triplicada, por lo que de esta forma nos aseguramos que cada droga bloqueó, en caso de estar presentes, a todos sus canales Cav blancos en los espermatozoides.

A)



Inhibidor (concentración)	Calciseptina (3 μ M)	Diltiazem (30 μ M)	Nimodipina (3 μ M)	Mibefradil (15 μ M)	Nifedipina (1.2 μ M)
% de RA \pm S.E.M.	-3.7 \pm 0.42	0.3 \pm 0.63	0.37 \pm 0.57	0.71 \pm 0.81	2.2 \pm 0.45

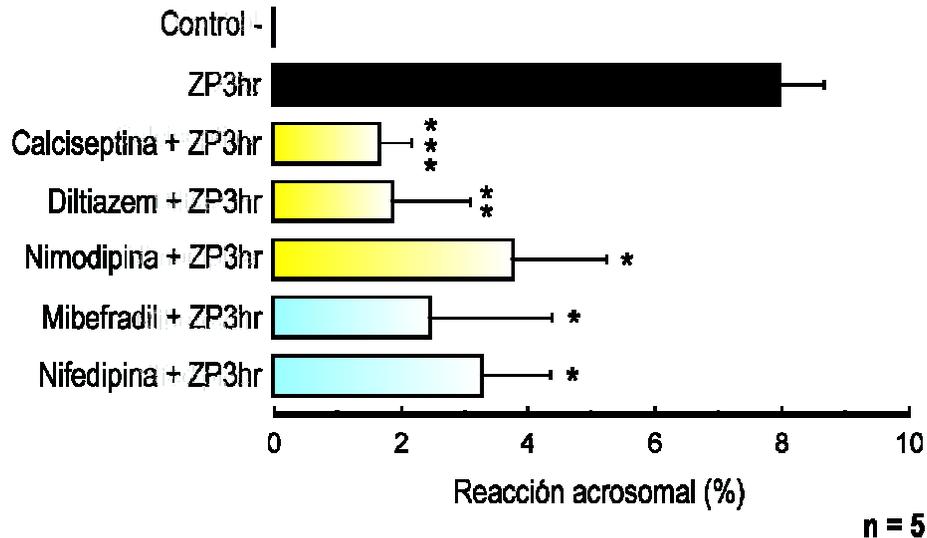
B)



Inhibidor (concentración)	ω-Agatoxina IVA (60 μ M)	ω-Conotoxina GVIA (2.1 nM)	SNX-482 (90 nM)
% de RA \pm S.E.M.	0.76 \pm 0.65	0.65 \pm 0.37	0.63 \pm 0.44

Figura 11. Los inhibidores de canales Cav no inducen por sí mismos la RA. A) Ensayos de RA utilizando espermatozoides capacitados de humano, posteriormente incubados en presencia de Calciseptina, Diltiazem, Nimodipina (inhibidores de canales Cav₁), Mibefradil o Nifedipina (inhibidores de canales Cav₃). n = 6; B) Espermatozoides capacitados incubados en presencia de ω-Agatoxina IVA, ω-Conotoxina GVIA o SNX-482 (inhibidores de canales Cav_{2.1}, Cav_{2.2} y Cav_{2.3}, respectivamente). Ninguno de los compuestos induce la RA *per se*. Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea y se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n = 3. En todas las condiciones *** P < 0.001.

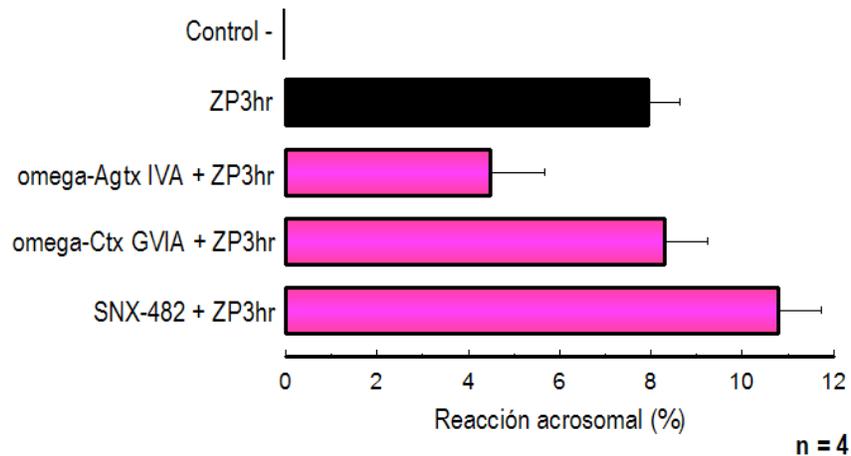
Después de comprobar que ninguno de los inhibidores de canales Ca_v induce por sí mismo la RA, comenzamos los ensayos con ZP3hr utilizando en primera instancia a los inhibidores de canales de la subfamilia Ca_v1 (Calciseptina, Diltiazem, Nimodipina) y Ca_v3 (Mibefradil, Nifedipina). En la **Figura 12** se muestran los resultados obtenidos en cada condición:



Inhibidor (concentración)	Calciseptina (3 μ M)	Diltiazem (30 μ M)	Nimodipina (3 μ M)	Mibefradil (15 μ M)	Nifedipina (1.2 μ M)
% de RA \pm S.E.M.	1.65 \pm 0.52	1.85 \pm 1.24	3.74 \pm 1.49	2.45 \pm 1.92	3.26 \pm 1.1

Figura 12. Los bloqueadores de canales Ca_v1 y Ca_v3 inhiben la RA. Ensayos de RA utilizando espermatozoides capacitados de humano, posteriormente incubados en presencia de Calciseptina, Diltiazem, Nimodipina (inhibidores de canales Ca_v1), Mibefradil o Nifedipina (inhibidores de canales Ca_v3). En todos los casos se indujo la RA con ZP3hr (10 ng/ μ l). Todos los fármacos disminuyeron de manera significativa la RA inducida por ZP3hr. Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea y se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n = 5. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Los valores mostrados en la figura anterior demuestran que la RA inducida por ZP3hr se inhibe en mayor o menor medida por bloqueadores de canales Ca_v1 y Ca_v3 . Para completar el perfil farmacológico continuamos los ensayos de RA utilizando toxinas que inhiben de manera específica a los canales de la subfamilia Ca_v2 . Las toxinas ω -Agatoxina IVA, ω -Conotoxina GVIA y SNX-482, inhiben a los canales $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$, respectivamente. En la gráfica de la **Figura 13** se observa que ninguna de las tres toxinas es capaz de inhibir de forma significativa la RA inducida por ZP3hr. Incluso a pesar de que a simple vista se observa que el valor de RA con ω -Agatoxina IVA tiende a disminuir, el valor no es significativamente distinto con respecto al control con ZP3hr.



Inhibidor (concentración)	ω -Agatoxina IVA (60 nM)	ω -Conotoxina GVIA (2.1 nM)	SNX-482 (90 nM)
% de RA \pm S.E.M.	4.49 \pm 1.17	8.29 \pm 0.93	10.79 \pm 0.93

Figura 13. Los bloqueadores de canales Cav2 no inhiben la RA. Ensayos de RA utilizando espermatozoides capacitados de humano, posteriormente incubados en presencia de ω -Agatoxina IVA, ω -Conotoxina GVIA o SNX-482 (inhibidores de los canales Cav2.1, Cav2.2 y Cav2.3, respectivamente). En todos los casos se indujo la RA con ZP3hr. Ninguna de las tres toxinas disminuyó significativamente la RA inducida por ZP3hr. Los valores están normalizados con respecto a la RA espontánea y se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n = 4.

En conjunto, los resultados obtenidos con los ensayos de RA sugieren la participación de uno o varios miembros de las subfamilias de canales Cav1 y Cav3 en la RA inducida por ZP3hr en espermatozoides capacitados de humano. Por otro lado, ninguno de los canales tipo Cav2 parece estar involucrado en el proceso de exocitosis; sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios posteriores para corroborar estos resultados.

8.2.3 Registros de calcio con alta resolución temporal

Estudios previos han demostrado que en los espermatozoides de ratón el incremento inicial de Ca²⁺ producido por ZP3 tiene una duración de milisegundos y es mediado por canales tipo Cav [30]. Por este motivo, se decidió registrar en poblaciones de espermatozoides capacitados de humano la cinética del ingreso inicial de Ca²⁺ inducido por ZP3hr, y utilizando algunos de los inhibidores con la que elaboramos los ensayos de RA, investigamos las propiedades farmacológicas de esta respuesta.

Para llevar a cabo estos ensayos se utilizó un espectrofluorómetro de mezclado rápido. Debido a la necesidad de optimizar en los experimentos posteriores el uso de los reactivos, la

primera meta establecida fue determinar el volumen mínimo necesario para realizar las pruebas. Sin utilizar células, se llevaron a cabo ensayos de apagamiento mezclando CaCl_2 ($1 \mu\text{M}$) y Fura-2 ($1 \mu\text{M}$) con MnCl_2 (1mM), utilizando trece distintos volúmenes (ver **Figura 14**). Tanto el Ca^{2+} como el Mn^{2+} son afines por el Fura-2, sin embargo esta sonda únicamente fluoresce cuando se encuentra unida al Ca^{2+} , por lo que al llevar a cabo los ensayos de mezclado, el Mn^{2+} (por encontrarse a una concentración un orden de magnitud más alta que el Ca^{2+}) compite por los sitios de unión al Fura-2, lo que ocasiona que la intensidad de la fluorescencia disminuya gradualmente. Los volúmenes utilizados fueron (en μl): 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, 430, 470, 520, 550 y 570. En los experimentos realizados utilizando esta metodología se registró el apagamiento de la fluorescencia durante 100 segundos en todos los casos, y se determinó que el volumen mínimo total que se necesita por disparo para obtener resultados reproducibles, es de $200 \mu\text{l}$ ($100 \mu\text{l}$ por jeringa). Con la finalidad de no trabajar con el volumen límite, a partir de este punto utilizamos un volumen de $240 \mu\text{l}$ ($120 \mu\text{l}$ por jeringa), y este valor se mantuvo fijo en todos los experimentos posteriores.

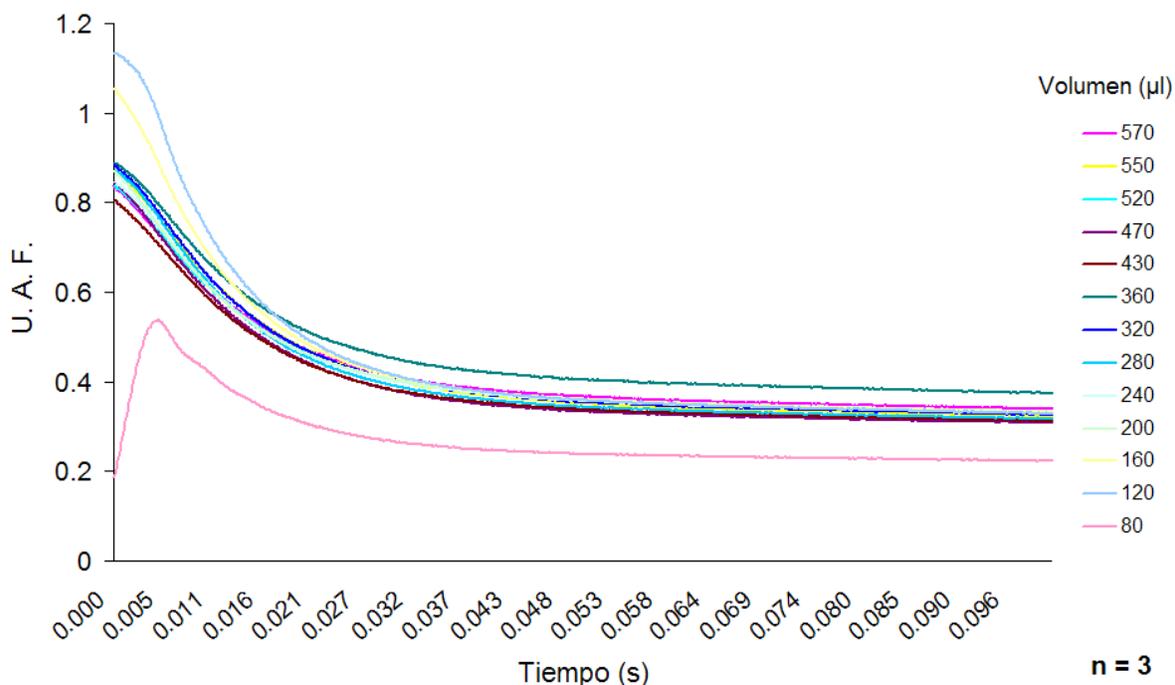


Figura 14. Determinación del volumen mínimo en el espectrofluorómetro de mezclado rápido. Se realizaron pruebas de apagamiento combinando CaCl_2 ($1 \mu\text{M}$) y Fura-2 ($1 \mu\text{M}$) con MnCl_2 (1mM). Se muestran los trazos promedio de las reacciones de apagamiento obtenidas utilizando trece distintos volúmenes. Se determinó que el volumen total de $200 \mu\text{l}$ ($100 \mu\text{l}$ por jeringa) es el mínimo requerido para obtener experimentos reproducibles. U. A. F.; Unidades arbitrarias de fluorescencia. $n = 3$.

Posteriormente decidimos investigar cuál era la presión mínima con la que el mezclado aún se lleva a cabo de forma eficiente en el espectrofluorómetro de mezclado rápido. En este caso también se realizaron pruebas de apagamiento, pero a diferencia de los ensayos anteriores, en esta ocasión se utilizaron distintas presiones. Considerando que cuatro de las presiones más altas (i. e., 22, 24, 26 y 28 p.s.i, libras por pulgada cuadrada; ing. *pounds per square inch*) generan la respuesta cuya forma se repite el mayor número de veces en los ensayos de apagamiento, determinamos que 22 p.s.i. es la presión mínima necesaria para obtener resultados reproducibles (ver **Figura 15**), por lo que este segundo parámetro también permaneció fijo a partir de este punto.

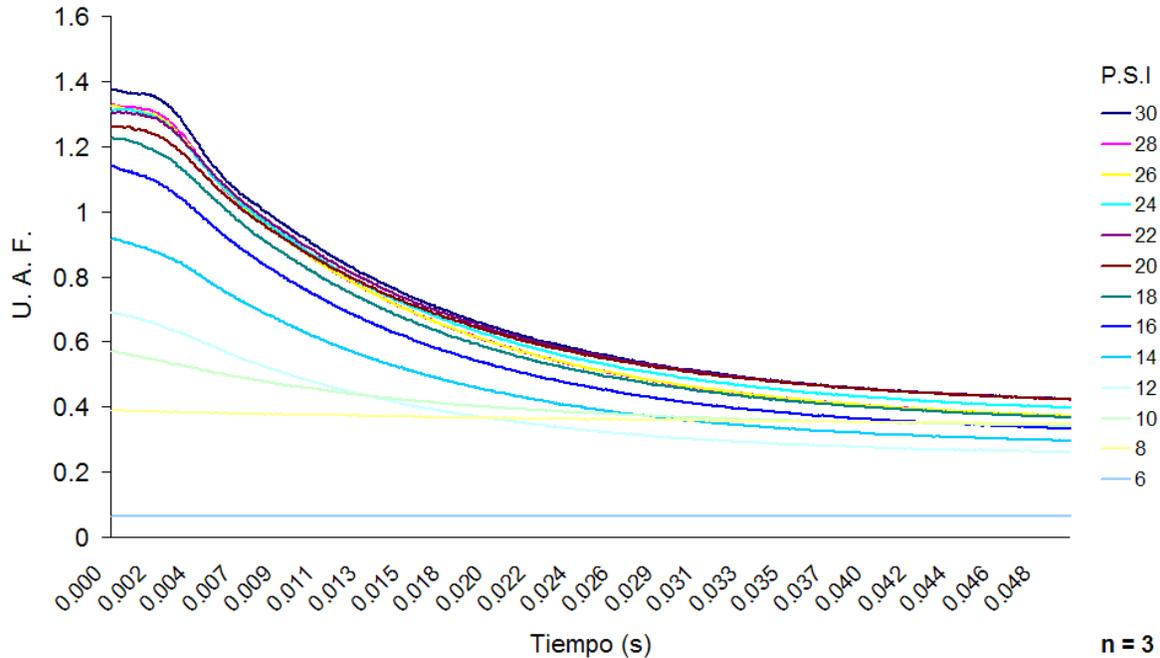
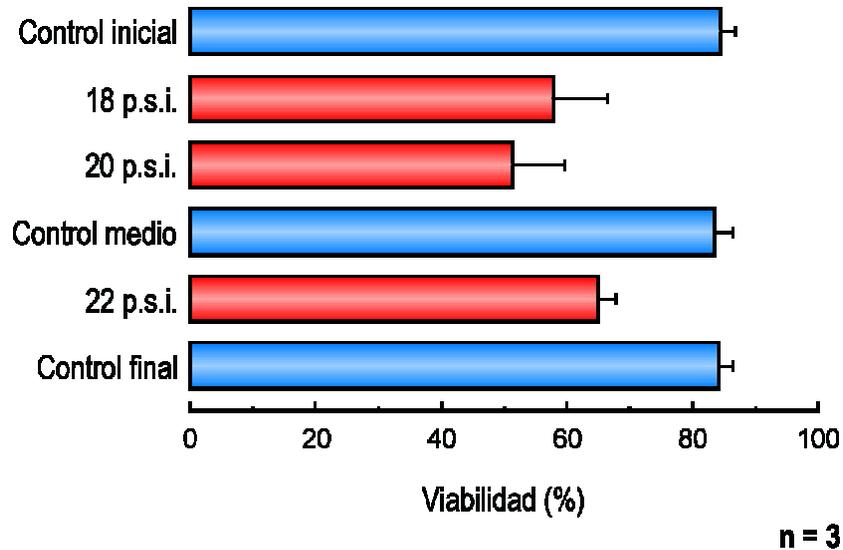


Figura 15. Determinación de la presión mínima en el espectrofluorómetro de mezclado rápido. Se realizaron pruebas de apagamiento, combinando CaCl_2 ($1 \mu\text{M}$) y Fura-2 impermeable ($1 \mu\text{M}$) con MnCl_2 (1 mM). Se muestran los trazos promedio de las reacciones de apagamiento obtenidas utilizando 13 presiones diferentes. Se determinó que 22 p.s.i. es la presión mínima requerida para obtener experimentos reproducibles. U. A. F.; Unidades arbitrarias de fluorescencia. **n = 3.**

Debido a que el espectrofluorómetro de mezclado rápido está diseñado para medir la fluorescencia de reacciones químicas (que no involucran células), cabía la posibilidad de que incluso las presiones más bajas que se pueden medir con el aparato y que permiten que se lleve a cabo un mezclado eficiente, dañaran o mataran a los espermatozoides. Por este motivo el siguiente paso fue evaluar la viabilidad de los espermatozoides capacitados y cargados con la sonda fluorescente para Ca^{2+} , Fluo-3 AM ($2 \mu\text{M}$), después de realizar disparos consecutivos en el espectrofluorómetro. En estas pruebas se hicieron tinciones vitales con eosina Y (0.5%) [89], en espermatozoides recuperados después de los experimentos de mezclado rápido en donde al observar a las células con microscopía de contraste de fases, los espermatozoides muertos absorben el colorante y se observan de color rojo, mientras que las células vivas permanecen sin teñirse. En todos los casos se incluyeron tres controles de tiempo (al inicio, a la mitad y al final del experimento; barras azules), en los que se analizó la viabilidad en poblaciones de espermatozoides que permanecieron todo el tiempo incubados a 37°C y que no se utilizaron en el espectrofluorómetro de mezclado rápido. Los valores obtenidos con los controles indican que el porcentaje de células que muere, no cambia durante el lapso de tiempo que dura el experimento (aproximadamente 2 horas).

Los resultados obtenidos indican que usando un volumen final de 240 μ l y presión de 22 p.s.i. en cada disparo, permanecen vivos $64.8 \pm 3\%$ de los espermatozoides (ver **Figura 16**). A pesar de que esta fracción que permanece viva de la población total es suficiente para realizar experimentos, también se hicieron pruebas de viabilidad usando dos presiones menores (18 y 20 p.s.i.). Interesantemente, la viabilidad en ambos casos fue menor que al usar 22 p.s.i., por lo que se requieren llevar a cabo estudios posteriores para determinar la causa de este fenómeno.



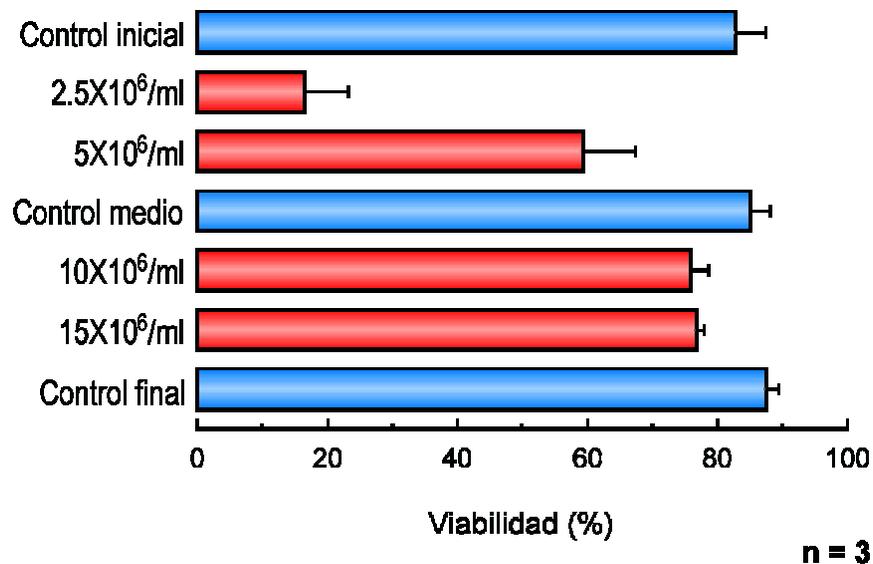
Presión (p.s.i.)	CI	18	20	CM	22	CF
% de Viabilidad \pm S.E.M.	84.4 \pm 2.4	57.7 \pm 8.7	51.3 \pm 8.4	83.3 \pm 3	64.8 \pm 3	84 \pm 2

Figura 16. Ensayos de viabilidad con distintas presiones. Se llevaron a cabo pruebas utilizando espermatozoides capacitados y posteriormente cargados con la sonda fluorescente Fluo-3 AM (2 μ M). Durante cada disparo en el espectrofluorómetro de mezclado rápido, se combinaron células a una concentración final arbitraria de 5×10^6 /ml con medio de registro en proporciones 1:1. El baño térmico del espectrofluorómetro se mantuvo siempre a 37°C y se usaron presiones de 18, 20 y 22 p.s.i. Posteriormente las células se centrifugaron durante 5 minutos a 735 xg, se tiñeron con eosina Y (0.5%) y se observaron en contraste de fases con un objetivo de 40X. Se determinó que utilizando una presión de 22 p.s.i. sobrevive $64.8 \pm 3\%$ de la población celular, valor que es suficiente para llevar a cabo experimentos. CI, Control inicial; CM, Control medio; CF, Control final. Los valores se presentan como promedio \pm error estándar del promedio (S.E.M.). n = 3.

Después de realizar los disparos en el espectrofluorómetro de mezclado rápido, la presión puede ocasionar que las cabezas de las células se separen de los flagelos, por lo que como control también se observó la integridad morfológica de las células después de los disparos y con las condiciones ya descritas. Utilizando un volumen final de 240 μ l y presión de 22 p.s.i. se determinó que 95.4% de los espermatozoides permanecen íntegros (*datos no mostrados*). Además, con presiones de 18 y 20 p.s.i. los porcentajes de integridad no son significativamente distintos con

respecto a 22 p.s.i.

Hasta este punto se utilizó una concentración final arbitraria de células de $5 \times 10^6/\text{ml}$, por lo que el último parámetro que se evaluó fue la concentración óptima de espermatozoides a utilizar. En este caso también se hicieron tinciones vitales con eosina Y (0.5%) después de hacer disparos en el espectrofluorómetro y utilizando cuatro concentraciones distintas de células. Se estableció que conforme se incrementa la concentración de células, también aumenta la fracción de células viables (ver **Figura 17**). El porcentaje de células viables se estabiliza a partir de $10 \times 10^6/\text{ml}$, sin embargo el porcentaje de viabilidad a esta concentración ($75.9 \pm 2.7\%$) no es significativamente distinto con respecto al obtenido a $5 \times 10^6/\text{ml}$ ($59.3 \pm 8.1\%$). Tomando en cuenta este punto y considerando que las muestras de semen no siempre tienen la cantidad suficiente de espermatozoides para utilizar $10 \times 10^6/\text{ml}$ en cada experimento, se decidió utilizar la concentración final de $5 \times 10^6/\text{ml}$ en todas las pruebas posteriores.



Concentración de células	CI	2.5x10 ⁶ /ml	5x10 ⁶ /ml	CM	10x10 ⁶ /ml	15x10 ⁶ /ml	CF
% de Viabilidad ± S.E.M.	82.8 ± 5	16.46 ± 6.7	59.3 ± 8.1	84.9 ± 3	75.9 ± 2.7	76.9 ± 1	87.5 ± 2

Figura 17. Ensayos de viabilidad con distintas concentraciones de células. En el espectrofluorómetro de mezclado rápido se combinaron espermatozoides capacitados y cargados con Fluo-3 AM ($2 \mu\text{M}$), con medio de registro en proporciones 1:1. El baño térmico del espectrofluorómetro se mantuvo siempre a 37°C y se usaron cuatro distintas concentraciones de células. Posteriormente las células se centrifugaron durante 5 minutos a 735 xg , se tiñeron con eosina Y (0.5%) y se observaron en contraste de fases con un objetivo de 40X. El porcentaje de viabilidad parece estabilizarse a partir de $10 \times 10^6/\text{ml}$. CI, Control inicial; CM, Control medio; CF, Control final. Los valores se presentan como promedio ± error estándar del promedio (S.E.M.). $n = 3$.

Una vez establecidas todas las condiciones ideales para hacer registros con células en el espectrofluorómetro de mezclado rápido, decidimos llevar a cabo las primeras pruebas con espermatozoides capacitados y progesterona como agonista de la RA, para comparar la velocidad de mezclado en el espectrofluorómetro convencional y el espectrofluorómetro de mezclado rápido. En todos los casos, las condiciones experimentales mostradas representan el promedio de al menos dos registros diferentes por día ($n = 3$; 6 registros en total), y posteriormente, a todos los valores se le sustrajo el control obtenido al mezclar medio de registro solo, con espermatozoides previamente capacitados y cargados con Fluo-3 AM. La **Figura 18** muestra los registros obtenidos al mezclar células con progesterona ($3 \mu\text{M}$) utilizando el espectrofluorómetro convencional (panel **A**) y el espectrofluorómetro de mezclado rápido (panel **B**). En ambos casos se observa una respuesta bifásica de Ca^{2+} : un incremento rápido seguido de uno lento, sin embargo la cinética de la respuesta es diferente en ambos tipos de mezclado. Para determinar la rapidez con la que las células respondieron a la progesterona, en ambos casos se calculó el $t_{1/2}$ del incremento inicial de Ca^{2+} considerando el pico máximo de fluorescencia como el 100% de la respuesta. Utilizando el mezclado convencional el $t_{1/2}$ obtenido fue de 2.35 s, mientras que con el mezclado rápido el valor fue de 460 ms. Por lo tanto, la respuesta obtenida con progesterona ($3 \mu\text{M}$) en el sistema de mezclado rápido es ~5 veces más veloz que en el sistema de mezclado convencional. Es fundamental resaltar el hecho de que el trazo en **A**) presenta fluorescencia basal (tiempo en el que se estabiliza la señal de fluorescencia), mientras que en **B**) no existe tal, debido a que la mezcla de las células y los agonistas se lleva a cabo en el tiempo cero.

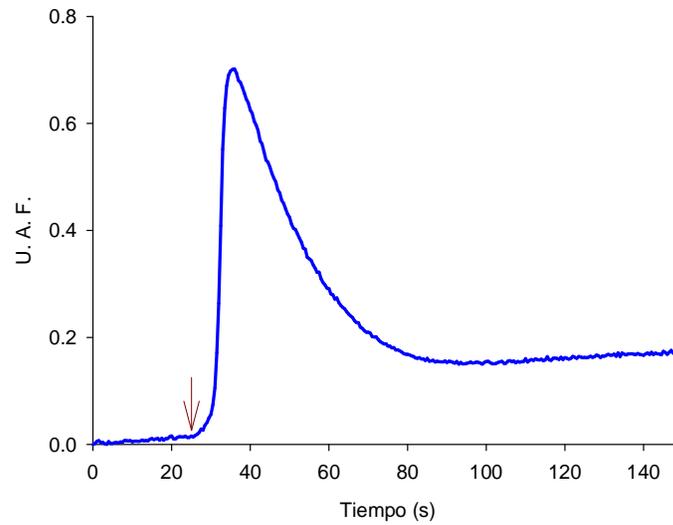
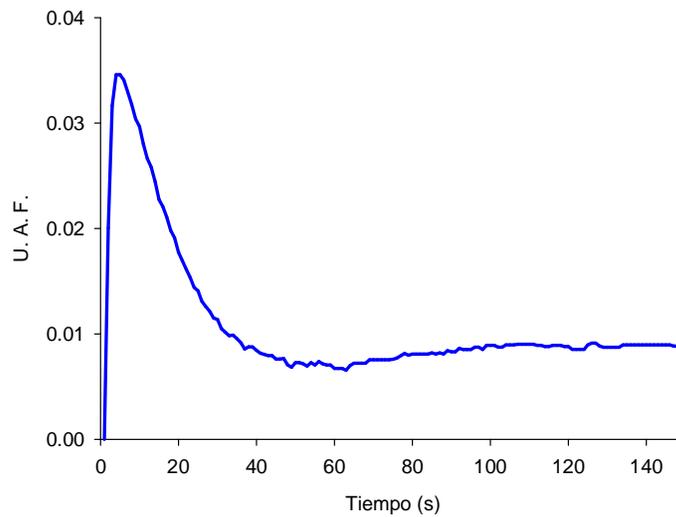
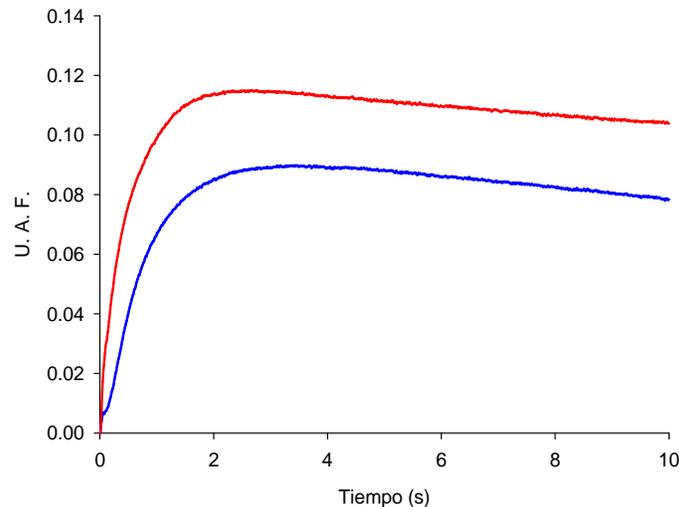
A)**B)****n = 3**

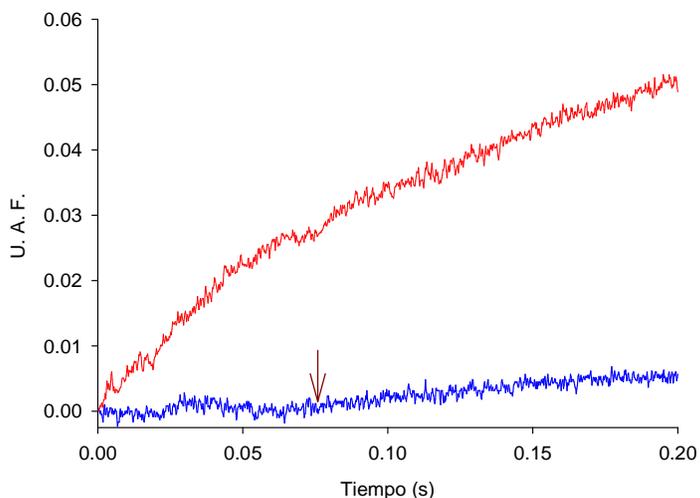
Figura 18. Comparación de la respuesta de calcio inducida por progesterona utilizando dos sistemas de mezclado. Cinética de la respuesta de Ca^{2+} obtenida al mezclar espermatozoides capacitados y cargados con Fluo-3 AM ($2 \mu\text{M}$), con progesterona ($3 \mu\text{M}$) en **(A)** un sistema de mezclado convencional o **(B)** en un sistema de mezclado rápido. Las dos respuestas presentan un componente inicial rápido, seguido de un componente lento, sin embargo la cinética es distinta en cada caso. Al calcular la $t_{1/2}$ del pico máximo de fluorescencia, se obtuvieron valores temporales de 2.35 s en **(A)** y 460 ms en **(B)**. La flecha roja en **(A)** indica el momento de la adición de la progesterona. U. A. F.; Unidades arbitrarias de fluorescencia. En ambos casos **n = 3**.

A pesar de que la progesterona ha sido uno de los inductores fisiológicos de la RA más utilizados, hasta hoy se desconoce la vía de señalización a través de la cual actúa para promover la exocitosis del acrosoma. Con la finalidad de determinar el momento preciso en el que inicia el incremento de Ca^{2+} inducido por este agonista, decidimos utilizar la alta resolución temporal del sistema de mezclado rápido. En el panel **A** de la **Figura 19** se observa el efecto de la progesterona ($3 \mu\text{M}$) comparado con la máxima respuesta de Ca^{2+} producida por ionomicina ($10 \mu\text{M}$) a lo largo de 10 s ($t_{1/2} = 260 \text{ ms}$). Debido a que la ionomicina es un ionóforo de Ca^{2+} , la aplicación de este compuesto genera en las poblaciones de células el mayor ingreso posible de este catión hacia el citoplasma, por lo que generalmente se utiliza como control positivo. En el panel **B** se muestran los primeros 200 ms (con alta resolución temporal) de la respuesta producida por ambos agonistas. El incremento de la señal producido por la ionomicina ($10 \mu\text{M}$) inicia inmediatamente después de llevar a cabo el mezclado rápido (i. e., tiempo cero); sin embargo, en el caso de la progesterona ($3 \mu\text{M}$) se observa un retraso de 76 ms con respecto al aumento inicial de la ionomicina. Esto sugiere la posible existencia de eventos celulares que preceden a la apertura de los canales de Ca^{2+} en la vía de señalización activada por progesterona.

A)



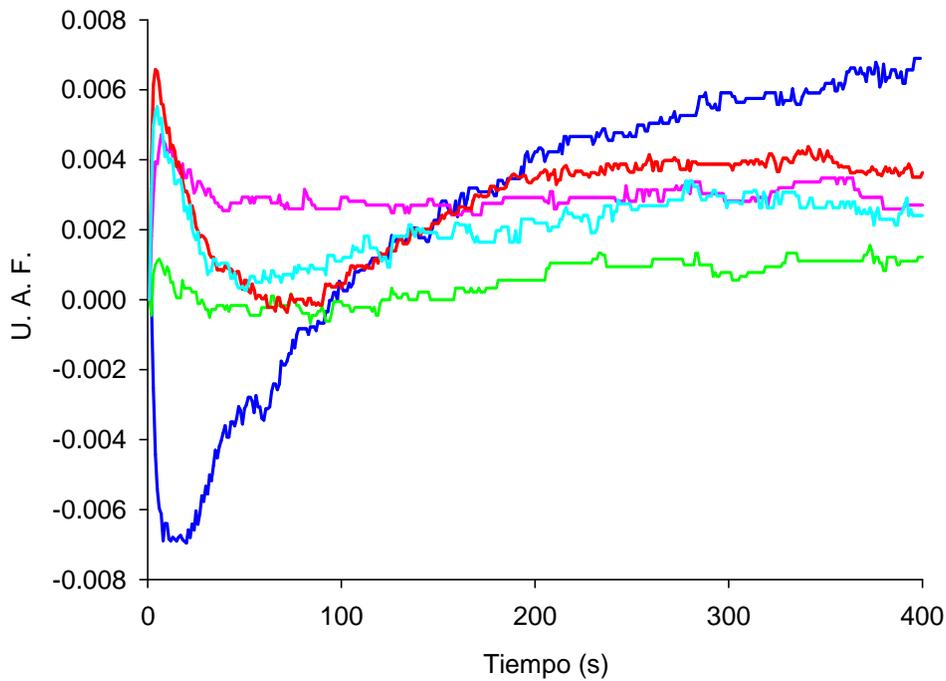
B)



n = 3

Figura 19. Dinámica con alta resolución temporal de la respuesta de calcio inducida por progesterona. Espermatozoides capacitados y posteriormente cargados con Fluo-3 AM ($2\ \mu\text{M}$), se mezclaron con ionomicina ($10\ \mu\text{M}$; trazo rojo) o progesterona ($3\ \mu\text{M}$; trazo azul) en el espectrofluorómetro de mezclado rápido. **(A)** Se muestran trazos promedio con resolución temporal baja de los primeros 10 s de las respuestas con ambos inductores y se observa que el incremento de Ca^{2+} originado por la ionomicina ($t_{1/2} = 260\ \text{ms}$) es más rápido que el de progesterona. **(B)** Al llevar a cabo los registros con alta resolución temporal, es evidente que el incremento de Ca^{2+} originado por la ionomicina inicia en el tiempo cero (i. e., inmediatamente después del mezclado), mientras que el incremento producido por la progesterona presenta un retraso de 76 ms. La flecha roja indica el momento en el que inicia el incremento de Ca^{2+} inducido por progesterona. U. A. F.; Unidades arbitrarias de fluorescencia. En ambos casos $n = 3$.

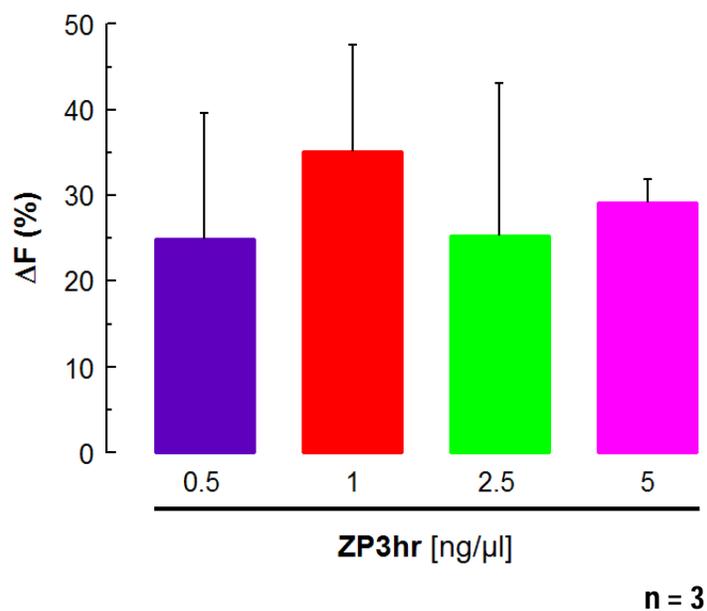
Después de finalizar las pruebas con progesterona, iniciamos la caracterización de la respuesta de Ca^{2+} producida por ZP3hr utilizando una concentración de $10\ \text{ng}/\mu\text{l}$, con la cual se obtuvo el máximo porcentaje de RA en ensayos previos (ver **RESULTADOS/Pruebas con espermatozoides/Curva dosis-respuesta de ZP3hr**). En este caso, dicha concentración de ZP3hr (azul oscuro) produjo una marcada disminución de la fluorescencia seguida de un incremento que continuó al menos hasta los 400 s (ver **Figura 20**). Debido a que la alta concentración de proteína podría de alguna manera ser la causante de esta respuesta atípica, se decidió utilizar concentraciones más bajas de ZP3hr. Las concentraciones elegidas fueron (en $\text{ng}/\mu\text{l}$): 5 (rosa), 2.5 (verde), 1 (rojo) y 0.5 (azul claro). A pesar de que la magnitud de las respuestas es diferente, en todos los casos se pueden observar dos fases de los incrementos de Ca^{2+} : un rápido aumento inicial que alcanza el máximo de fluorescencia en un promedio de 5.4 segundos, seguido de un incremento lento que después de varios segundos se estabiliza y permanece así incluso hasta los 1000 s (*datos no mostrados*).



n = 3

Figura 20. La respuesta de calcio inducida por ZP3hr es bifásica y depende de la concentración. Espermatozoides capacitados y cargados con Fluo-3 AM (2 μM), se mezclaron con cinco concentraciones distintas de ZP3hr: (en $\text{ng}/\mu\text{l}$) 10 (azul oscuro), 5 (rosa), 2.5 (verde), 1 (rojo) y 0.5 (azul claro). La concentración más alta de ZP3hr produce una súbita disminución de la fluorescencia seguida de un incremento permanente incluso después de 400 s. Concentraciones más bajas de ZP3hr producen, en mayor o menor medida, una respuesta de Ca^{2+} bifásica: un incremento rápido seguido de un incremento lento y sostenido. U. A. F.; Unidades arbitrarias de fluorescencia. **n = 3**.

Después, para determinar la concentración de ZP3hr que utilizaríamos a partir de este punto decidimos normalizar los picos máximos de fluorescencia obtenidos, con respecto al 100% de los picos máximos de fluorescencia generados por los controles hechos con progesterona (*datos no mostrados*). La gráfica de la **Figura 21** muestra los promedios de los picos máximos normalizados de las concentraciones de ZP3hr utilizadas previamente (excepto 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$). A pesar de que los valores no son significativamente distintos entre sí, se observa una tendencia en la actividad de ZP3hr cuyo valor promedio máximo corresponde a la concentración de 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$, por lo que decidimos utilizar esta concentración en los experimentos posteriores.



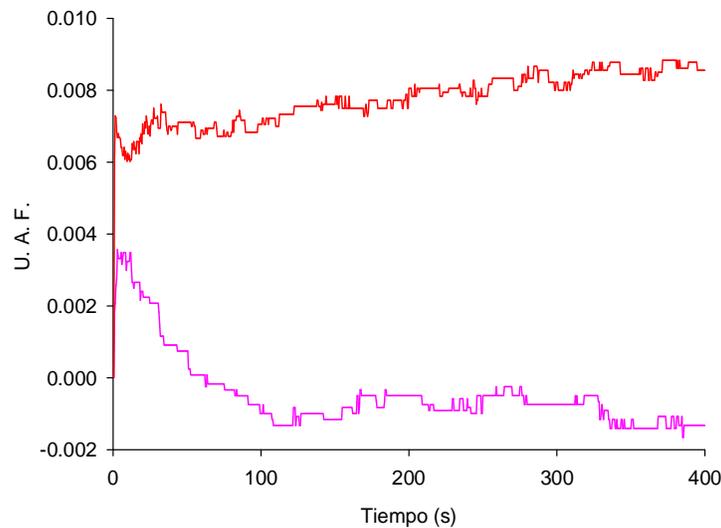
Concentración ZP3hr (ng/μl)	0.5	1	2.5	5
ΔF (%) ± S.E.M.	25 ± 15	35 ± 12	25 ± 18	29 ± 3

Figura 21. Picos máximos de fluorescencia obtenidos con ZP3hr. Espermatozoides capacitados y cargados con Fluo-3 AM (2 μM), se mezclaron con cinco concentraciones distintas de ZP3hr: (en ng/μl) 5, 2.5, 1 y 0.5. Los picos máximos de fluorescencia de la primera fase de la respuesta de Ca²⁺ se promediaron y normalizaron con respecto a los picos máximos de los controles con progesterona. A pesar de que los valores obtenidos no son significativamente distintos entre sí, se observa una tendencia cuyo máximo valor corresponde a 1 ng/μl. Los valores se presentan como promedio ± error estándar del promedio (S.E.M.). n = 3.

Estudios previos han demostrado que la respuesta de Ca²⁺ inducida por ZP3 depende del Ca²⁺ extracelular. Después de definir la concentración de ZP3hr que utilizaríamos, decidimos llevar a cabo una prueba control para determinar si la respuesta generada por la glicoproteína recombinante también depende del Ca²⁺ externo. En la **Figura 22** se observa que en estas pruebas, a pesar de que el trazo control promedio con ZP3hr (trazo rojo) produjo una respuesta con un incremento sustancial de Ca²⁺, las dos fases descritas previamente ya no presentan la misma forma. Se observa que en ausencia de Ca²⁺ externo (medio de registro con Ca²⁺ 100 nM), se suprime casi totalmente la respuesta generada por ZP3hr en un medio con una concentración fisiológica de Ca²⁺ (medio de registro con Ca²⁺ 2 mM), por lo que la respuesta inducida por la glicoproteína depende de la [Ca²⁺]_e.

Para averiguar si el cambio en la actividad de la glicoproteína se debía a un cambio en la concentración que produce la mayor respuesta, decidimos registrar nuevamente las respuestas de Ca²⁺ generadas por distintas concentraciones de ZP3hr (*datos no mostrados*). Los resultados obtenidos confirmaron que la concentración de ZP3hr que origina la mayor respuesta de Ca²⁺ en los espermatozoides capacitados, es de 0.5 ng/μl, por lo que decidimos utilizar esta concentración en

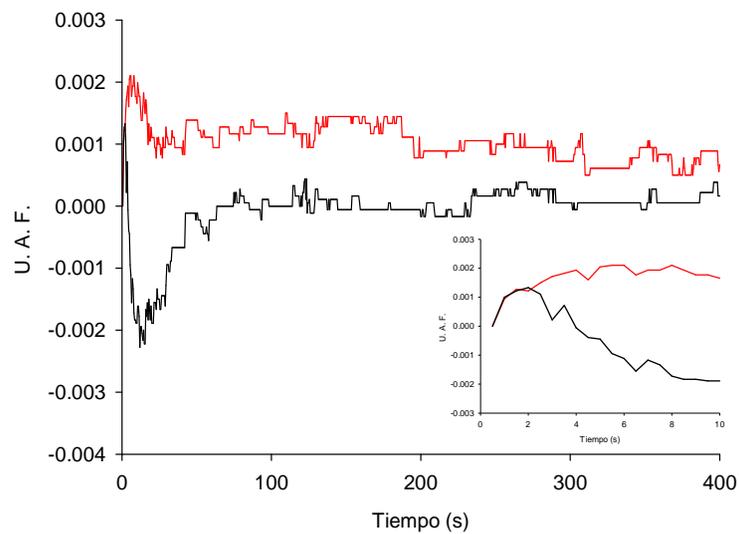
los últimos experimentos del proyecto.



n = 3

Figura 22. La respuesta generada por ZP3hr depende del calcio extracelular. Espermatozoides capacitados y cargados con Fluo-3 AM (2 μM), se mezclaron con ZP3hr (1 $\text{ng}/\mu\text{l}$) en medio de registro con 2 mM (trazo rojo) o 100 nM de Ca^{2+} (trazo rosa). Al comparar ambos trazos se observa que la respuesta producida por ZP3hr depende parcialmente del Ca^{2+} que se encuentra afuera de las células. U. A. F.; Unidades arbitrarias de fluorescencia. **n = 3**.

A pesar de que en los últimos experimentos la respuesta generada por la ZP3hr ya no fue la esperada, y dado que producir un nuevo lote de la glicoproteína requiere mucho tiempo, decidimos utilizar al menos uno de los inhibidores mejor caracterizados para canales Ca_v3 para investigar si afectaba la respuesta residual de Ca^{2+} . Exploramos la participación de canales Ca_v3 en este proceso utilizando NiCl_2 en los ensayos de mezclado rápido. Elaborando ensayos de RA con FITC-PSA, en un estudio previo determinamos que la IC_{50} de inhibición por el NiCl_2 durante la RA en espermatozoides de humano es de 23 μM [81]. Tomando esto en cuenta, iniciamos la caracterización del perfil farmacológico de esta respuesta utilizando la IC_{50} triplicada del NiCl_2 para inhibir a estos canales ($\sim 80 \mu\text{M}$). En la **Figura 23** se aprecia que la presencia del inhibidor (trazo negro) de manera general suprime la respuesta generada por ZP3hr 0.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (trazo rojo), lo que confirma la participación de los canales $\text{Ca}_v3.2$ en este proceso. En el inserto de la figura (i.e., amplificación de los primeros 10 segundos de la respuesta), se observa un ligero incremento de Ca^{2+} en los primeros 3 s en presencia del inhibidor. Esta minúscula respuesta podría deberse a la contribución, en menor medida, de canales $\text{Ca}_v3.1$ y/o $\text{Ca}_v3.3$ en la respuesta inducida por ZP3hr, sin embargo es necesario llevar a cabo experimentos posteriores para verificar esta hipótesis.



n = 3

Figura 23. El NiCl₂ inhibe la respuesta de calcio inducida por ZP3hr. Espermatozoides capacitados, cargados con Fluo-3 AM (2 μ M) y preincubados (trazo negro) o no (trazo rojo) durante 15 minutos con NiCl₂ (80 μ M), se mezclaron posteriormente con ZP3hr (0.5 ng/ μ l). La respuesta generada por ZP3hr, se suprime en presencia del inhibidor. **Inserto:** Amplificación de los primeros 10s de la respuesta de Ca²⁺ generada por ZP3hr. Se observa un ligero incremento de Ca²⁺ que dura 3 s. U. A. F.; Unidades arbitrarias de fluorescencia. **n = 3.**

También es importante mencionar que la respuesta de ZP3hr, a pesar de ser bifásica en estos últimos experimentos, presenta una forma distinta a la obtenida en pruebas previas. De hecho en experimentos posteriores la magnitud de las respuestas de Ca²⁺ generadas por ZP3hr tuvo un decremento gradual (*datos no mostrados*), por lo que debido a la inconsistencia de los resultados obtenidos en dichas pruebas decidimos finalizar el proyecto de investigación en este punto.

9 DISCUSIÓN

La fecundación es un evento fundamental para la generación de nuevos individuos, y en los organismos de reproducción sexual este proceso involucra la unión de un espermatozoide y un óvulo. En la fecundación están involucrados distintos eventos moleculares cuya acción organizada permite que se lleve a cabo la unión de ambos gametos. Uno de tales eventos es la reacción acrosomal (RA).

El objetivo principal de este trabajo fue utilizar distintas técnicas para estudiar la posible participación de algún(os) miembro(s) de la familia de canales de calcio (Ca^{2+}) activados por voltaje (Cav) en la RA inducida por la glicoproteína ZP3 humana recombinante (ZP3hr) en espermatozoides capacitados de humano. Dada la importancia de contar con suficiente ZP3hr para llevar a cabo los ensayos de inducción, nuestros primeros esfuerzos se centraron en producir la proteína recombinante. A pesar de que los protocolos de expresión y purificación de la ZP3hr se diseñaron en el INCMNSZ [18], consideramos de gran importancia el montarlos en nuestro laboratorio porque esto nos ha brindado la posibilidad de contar con cantidades suficientes de proteína no sólo para cumplir los objetivos de este trabajo, sino también para llevar a cabo otros proyectos de investigación.

Los protocolos de expresión y purificación se llevaron a cabo exitosamente. Tanto los pesos moleculares de los productos, como su capacidad de inducir la RA son consistentes con los resultados obtenidos en estudios previos [18, 46]. Interesantemente, en los ensayos de RA con FITC-PSA también obtuvimos una disminución paulatina en el porcentaje de inducción al utilizar concentraciones mayores a 10 ng/ μl de ZP3hr. Este fenómeno ya se había observado anteriormente no sólo en el INCMNSZ, sino también en nuestro laboratorio al realizar las curvas dosis-respuesta de otros lotes de ZP3hr. A pesar de que aún no podemos explicar el origen de este fenómeno, especulamos que podría deberse a la formación de agregados de la proteína a altas concentraciones. Si tomamos en cuenta que las cuatro ZP's nativas (ZP1-ZP4) se agregan de forma natural para ensamblar la matriz extracelular de los óvulos de humano, tal vez lo mismo podría suceder con las ZP3hr que se encuentran en solución. Esto podría explicar su incapacidad de inducir la RA, ya que si las proteínas se encuentran agregadas, los sitios que interactúan con sus respectivos ligandos en la membrana plasmática de los espermatozoides e inician la vía de señalización de la RA, podrían no estar disponibles.

En cuanto a los ensayos de RA, este es el primer trabajo en el que se ha explorado detalladamente el perfil farmacológico de los canales de calcio involucrados en la RA inducida por ZP3hr. Los resultados obtenidos sugieren la participación de miembros de las subfamilias de canales

Cav1 y Cav3 en la RA. Esto es consistente con resultados obtenidos en estudios previos ya que por ejemplo, los ARNm's de algunos miembros de ambas subfamilias de canales se han localizado en los espermatozoides de humano [96]. Además, las proteínas de algunos de estos mismos canales se han inmunolocalizado en la membrana plasmática de los gametos masculinos [75, 97]. En contraste, ningún miembro de la subfamilia Cav2 parece participar en la RA. Esto es interesante, puesto que al menos un miembro de esta subfamilia también se ha inmunolocalizado en la membrana plasmática de los espermatozoides [75].

Todo el perfil farmacológico obtenido mediante ensayos de RA utilizando inhibidores para las tres subfamilias de canales Cav, ya se encuentra publicado (**ver APÉNDICE**).

Dada la controversia que se tiene actualmente sobre la participación de los canales Cav1 y/o Cav3 en la RA inducida por ZP3, decidimos explorar con alta resolución temporal en un espectrofluorómetro de mezclado rápido el perfil farmacológico de la respuesta de Ca²⁺ ocasionada por la proteína recombinante en los espermatozoides. Inicialmente elaboramos todos los controles necesarios en el espectrofluorómetro de mezclado rápido para optimizar el uso de la ZP3hr y conseguir la máxima viabilidad posible de los espermatozoides. Hicimos ensayos de apagamiento mezclando CaCl₂ (1 μM) y Fura-2 (1 μM) + MnCl₂ (1 mM) y utilizando distintos volúmenes finales de mezclado. El objetivo de estas pruebas fue establecer el volumen mínimo con el que se pueden obtener resultados reproducibles en el espectrofluorómetro. Se observó que la forma de los trazos se conserva en los diez volúmenes mayores, sin embargo en los tres volúmenes menores los resultados obtenidos son claramente artificios ocasionados porque el volumen que se desplaza de los reactivos es tan bajo, que no es suficiente para que se detecte una señal de fluorescencia en la celda de mezclado.

Con la finalidad de determinar la presión mínima con la que se pueden obtener resultados reproducibles en el fluorómetro, posteriormente hicimos pruebas utilizando los mismos reactivos de las pruebas anteriores de apagamiento, pero diferentes presiones (i. e., 6-30 p.s.i.). En los trazos obtenidos con las presiones mayores se observó una fluorescencia inicial alta, que disminuyó gradualmente hasta apagarse totalmente aproximadamente a los 50 ms. Al utilizar presiones cada vez menores se observó una disminución paulatina en la magnitud de las respectivas fluorescencias iniciales, lo que se puede explicar si se toma en cuenta el *tiempo muerto* al que se someten las reacciones en el espectrofluorómetro de mezclado rápido. En este equipo los reactivos en realidad se unen antes de ingresar a la celda de mezclado y al tiempo breve en el que permanecen unidos antes de ingresar en la celda se le denomina *tiempo muerto*, sin embargo la presión empleada

siempre debe ser lo suficientemente grande para que los reactivos ingresen rápidamente a la celda de mezclado y los cambios en la fluorescencia ocasionados por la reacción se puedan detectar desde el inicio. Por lo tanto, debido a la relativa lentitud del flujo de los reactivos y a la brevedad de la duración de la reacción de apagamiento (~50 ms), cuando se utilizan presiones bajas únicamente se detecta el final de la reacción. Con estas pruebas se determinó que la presión mínima para obtener resultados reproducibles es de 22 p.s.i., sin embargo tuvimos que verificar que la cantidad de espermatozoides capacitados que sobrevivían utilizando esta presión, era suficiente para poder realizar experimentos. Por lo tanto, se llevaron a cabo pruebas utilizando 22 p.s.i. de presión y elaborando tinciones vitales con eosina, con las cuales se determinó que bajo estas condiciones de trabajo, 65% de las células permanecen vivas. Interesantemente, también se descubrió que el porcentaje de sobrevivencia es menor que 65% utilizando presiones menores (i. e., 18 y 20 p.s.i.). Este hecho podría deberse a que al utilizar presiones menores a 22 p.s.i., las células están expuestas durante relativamente más tiempo a estrés mecánico debido a la lentitud del mezclado, lo que podría provocar la muerte de una mayor cantidad de espermatozoides.

Después se utilizaron cuatro diferentes concentraciones de células para determinar la que se usaría en las pruebas posteriores. Los resultados de las tinciones con eosina indicaron que el porcentaje de células vivas es menor a concentraciones bajas (i. e., 2.5 y 5×10^6 /ml), que a altas. Esto podría deberse a que utilizando concentraciones bajas de células cada espermatozoide estaría sometida a una mayor fuerza y por lo tanto tendría una mayor probabilidad de morir, si tomamos en cuenta que la presión está dada por la distribución de la fuerza sobre un área determinada. Otra posibilidad es que con concentraciones altas de células, el medio con los espermatozoides podría volverse ligeramente más viscoso, lo que de cierta forma ayudaría a disminuir la fricción a la que son sometidos los espermatozoides. Esto último se traduciría en menor estrés mecánico para los espermatozoides y por lo tanto una mayor probabilidad de sobrevivencia.

Una vez establecidos todos los parámetros necesarios para mejorar el rendimiento de las células y los reactivos en el espectrofluorómetro de mezclado rápido, decidimos evaluar los parámetros que seleccionaríamos para trabajar con espermatozoides con una respuesta de calcio conocida, como es la de progesterona, comparando los resultados al utilizar dos sistemas distintos de mezclado (i. e., convencional y rápido). Como se observa en el apartado de resultados, utilizando las mismas concentraciones tanto de células como de reactivos pero equipos de medición distintos, la respuesta generada por la progesterona alcanza la mitad del máximo de la fluorescencia con una velocidad aproximadamente 5 veces mayor en el sistema de mezclado rápido, en comparación con

el equipo convencional. Interesantemente, a pesar de que la cinética es distinta en ambos casos, las dos respuestas presentan un comportamiento bifásico. Tal vez sólo las cinéticas son distintas porque en el equipo de mezclado rápido los receptores de la progesterona en el espermatozoide se saturan con mayor rapidez debido al mezclado inmediato de las sustancias, lo cual no sucede utilizando el mezclado convencional, si se toma en cuenta que en este caso la mezcla no es rápida porque depende de la velocidad del giro del agitador magnético que se encarga de homogenizar a las células con el agonista.

Hasta el momento se desconoce la vía de señalización intracelular iniciada por la progesterona en los espermatozoides de humano. En nuestro laboratorio previamente se llevó a cabo un estudio en el que evaluó la actividad de tres análogos fotoactivables de la progesterona en espermatozoides de humano [98]. El incremento de la respuesta de Ca^{2+} del análogo cuya actividad resultó ser la más eficiente, presentó un retraso de 800 ms. Debido a que en dicho estudio se utilizó el mezclado convencional, que el flash de luz UV que se utilizó fue relativamente largo (i. e., 200 ms), y que sólo se logró fotoactivar el 30% de la progesterona utilizada, nos pareció interesante utilizar el mezclado rápido y progesterona sin modificar para verificar si el retraso detectado en la respuesta de calcio se debía a un artefacto ocasionado por el desensajamiento del compuesto o no. Después de medir los primeros 200 ms de esta respuesta, detectamos la presencia de un retraso de 76 ms en el incremento de Ca^{2+} , lo que podría indicar la presencia de eventos intracelulares previos a la apertura de los canales de Ca^{2+} ocasionada por la progesterona sin modificar (3 μ M). Aunque aún desconocemos la naturaleza de estos posibles eventos previos, sería interesante realizar estudios utilizando distintos inhibidores para caracterizar a los elementos moleculares que conforman la vía de señalización.

El siguiente paso fue registrar las respuestas de Ca^{2+} ocasionadas por distintas concentraciones de ZP3hr en el espectrofluorómetro de mezclado rápido. En estudios previos se ha investigado la respuesta de Ca^{2+} generada por la ZP nativa total [99, 100], pero debido principalmente a la dificultad que implica el purificar ZP3 nativa de óvulos de humano, hasta ahora no se había realizado ningún estudio para caracterizar la respuesta solamente de esta glicoproteína. Inesperadamente, la concentración que previamente generó el mayor porcentaje de RA (i.e., 10 ng/ μ l) en los ensayos con FITC-PSA, no produjo un comportamiento de la fluorescencia consistente con los resultados de reportes previos.

Desconocemos si la viabilidad de las células disminuye utilizando esta concentración de proteína, sin embargo es importante llevar a cabo estudios posteriores para determinar el origen de

este fenómeno. Por otro lado, concentraciones menores a 10 ng/ μ l de ZP3hr generan una respuesta bifásica de calcio (i. e., un ingreso rápido, seguido de un ingreso lento y sostenido), lo que es consistente con resultados previos obtenidos utilizando ZPh total [99]. Después de normalizar con respecto a la respuesta de progesterona, los picos máximos de fluorescencia obtenidos utilizando las cuatro concentraciones de ZP3hr menores a 10 ng/ μ l, descubrimos que la magnitud de la respuesta de Ca^{2+} depende de la concentración de glicoproteína utilizada. Observamos una tendencia en los valores promedio de fluorescencia generados por las distintas concentraciones de ZP3hr, y con base en estos resultados decidimos utilizar 1 ng/ μ l de ZP3hr en los experimentos posteriores.

En este trabajo de investigación también determinamos que la respuesta de Ca^{2+} de ZP3hr depende de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Este hecho es consistente con los resultados obtenidos en estudios previos que demuestran que el Ca^{2+} externo es indispensable para que se lleve a cabo la RA inducida por distintos agonistas [73]. A pesar de la clara dependencia de la respuesta del Ca^{2+} extracelular, se observa un ligero incremento de la fluorescencia durante los primeros segundos de la respuesta en medio con 100 nM de Ca^{2+} , el cual disminuye gradualmente hasta evitar por completo el resto del ingreso de este catión en los espermatozoides. Esta breve respuesta ocasionada por ZP3hr ya se ha detectado en nuestro laboratorio por otras personas, haciendo registros de Ca^{2+} en célula única (*datos no publicados*) y aunque desconocemos su origen, podría deberse a la presencia de trazas de cationes divalentes que se encuentran en el medio de registro utilizado para hacer los experimentos, lo que puede suceder a pesar de haber calculado la cantidad necesaria de quelante para llevar el medio de registro a una concentración final de Ca^{2+} de 100 nM.

Hasta esta fase del proyecto, debido a que nuestra ZP3hr daba muestras de haberse agregado y el efecto parecía incrementarse con el paso del tiempo, antes de posiblemente perder por completo la actividad de la glicoproteína decidimos utilizar Ni^{2+} para iniciar la caracterización farmacológica de la primera fase de la respuesta de Ca^{2+} generada por ZP3hr. Elegimos el Ni^{2+} porque ya están reportadas las IC_{50} de inhibición por este compuesto para cada uno de los tres canales $\text{Cav}3$ [70] y decidimos basarnos en la concentración para inhibir a los canales $\text{Cav}3.2$ porque evidencias previas sugieren que estos podrían ser los canales involucrados en la RA inducida por ZP3hr [81]. A pesar de que en las pruebas se logró inhibir parcialmente la respuesta, durante los primeros tres segundos observamos un ligero incremento de Ca^{2+} que podría deberse a la participación de canales $\text{Cav}3.1$ o $\text{Cav}3.3$, cuyas IC_{50} de inhibición son mayores a 200 μM [70]. Desafortunadamente, debido a la disminución en la actividad de la ZP3hr y, por consiguiente, a la

falta de consistencia en los resultados de experimentos posteriores, no pudimos probar esta hipótesis ni el efecto de inhibidores de canales Ca_v1 y Ca_v2 en la respuesta de ZP3hr.

Con respecto a esto, utilizando un equipo que realiza un estimado del tamaño de las partículas que se encuentran en una solución mediante la luz que dispersan, llevamos a cabo pruebas para determinar si la glicoproteína se agregaba y encontramos que el medio en donde se encuentra suspendida la ZP3hr contiene partículas con pesos moleculares de ~400 kDa, principalmente. Ahora debemos llevar a cabo ensayos de RA para determinar si la glicoproteína aún conserva su actividad biológica. En caso de haberla perdido, más adelante procederemos a expresar y purificar un nuevo lote de ZP3hr.

Finalmente, esta investigación representa un avance considerable en el estudio de los canales de calcio involucrados en la respuesta iniciada por ZP3hr en los espermatozoides de humano, lo cual no se había logrado hasta ahora debido principalmente a la falta de disponibilidad de suficiente ZP3.

10 CONCLUSIONES

- ◆ El protocolo de purificación de la ZP3hr se llevó a cabo exitosamente. Además, la proteína recombinante obtenida es capaz de inducir la RA en espermatozoides capacitados de humano, en proporciones similares a las reportadas en estudios previos.
- ◆ Los resultados de los ensayos de RA sugieren la participación de algún(os) miembro(s) de las subfamilias de canales Ca_v1 y Ca_v3 en la RA inducida por ZP3hr en espermatozoides de humano. Por otro lado, ninguno de los canales de la subfamilia Ca_v2 parece participar en el proceso.
- ◆ Se determinaron las condiciones para utilizar espermatozoides de humano en el espectrofluorometro de mezclado rápido. Los valores son los siguientes: volumen de 200 μ l, presión de 22 p.s.i. y concentración final de 10×10^6 células/ml.
- ◆ El incremento intracelular de Ca^{2+} generado por la progesterona sin modificar en los espermatozoides capacitados de humano, presenta un retraso de 76 ms.
- ◆ La respuesta de Ca^{2+} generada por ZP3hr en espermatozoides capacitados de humano, es bifásica: presenta un incremento rápido de la fluorescencia, seguido por un incremento lento y sostenido.
- ◆ La magnitud de la respuesta de Ca^{2+} producida por ZP3hr depende de la concentración utilizada, es dependiente del Ca^{2+} extracelular y es sensible al Ni^{2+} . Esto último sugiere la participación al menos de los canales $Ca_v3.2$ en este proceso, lo que es consistente con datos reportados en estudios previos.

11 MATERIAL SUPLEMENTARIO

11.1 MÉTODOS

11.1.1 Ensayo en Placa

Se prepararon 25 ml de una solución de medio TNM-FH con 10% de suero fetal bovino (SFB) más células *Sf9* a una concentración de 2×10^5 células/ml y con una viabilidad superior al 95%. Se sembraron placas de 24 pozos colocando 1 ml de la solución en cada pozo y se agitó ligeramente para distribuir las células. La placa se incubó a 27°C durante 1 hora.

Se prepararon diez diluciones seriales (10^{-1} - 10^{-10}) del stock viral original en 900 μ l de medio Grace con 10% de SFB. A cada pozo se le agregaron 100 μ l de su respectiva dilución viral procurando no dejar secar la monocapa de células, la placa selló con cinta y se centrifugó a 1,000 xg durante 1 hora. Después el inóculo del virus se removió de los pozos y a cada uno se le agregaron 500 μ l de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 3% y a 37°C. De esta forma, la placa se dejó a temperatura ambiente hasta que la agarosa se solidificó (~20 minutos). Posteriormente la placa sellada se colocó en ambiente húmedo dentro de una bolsa de plástico y se incubó durante 4 días a 27°C.

Concluido el tiempo, a cada pozo se le adicionó una solución de agarosa al 1.2% y la placa se incubó durante 4 horas a 27°C. Las placas virales formadas se identificaron, se marcaron en el fondo de la placa y se aislaron cuidadosamente succionándolas con una micropipeta. Después, cada una de las placas tomadas se diluyó en 500 μ l de medio Grace con 0.05% de SFB y se agitó en un vórtex para liberar por completo las partículas virales. Estos volúmenes se utilizaron para infectar nuevamente monocapas de células *Sf9* y 96 horas después de la infección se cuantificó la cantidad de proteína utilizando el método de Bradford y se verificó la presencia de ZP3hr mediante western blot. Finalmente, parte del volumen que generó la mayor banda de ZP3hr en la autoradiografía se utilizó para llevar a cabo una nueva infección de células *Sf9* y al separar el sobrenadante 96 horas después, se obtuvo el concentrado viral reserva de pasaje 1.

11.1.2 Ensayo de viabilidad

Para obtener el título del concentrado viral se llevó a cabo un ensayo de viabilidad [101]. Primero se sembraron dos placas de 96 pozos con una densidad de $1 \times 10^3 - 2 \times 10^6$ células viables en 50 μl de medio SF900II (concentración de 0.15×10^6 células/ml). Se realizaron 10 diluciones seriales del concentrado viral en 1 ml de medio SF900II y a cada pozo se le adicionaron 10 μl , utilizando 2 columnas de pozos por dilución. Como controles se utilizaron 2 columnas de pozos sin infectar y 2 columnas infectadas con el concentrado viral sin diluir. Después las placas se sellaron, se colocaron en ambiente húmedo dentro de una bolsa de plástico y se incubaron a 27°C durante 6 días.

Transcurrido ese tiempo se preparó una solución de MTT (5 mg/ml) y se agregaron 10 μl a cada pozo. Las placas se cubrieron con papel aluminio para protegerlas de la luz y se colocaron durante 2 horas en agitación constante. Posteriormente se centrifugaron las placas a 2,000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante de los pozos utilizando un sistema de vacío. En cada pozo se colocaron 50 μl de DMSO y se esperó hasta disolver los cristales formados. Las placas se leyeron a 570 nm en un lector de Elisa y los valores obtenidos se transfirieron a una hoja de cálculo de Excel, en donde se obtuvieron los valores promedio y desviaciones estándar por dilución. Después los datos se ajustaron a una curva sigmoide utilizando el programa Sigmaplot 9.0 y se obtuvieron las variables **a**, **b**, **x0**, **y0** de la ecuación, además del factor de correlación. Finalmente los valores obtenidos se convirtieron a unidades formadoras de placa por mililitro (ufp/ml) utilizando las siguientes fórmulas:

$$\log \text{TCID}_{50}/\text{ml} = 0.912 (\log \text{TCLD}_{50}/\text{ml}) + 1.674$$

$$\text{ufp}/\text{ml} = \text{TCID}_{50}/\text{ml} \times 0.69$$

Donde **ufp**: unidad formadora de placa;

TCID₅₀: dosis infectiva media de un cultivo;

TCLD₅₀: dosis letal media de un cultivo.

11.1.3 Western blot

Esta técnica se utilizó para comprobar la presencia de ZP3hr en las eluciones obtenidas después de purificar la glicoproteína. En este caso, las pastillas obtenidas después de precipitar con TCA se diluyeron en **mezcla digestora** (SDS 10%, glicerol 50%, EDTA 8 mM, trisma-base 0.5 M, azul de bromofenol 1 µg/ml y β-mercaptoetanol 5%) y se separaron mediante electroforesis en SDS-PAGE con poliacrilamida al 10%. Posteriormente las proteínas del gel se electrotransfirieron a una membrana PVDF, la cual más tarde se bloqueó durante 2 horas y en agitación constante con BSA o leche al 5% en TBS con 0.05% de Tween-20 (TBS-T). La membrana se mantuvo en agitación constante a 4°C y durante toda la noche, con una dilución 1:2,000 del anticuerpo primario de conejo anti-ZP de cerdo diluido en TBS-T. Después se utilizó una dilución 1:10,000 del anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a una peroxidasa de rábano (HRP) en TBS-T y finalmente la señal del anticuerpo secundario se detectó mediante quimioluminiscencia al exponer la membrana a una placa fotográfica.

11.1.4 Nado hacia arriba y capacitación

Cada muestra de semen se colectó en el laboratorio dentro de un frasco estéril de plástico, y se incubó en una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂ durante ~40 minutos, promoviendo así la licuefacción de la muestra. Después los espermatozoides móviles se separaron del semen mediante la técnica de swim-up (*nado hacia arriba*) [102].

El método de nado hacia arriba se basa en la separación de los espermatozoides mediante nado propio, del fluido seminal a una capa superior de medio artificial dentro de un tubo de ensayo. En este caso se colocó dentro de un tubo 1 ml de semen previamente licuado, y sobre este se agregó 1 ml de medio HAM's F-10 con 2 mM de Ca²⁺ y 5 mg/ml de BSA (i.e., HAM'S F-10 suplementado), evitando la mezcla de ambas fases. El tubo se colocó con una inclinación de 45° dentro de una gradilla y se incubó durante 1 hora en una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente las células móviles se recuperaron tomando los 750 µl superiores de la fase de medio HAM's F-10, el volumen se centrifugó a 735 xg (3,000 r.p.m. en centrifuga Eppendorf) durante 5 minutos para eliminar los factores descapacitantes y cualquier posible impureza presente en la muestra. Finalmente se ajustó la concentración de espermatozoides (10x10⁶/ml) con una cámara de Makler.

A esta concentración los espermatozoides móviles se incubaron durante 4 horas en una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂ para promover la capacitación. Al finalizar el proceso, se tomó el número de espermatozoides requeridos para cada experimento. En los ensayos de RA se utilizaron 300,000 células por condición y volúmenes finales de 20 µl.

11.2 RESULTADOS

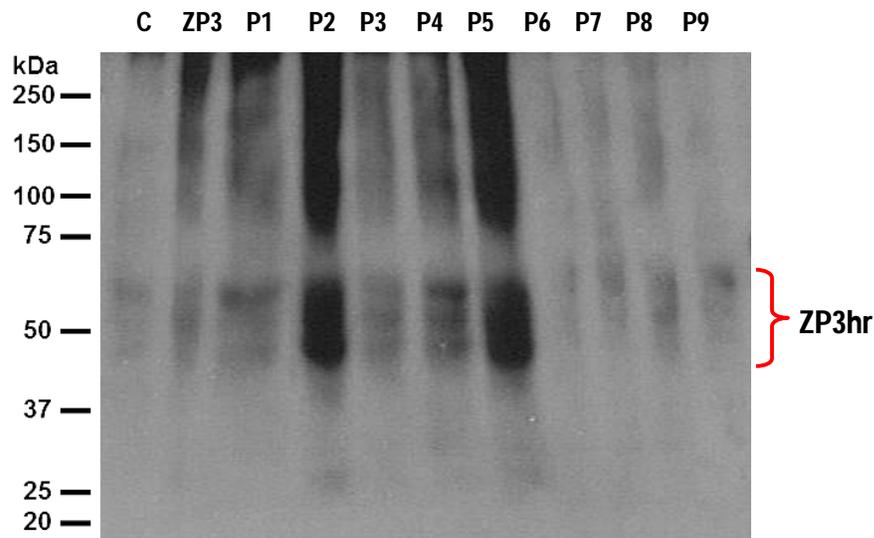


Figura suplementaria 1. Identificación de las placas que presentan la mayor cantidad de ZP3hr. Western blot de la ZP3hr producida en nueve cultivos de células *Sf9*. Cada cultivo monocapa se infectó 96 horas antes con una placa aislada de la dilución número cuatro de un ensayo en placa. La cantidad de proteína total se determinó utilizando el método de Bradford. En los carriles C (control negativo; células *Sf9* sin infectar) y P1-P9 se cargaron 5 µg de proteína total, mientras que en el carril ZP3 se cargaron 25 ng. La identificación de la proteína recombinante se realizó con el anticuerpo anti-ZP. La placa fotográfica se expuso a la membrana PVDF durante 5 segundos y el revelado se llevó a cabo con quimioluminiscencia. La llave marca las bandas correspondientes a ZP3hr, cuyos pesos esperados son ~57 y 67 kDa. Además de la proteína de interés se observa un barrido originado por las glicosilaciones de la ZP3hr, como se ha reportado en estudios previos. Las placas 2 y 5 fueron las que generaron la mayor cantidad de ZP3hr. Una vez identificadas las placas que generaron la mayor cantidad de ZP3hr, éstas se utilizaron para amplificar el volumen viral y así obtener finalmente dos concentrados virales pasaje 1 de reserva.

A)

Control/Dilución	C	D0	D1	D2	D3	D4
Promedio ± S.E.M.	1.101 ± 0.135	0.084 ± 0.085	0.089 ± 0.005	0.096 ± 0.003	0.102 ± 0.003	0.130 ± 0.008

Control/Dilución	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Promedio ± S.E.M.	0.219 ± 0.034	0.787 ± 0.099	0.733 ± 0.079	0.780 ± 0.048	0.691 ± 0.070	0.792 ± 0.115

B)

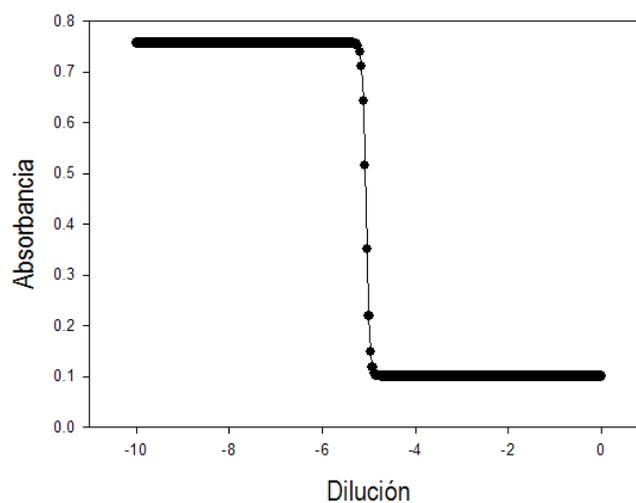


Figura suplementaria 2. Ensayo de viabilidad número 1. El procedimiento se llevó a cabo a partir del concentrado viral pasaje 3 proporcionado por el INCMNSZ. **A)** Valores promedio y errores estándar del promedio (S.E.M.) obtenidos después de leer las placas de cultivo en un lector de ELISA. **B)** Los datos en A) se ajustaron con la fórmula de una curva sigmoide de cuatro parámetros, en donde $a = 0.65$, $b = -0.038$, $x_0 = -5.057$ y $y_0 = 0.1$. Estos valores se sustituyeron en la fórmula descrita en **MATERIAL SUPLEMENTARIO/MÉTODOS/Ensayo de viabilidad** y después de hacer los cálculos correspondientes se obtuvo un título viral de 8.9×10^7 ufp/ml.

A)

Control/Dilución	C	D0	D1	D2	D3	D4
Promedio ± S.E.M.	1.398 ± 0.260	0.072 ± 0.002	0.069 ± 0.002	0.071 ± 0.002	0.074 ± 0.002	0.083 ± 0.002

Control/Dilución	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Promedio ± S.E.M.	0.103 ± 0.010	0.227 ± 0.066	0.901 ± 0.100	0.920 ± 0.051	0.900 ± 0.105	1.010 ± 0.169

B)

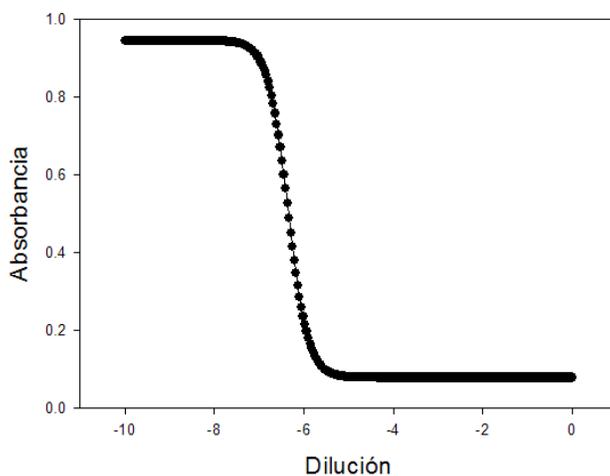


Figura suplementaria 3. Ensayo de viabilidad número 2. Este procedimiento se llevó a cabo antes de montar las infecciones de células S/9 con distintas MDI, para determinar la concentración viral con la que se obtiene la mayor concentración de ZP3hr. **A)** Valores promedio y errores estándar del promedio (S.E.M.) obtenidos después de leer las placas de cultivo en un lector de ELISA. **B)** Los datos en A) se ajustaron con la fórmula de una curva sigmoide de cuatro parámetros, en donde $a = 0.8662$, $b = -0.2241$, $x_0 = 6.3516$ y $y_0 = 0.0786$. Estos valores se sustituyeron en la fórmula descrita en **MATERIAL SUPLEMENTARIO/MÉTODOS/Ensayo de viabilidad** y después de hacer los cálculos correspondientes se obtuvo un título viral de 1.35×10^9 ufp/ml.

12 BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Darszon, T. Nishigaki, C. Wood, C. L. Trevino, R. Felix, and C. Beltran, Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology, *Int Rev Cytol* 243 (2005) 79-172.
- [2] A. Darszon, J. J. Acevedo, B. E. Galindo, E. O. Hernandez-Gonzalez, T. Nishigaki, C. L. Trevino, C. Wood, and C. Beltran, Sperm channel diversity and functional multiplicity, *Reproduction* 131 (2006) 977-988.
- [3] Y. Zhao, Q. Li, C. Yao, Z. Wang, Y. Zhou, Y. Wang, L. Liu, L. Wang, and Z. Qiao, Characterization and quantification of mRNA transcripts in ejaculated spermatozoa of fertile men by serial analysis of gene expression, *Hum Reprod* 21 (2006) 1583-1590.
- [4] C. Jimenez-Gonzalez, F. Michelangeli, C. V. Harper, C. L. Barratt, and S. J. Publicover, Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores, *Hum Reprod Update* 12 (2006) 253-267.
- [5] S. Costello, F. Michelangeli, K. Nash, L. Lefievre, J. Morris, G. Machado-Oliveira, C. Barratt, J. Kirkman-Brown, and S. Publicover, Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions, *Reproduction* 138 (2009) 425-437.
- [6] R. Yanagimachi, Mammalian fertilization, in *The physiology of reproduction*, in Press, R., (Ed.), New York, 1994, pp. 189-317.
- [7] S. S. Suarez, and R. A. Osman, Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract, *Biol Reprod* 36 (1987) 1191-1198.
- [8] H. C. Ho, and S. S. Suarez, Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation, *Reproduction* 122 (2001) 519-526.
- [9] S. S. Suarez, and H. C. Ho, Hyperactivation of mammalian sperm, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49 (2003) 351-356.
- [10] M. E. Teves, F. Barbano, H. A. Guidobaldi, R. Sanchez, W. Miska, and L. C. Giojalas, Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa, *Fertil Steril* 86 (2006) 745-749.
- [11] S. K. Gupta, S. Chakravarty, K. Suraj, P. Bansal, A. Ganguly, M. K. Jain, and B. Bhandari, Structural and functional attributes of zona pellucida glycoproteins, *Soc Reprod Fertil Suppl* 63 (2007) 203-216.
- [12] L. Lefievre, S. J. Conner, A. Salpekar, O. Olufowobi, P. Ashton, B. Pavlovic, W. Lenton, M. Afnan, I. A. Brewis, M. Monk, D. C. Hughes, and C. L. Barratt, Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human, *Hum Reprod* 19 (2004) 1580-1586.
- [13] J. M. Greve, and P. M. Wassarman, Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat, *J Mol Biol* 181 (1985) 253-264.
- [14] J. D. Bleil, and P. M. Wassarman, Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein, *Dev Biol* 95 (1983) 317-324.
- [15] J. D. Bleil, J. M. Greve, and P. M. Wassarman, Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs, *Dev Biol* 128 (1988) 376-385.
- [16] T. L. Rankin, J. S. Coleman, O. Epifano, T. Hoodbhoy, S. G. Turner, P. E. Castle, E. Lee, R. Gore-Langton, and J. Dean, Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs, *Dev Cell* 5 (2003) 33-43.
- [17] S. Chakravarty, K. Suraj, and S. K. Gupta, Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C, *Mol Hum Reprod* 11 (2005) 365-372.
- [18] P. Caballero-Campo, M. Chirinos, X. J. Fan, M. E. Gonzalez-Gonzalez, M. Galicia-Chavarria, F.

Larrea, and G. L. Gerton, Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function, *Biol Reprod* 74 (2006) 760-768.

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

[20] A. Ganguly, A. Bukovsky, R. K. Sharma, P. Bansal, B. Bhandari, and S. K. Gupta, In humans, zona pellucida glycoprotein-1 binds to spermatozoa and induces acrosomal exocytosis, *Hum Reprod* (2010).

[21] B. Baibakov, L. Gauthier, P. Talbot, T. L. Rankin, and J. Dean, Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis, *Development* 134 (2007) 933-943.

[22] P. C. Chiu, B. S. Wong, C. L. Lee, R. T. Pang, K. F. Lee, S. B. Sumitro, S. K. Gupta, and W. S. Yeung, Native human zona pellucida glycoproteins: purification and binding properties, *Hum Reprod* 23 (2008) 1385-1393.

[23] S. K. Gupta, P. Bansal, A. Ganguly, B. Bhandari, and K. Chakrabarti, Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization, *J Reprod Immunol* (2009).

[24] L. Jovine, C. C. Darie, E. S. Litscher, and P. M. Wassarman, Zona pellucida domain proteins, *Annu Rev Biochem* 74 (2005) 83-114.

[25] I. Callebaut, J. P. Mornon, and P. Monget, Isolated ZP-N domains constitute the N-terminal extensions of Zona Pellucida proteins, *Bioinformatics* 23 (2007) 1871-1874.

[26] L. Jovine, W. G. Janssen, E. S. Litscher, and P. M. Wassarman, The PLAC1-homology region of the ZP domain is sufficient for protein polymerisation, *BMC Biochem* 7 (2006) 11.

[27] M. Monne, L. Han, T. Schwend, S. Burendahl, and L. Jovine, Crystal structure of the ZP-N domain of ZP3 reveals the core fold of animal egg coats, *Nature* 456 (2008) 653-657.

[28] H. M. Florman, R. M. Tombes, N. L. First, and D. F. Babcock, An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis, *Dev Biol* 135 (1989) 133-146.

[29] C. Arnoult, Y. Zeng, and H. M. Florman, ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization, *J Cell Biol* 134 (1996) 637-645.

[30] C. Arnoult, I. G. Kazam, P. E. Visconti, G. S. Kopf, M. Villaz, and H. M. Florman, Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 6757-6762.

[31] J. Escoffier, S. Boisseau, C. Serres, C. C. Chen, D. Kim, S. Stamboulian, H. S. Shin, K. P. Campbell, M. De Waard, and C. Arnoult, Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca(V)_{3.1} and Ca(V)_{3.2} channels in sperm cells: an evaluation from Ca(V)_{3.1} and Ca(V)_{3.2} deficient mice, *J Cell Physiol* 212 (2007) 753-763.

[32] K. Fukami, M. Yoshida, T. Inoue, M. Kurokawa, R. A. Fissore, N. Yoshida, K. Mikoshiba, and T. Takenawa, Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm, *J Cell Biol* 161 (2003) 79-88.

[33] L. D. Walensky, and S. H. Snyder, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm, *J Cell Biol* 130 (1995) 857-869.

[34] C. M. O'Toole, C. Arnoult, A. Darszon, R. A. Steinhardt, and H. M. Florman, Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction, *Mol Biol Cell* 11 (2000) 1571-1584.

[35] M. K. Jungnickel, H. Marrero, L. Birnbaumer, J. R. Lemos, and H. M. Florman, Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3, *Nat Cell Biol* 3 (2001) 499-502.

[36] K. A. Sutton, M. K. Jungnickel, Y. Wang, K. Cullen, S. Lambert, and H. M. Florman, Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm, *Dev Biol* 274 (2004) 426-435.

[37] G. De Blas, M. Michaut, C. L. Trevino, C. N. Tomes, R. Yunes, A. Darszon, and L. S. Mayorga,

The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis, *J Biol Chem* 277 (2002) 49326-49331.

[38] N. Chapman, E. Kessopoulou, P. Andrews, D. Hornby, and C. R. Barratt, The polypeptide backbone of recombinant human zona pellucida glycoprotein-3 initiates acrosomal exocytosis in human spermatozoa in vitro, *Biochem J* 330 (Pt 2) (1998) 839-845.

[39] A. J. Whitmarsh, M. J. Woolnough, H. D. Moore, D. P. Hornby, and C. L. Barratt, Biological activity of recombinant human ZP3 produced in vitro: potential for a sperm function test, *Mol Hum Reprod* 2 (1996) 911-919.

[40] H. Wang, J. Liu, K. H. Cho, and D. Ren, A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein, *Biol Reprod* 81 (2009) 539-544.

[41] I. A. Brewis, R. Clayton, C. L. Barratt, D. P. Hornby, and H. D. Moore, Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa, *Mol Hum Reprod* 2 (1996) 583-589.

[42] C. Bray, J. H. Son, P. Kumar, J. D. Harris, and S. Meizel, A role for the human sperm glycine receptor/Cl(-) channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3, *Biol Reprod* 66 (2002) 91-97.

[43] M. van Duin, J. E. Polman, I. T. De Breet, K. van Ginneken, H. Bunschoten, A. Grootenhuis, J. Brindle, and R. J. Aitken, Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion, *Biol Reprod* 51 (1994) 607-617.

[44] K. W. Dong, T. F. Chi, Y. W. Juan, C. W. Chen, Z. Lin, X. Q. Xiang, M. Mahony, W. E. Gibbons, and S. Oehninger, Characterization of the biologic activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 expressed in human ovarian teratocarcinoma (PA-1) cells, *Am J Obstet Gynecol* 184 (2001) 835-843; discussion 843-834.

[45] M. Martic, E. K. Moses, T. E. Adams, D. Y. Liu, D. A. Gook, C. Garrett, M. E. Dunlop, and G. H. Baker, Recombinant human zona pellucida proteins ZP1, ZP2 and ZP3 co-expressed in a human cell line, *Asian J Androl* 6 (2004) 3-13.

[46] M. E. González-González, in *Biología experimental*, 2007 p. 70 Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.

[47] S. Chakravarty, S. Kadunganattil, P. Bansal, R. K. Sharma, and S. K. Gupta, Relevance of glycosylation of human zona pellucida glycoproteins for their binding to capacitated human spermatozoa and subsequent induction of acrosomal exocytosis, *Mol Reprod Dev* 75 (2008) 75-88.

[48] L. Lacinova, Voltage-dependent calcium channels, *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1 (2005) 1-78.

[49] R. W. Tsien, D. Lipscombe, D. Madison, K. Bley, and A. Fox, Reflections on Ca(2+)-channel diversity, 1988-1994, *Trends Neurosci* 18 (1995) 52-54.

[50] T. P. Snutch, J. P. Leonard, M. M. Gilbert, H. A. Lester, and N. Davidson, Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 3391-3395.

[51] L. Birnbaumer, K. P. Campbell, W. A. Catterall, M. M. Harpold, F. Hofmann, W. A. Horne, Y. Mori, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, and et al., The naming of voltage-gated calcium channels, *Neuron* 13 (1994) 505-506.

[52] E. A. Ertel, K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien, and W. A. Catterall, Nomenclature of voltage-gated calcium channels, *Neuron* 25 (2000) 533-535.

[53] W. A. Catterall, E. Perez-Reyes, T. P. Snutch, and J. Striessnig, International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels, *Pharmacol Rev* 57 (2005) 411-425.

[54] W. A. Catterall, Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels, *Annu Rev Cell Dev Biol* 16 (2000) 521-555.

- [55] C. J. Doering, and G. W. Zamponi, Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels, *J Bioenerg Biomembr* 35 (2003) 491-505.
- [56] J. Striessnig, B. J. Murphy, and W. A. Catterall, Dihydropyridine receptor of L-type Ca²⁺ channels: identification of binding domains for [3H](+)-PN200-110 and [3H]azidopine within the alpha 1 subunit, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 10769-10773.
- [57] H. Ito, N. Klugbauer, and F. Hofmann, Transfer of the high affinity dihydropyridine sensitivity from L-type to non-L-type calcium channel, *Mol Pharmacol* 52 (1997) 735-740.
- [58] E. Wappl, J. Mitterdorfer, H. Glossmann, and J. Striessnig, Mechanism of dihydropyridine interaction with critical binding residues of L-type Ca²⁺ channel alpha 1 subunits, *J Biol Chem* 276 (2001) 12730-12735.
- [59] S. Yamaguchi, Y. Okamura, T. Nagao, and S. Adachi-Akahane, Serine residue in the III5-S6 linker of the L-type Ca²⁺ channel alpha 1C subunit is the critical determinant of the action of dihydropyridine Ca²⁺ channel agonists, *J Biol Chem* 275 (2000) 41504-41511.
- [60] M. J. Sinnegger, Z. Wang, M. Grabner, S. Hering, J. Striessnig, H. Glossmann, and J. Mitterdorfer, Nine L-type amino acid residues confer full 1,4-dihydropyridine sensitivity to the neuronal calcium channel alpha1A subunit. Role of L-type Met1188, *J Biol Chem* 272 (1997) 27686-27693.
- [61] T. Watanabe, H. Kalasz, H. Yabana, A. Kuniyasu, J. Mershon, K. Itagaki, P. L. Vaghy, K. Naito, H. Nakayama, and A. Schwartz, Azidobutyryl clemizem, a new photoactivatable diltiazem analog, labels benzothiazepine binding sites in the alpha 1 subunit of the skeletal muscle calcium channel, *FEBS Lett* 334 (1993) 261-264.
- [62] R. Kraus, B. Reichl, S. D. Kimball, M. Grabner, B. J. Murphy, W. A. Catterall, and J. Striessnig, Identification of benz(othiazepine)-binding regions within L-type calcium channel alpha1 subunits, *J Biol Chem* 271 (1996) 20113-20118.
- [63] G. P. Miljanich, and J. Ramachandran, Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35 (1995) 707-734.
- [64] B. M. Olivera, G. P. Miljanich, J. Ramachandran, and M. E. Adams, Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins, *Annu Rev Biochem* 63 (1994) 823-867.
- [65] E. R. Benjamin, F. Pruthi, S. Olanrewaju, S. Shan, D. Hanway, X. Liu, R. Cerne, D. Lavery, K. J. Valenzano, R. M. Woodward, and V. I. Ilyin, Pharmacological characterization of recombinant N-type calcium channel (Cav2.2) mediated calcium mobilization using FLIPR, *Biochem Pharmacol* 72 (2006) 770-782.
- [66] I. M. Mintz, V. J. Venema, K. M. Swiderek, T. D. Lee, B. P. Bean, and M. E. Adams, P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA, *Nature* 355 (1992) 827-829.
- [67] R. Newcomb, B. Szoke, A. Palma, G. Wang, X. Chen, W. Hopkins, R. Cong, J. Miller, L. Urge, K. Tarczy-Hornoch, J. A. Loo, D. J. Dooley, L. Nadasdi, R. W. Tsien, J. Lemos, and G. Miljanich, Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*, *Biochemistry* 37 (1998) 15353-15362.
- [68] S. I. McDonough, I. M. Mintz, and B. P. Bean, Alteration of P-type calcium channel gating by the spider toxin omega-Aga-IVA, *Biophys J* 72 (1997) 2117-2128.
- [69] E. Bourinet, S. C. Stotz, R. L. Spaetgens, G. Dayanithi, J. Lemos, J. Nargeot, and G. W. Zamponi, Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) calcium channels, *Biophys J* 81 (2001) 79-88.
- [70] J. H. Lee, J. C. Gomora, L. L. Cribbs, and E. Perez-Reyes, Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H, *Biophys J* 77 (1999) 3034-3042.
- [71] R. S. Chuang, H. Jaffe, L. Cribbs, E. Perez-Reyes, and K. J. Swartz, Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin, *Nat Neurosci* 1 (1998) 668-674.

- [72] S. S. Sidach, and I. M. Mintz, Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels, *J Neurosci* 22 (2002) 2023-2034.
- [73] A. Darszon, P. Labarca, T. Nishigaki, and F. Espinosa, Ion channels in sperm physiology, *Physiol Rev* 79 (1999) 481-510.
- [74] C. Arnoult, R. A. Cardullo, J. R. Lemos, and H. M. Florman, Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 13004-13009.
- [75] C. L. Trevino, R. Felix, L. E. Castellano, C. Gutierrez, D. Rodriguez, J. Pacheco, I. Lopez-Gonzalez, J. C. Gomora, V. Tsutsumi, A. Hernandez-Cruz, T. Fiordeliso, A. L. Scaling, and A. Darszon, Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca(2+) channels in mammalian male germ cells and sperm, *FEBS Lett* 563 (2004) 87-92.
- [76] C. C. Chen, K. G. Lamping, D. W. Nuno, R. Barresi, S. J. Prouty, J. L. Lavoie, L. L. Cribbs, S. K. England, C. D. Sigmund, R. M. Weiss, R. A. Williamson, J. A. Hill, and K. P. Campbell, Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels, *Science* 302 (2003) 1416-1418.
- [77] S. Stamboulian, D. Kim, H. S. Shin, M. Ronjat, M. De Waard, and C. Arnoult, Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3.1 (alpha1G) calcium channel: CaV3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells, *J Cell Physiol* 200 (2004) 116-124.
- [78] G. Wennemuth, R. E. Westenbroek, T. Xu, B. Hille, and D. F. Babcock, CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm, *J Biol Chem* 275 (2000) 21210-21217.
- [79] A. Brandelli, P. V. Miranda, and J. G. Tezon, Voltage-dependent calcium channels and Gi regulatory protein mediate the human sperm acrosomal exocytosis induced by N-acetylglucosaminyl/mannosyl neoglycoproteins, *J Androl* 17 (1996) 522-529.
- [80] P. F. Blackmore, and S. Eisoldt, The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-type calcium channels in human spermatozoa, *Mol Hum Reprod* 5 (1999) 498-506.
- [81] O. Jose, O. Hernandez-Hernandez, M. Chirinos, M. E. Gonzalez-Gonzalez, F. Larrea, A. Almanza, R. Felix, A. Darszon, and C. L. Trevino, Recombinant human ZP3-induced sperm acrosome reaction: evidence for the involvement of T- and L-type voltage-gated calcium channels, *Biochem Biophys Res Commun* 395 (2010) 530-534.
- [82] B. Navarro, Y. Kirichok, J. J. Chung, and D. E. Clapham, Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa, *Int J Dev Biol* 52 (2008) 607-613.
- [83] A. E. Carlson, R. E. Westenbroek, T. Quill, D. Ren, D. E. Clapham, B. Hille, D. L. Garbers, and D. F. Babcock, CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 14864-14868.
- [84] J. Xia, and D. Ren, Egg Coat Proteins Activate Calcium Entry into Mouse Sperm via CATSPER Channels, *Biol Reprod* 80 (2009) 1092-1098.
- [85] Q. H. Gibson, and L. Milnes, Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry, *Biochem J* 91 (1964) 161-171.
- [86] T. Nishigaki, F. Z. Zamudio, L. D. Possani, and A. Darszon, Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry, *Biochem Biophys Res Commun* 284 (2001) 531-535.
- [87] M. Matsumoto, J. Solzin, A. Helbig, V. Hagen, S. Ueno, O. Kawase, Y. Maruyama, M. Ogiso, M. Godde, H. Minakata, U. B. Kaupp, M. Hoshi, and I. Weyand, A sperm-activating peptide controls a cGMP-signaling pathway in starfish sperm, *Dev Biol* 260 (2003) 314-324.
- [88] F. Kilic, N. D. Kashikar, R. Schmidt, L. Alvarez, L. Dai, I. Weyand, B. Wiesner, N. Goodwin, V. Hagen, and U. B. Kaupp, Caged progesterone: a new tool for studying rapid nongenomic actions of

- progesterone, *J Am Chem Soc* 131 (2009) 4027-4030.
- [89] WHO, WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th ed., Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press, Cambridge, U. K. ; New York, N. Y. 1999.
- [90] J. R. de Weille, H. Schweitz, P. Maes, A. Tartar, and M. Lazdunski, Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 2437-2440.
- [91] H. Glossmann, and J. Striessnig, Calcium channels, *Vitam Horm* 44 (1988) 155-328.
- [92] D. J. Triggle, and R. A. Janis, Calcium channel ligands, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 27 (1987) 347-369.
- [93] W. Xu, and D. Lipscombe, Neuronal Ca_v1.3 α (1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines, *J Neurosci* 21 (2001) 5944-5951.
- [94] C. Arnoult, M. Villaz, and H. M. Florman, Pharmacological properties of the T-type Ca²⁺ current of mouse spermatogenic cells, *Mol Pharmacol* 53 (1998) 1104-1111.
- [95] T. N. Heady, J. C. Gomora, T. L. Macdonald, and E. Perez-Reyes, Molecular pharmacology of T-type Ca²⁺ channels, *Jpn J Pharmacol* 85 (2001) 339-350.
- [96] J. Y. Park, H. J. Ahn, J. G. Gu, K. H. Lee, J. S. Kim, H. W. Kang, and J. H. Lee, Molecular identification of Ca²⁺ channels in human sperm, *Exp Mol Med* 35 (2003) 285-292.
- [97] A. Darszon, P. Lopez-Martinez, J. J. Acevedo, A. Hernandez-Cruz, and C. L. Trevino, T-type Ca²⁺ channels in sperm function, *Cell Calcium* 40 (2006) 241-252.
- [98] M. R. Servín, in *IBT*, 2008 p. 55 UNAM, México, D. F.
- [99] C. Patrat, J. Auer, P. Fauque, R. L. Leandri, P. Jouannet, and C. Serres, Zona pellucida from fertilised human oocytes induces a voltage-dependent calcium influx and the acrosome reaction in spermatozoa, but cannot be penetrated by sperm, *BMC Dev Biol* 6 (2006) 59.
- [100] B. Bhandari, P. Bansal, P. Talwar, and S. K. Gupta, Delineation of downstream signalling components during acrosome reaction mediated by heat solubilized human zona pellucida, *Reprod Biol Endocrinol* 8 7.
- [101] J. A. Mena, O. T. Ramirez, and L. A. Palomares, Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay, *Biotechniques* 34 (2003) 260-262, 264.
- [102] A. Makler, O. Murillo, G. Huszar, B. Tarlatzis, A. DeCherney, and F. Naftolin, Improved techniques for collecting motile spermatozoa from human semen. I. A self-migratory method, *Int J Androl* 7 (1984) 61-70.

APÉNDICE



Recombinant human ZP3-induced sperm acrosome reaction: Evidence for the involvement of T- and L-type voltage-gated calcium channels

Omar José^a, Oscar Hernández-Hernández^b, Mayel Chirinos^c, María Elena González-González^c, Fernando Larrea^c, Angélica Almanza^{b,d}, Ricardo Felix^b, Alberto Darszon^a, Claudia L. Treviño^{a,*}

^a Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Mexico

^b Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, México DF, Mexico

^c Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México DF, Mexico

^d Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 March 2010

Available online 13 April 2010

Keywords:

Acrosome reaction

Ca_v channels

Recombinant human ZP3

ABSTRACT

For successful fertilization mammalian spermatozoa must undergo the acrosome reaction (AR), an exocytotic event that allows this cell to penetrate the outer layer of the oocyte, the zona pellucida (ZP). Four glycoproteins (ZP1–ZP4) compose the human ZP, being ZP3 the physiological inducer of the AR. This process requires changes in intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) involving not fully understood mechanisms. Even in mouse sperm, the pharmacologically documented participation of voltage-gated Ca²⁺ (Ca_v) channels and store-operated channels (SOCs) in the ZP-induced AR is being debated. The situation in human sperm is even less clear due to the limited availability of human ZP. Here, we used recombinant human ZP3 (rhZP3) produced in baculovirus-infected Sf9 cells to investigate the involvement of Ca_v channels in the human sperm AR. Our findings showed that Ni²⁺ and mibefradil at concentrations that block T-type or Ca_v3 channels, and nimodipine and diltiazem that block L-type or Ca_v1 channels, significantly inhibited the rhZP3-initiated AR. On the other hand, the AR was insensitive to concentrations of ω-Agatoxin IVA, ω-Conotoxin GVIA and SNX-482 that block P/Q, N and R-type channels, respectively (Ca_v2 channels). Our overall findings suggest that Ca_v1 and Ca_v3 channels participate in human sperm AR. Consistent with this, we detected in human sperm transcripts for the Ca_v1 auxiliary subunits, α₂δ, β₁, β₂ and β₄, but not the neuronal specific isoforms β₃ and γ₂.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The influx of extracellular Ca²⁺ into sperm through specific channels in the plasma membrane is a necessary early event for acrosome reaction (AR) in mammals. Immunolocalization and pharmacological approaches have suggested the involvement of voltage-gated Ca²⁺ (Ca_v) channels during the AR [1]. The Ca_v channel family consists of three subfamilies: Ca_v1 and Ca_v2 encode high voltage activated channels (HVA) constituted by seven different genes coding for L, P/Q, N and R currents, Ca_v3 encode low voltage activated channels (LVA, or T-type Ca²⁺ channels) with three different genes. Much of our current understanding of the functional roles played by Ca_v channels in the AR has been obtained using the mouse as a model system [1]. Less is known about the human

sperm AR and growing evidence indicates that there are significant differences between these two species.

Previous studies have provided strong evidence indicating that the egg zona pellucida (ZP) is the physiological inducer of sperm AR [2]. The ZP is composed of a matrix of glycoproteins surrounding the egg. While mouse ZP contains three glycoproteins, human ZP contains four (ZP1–ZP4) and the glycosylation pattern of these proteins seems to be important for their biological activity [2]. In particular, ZP3 induces a [Ca²⁺]_i signal that triggers mouse sperm AR. Its initial component is a transient [Ca²⁺]_i increase with kinetics and pharmacology consistent to those of T-currents from mouse spermatogenic cells and the sperm AR [3]. This initial Ca²⁺ entry is followed by a second sustained Ca²⁺ influx mediated primarily by store-operated channels (SOCs) [1].

Progress in elucidating the molecular mechanisms involved in human sperm AR have been greatly halted by the scarcity of biological material available for experimental research. Therefore, diverse substances including progesterone (P₄) have been used to induce the human sperm AR. Micromolar concentrations of P₄ induce a transient elevation of sperm [Ca²⁺]_i that reflects an influx of extracellular Ca²⁺, which is sensitive to inhibitors of Ca_v

* Corresponding author. Address: Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Avenida Universidad #2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Mor., Mexico. Fax: +5 273 17 23 88.

E-mail address: ctrevino@ibt.unam.mx (C.L. Treviño).

channels [4]. After the initial response, a second, sustained elevation of $[Ca^{2+}]_i$ occurs and the AR is induced. Instead, exposure of sperm to an increasing P_4 gradient induces a slow $[Ca^{2+}]_i$ rise with superimposed oscillations. These oscillations do not induce the AR, but modulate flagellar activity promoting motility that persists even in the absence of Ca^{2+} , suggesting mobilization of this ion from internal stores [4].

In contrast, there is limited information about the ZP-induced AR in human sperm. A few studies have been performed either using ZP proteins isolated from human eggs obtained *post mortem*, or ZP purified from discarded oocytes originally destined for *in vitro* fertilization procedures [5]. Studies with individually purified ZP proteins are even scarcer, in particular with ZP4, which does not have a counterpart in mouse sperm. Recently, the participation of Ca_v1 and Ca_v3 channels in response to purified native ZP3 and ZP4 from remnants of *in vitro* fertilization oocytes was reported in the human sperm AR [6]. However, in that study only a limited pharmacological analysis was done due to the restricted availability of ZP3 and ZP4. Although the glycosylation profile of recombinant human ZP proteins is not identical to that of the native proteins, they are an alternative tool to study the ZP-induced AR [7,8]. Recombinant proteins may help to unravel the involvement of Ca_v channels in the ZP-induced AR in human sperm. Herein, we have used recombinant human ZP3 (rhZP3) expressed in baculovirus-infected Sf9 cells to characterize the Ca_v channels involved in the AR of human capacitated sperm. We also report for the first time that L-type auxiliary subunits are expressed in human sperm.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Bovine serum albumin (BSA), A23187, Ham's F-10 media, fluorescein isothiocyanate-*Pisum sativum* agglutinin (FITC-PSA), diltiazem, verapamil and SNX-482 were purchased from Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Nimodipine, calciseptine, ω -Conotoxin GVIA and nifedipine were from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). ω -Agatoxin IVA was from EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Germany). Mibefradil and human brain cDNA were generous gifts from Drs. J.C. Gomora (IFC, UNAM, México) and R. Gutiérrez (Cinvestav-IPN, México), respectively. All other chemicals were of reagent grade.

2.2. Ejaculates and sperm swim-up preparation

Human sperm were obtained from healthy donors who authorized the use of their semen and fulfilled the parameters established by the World Health Organization [9]. After liquefaction, 1 ml of Ham's F-10 culture medium was applied above 1 ml of semen and sperm were allowed to swim up for 1 h at 5% CO_2 –95% air into the upper layer of the medium, which was then separated and the concentration adjusted to 1×10^7 cells/ml.

2.3. Sperm capacitation and induction of AR

For *in vitro* capacitation, motile sperm recovered by swim up were centrifuged and resuspended in capacitating medium (Ham's F-10 nutrient mixture plus 5 mg/ml BSA and 2 mM Ca^{2+} , pH 7.4) and incubated at 37 °C in a 5% CO_2 –95% air humidified atmosphere for 4 h. Acrosome reaction was achieved after 30 min treatment with the inducer (rhZP2, rhZP3 or rhZP4; 10 ng/ μ l), with or without previous 15 min incubation in the presence of inhibitors. Sperm were washed and aliquots were smeared onto glass slides, air-dried and fixed with cold 100% methanol for 15 min at room

temperature. Parallel incubations were performed in the absence of any inducer and with Ca^{2+} ionophore A23187 10 μ M, as negative and positive controls of the assay, respectively. For AR evaluation, staining with FITC-PSA was performed as reported previously [10]. Briefly, samples were incubated with FITC-PSA (25 μ g/ml in PBS, pH 7.4) for 30 min at room temperature and rinsed once with distilled water. At least 200 sperm per condition were catalogued according to their acrosomal fluorescence pattern under the fluorescence microscope (Zeiss Axioskop, excitation filter 450–490 nm, emission filter 520 nm). The spontaneous AR (mean value of $2.64 \pm 1.02\%$, $n = 9$) was subtracted from raw values for each set of experiments and expressed as percentage of acrosome reacted sperm.

2.4. Expression and purification of recombinant human ZP glycoproteins

Recombinant human ZP2, ZP3 and ZP4 proteins were expressed in the *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect ovary cell line using the baculovirus expression system as described elsewhere [7]. The proteins were purified and their integrity was analyzed by Western blot with a rabbit anti-heat-solubilized ZP serum that cross-reacts with human ZP.

2.5. Ribonucleic acid (RNA) extraction and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from swim-up separated sperm using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and cDNA was synthesized using the Superscript first strand synthesis system (Invitrogen) for RT-PCR. Primers were designed for each channel auxiliary subunit based on coding sequences. A housekeeping gene, GAPDH, was used as an internal control. The primers and the predicted sizes of the fragments are given in Supplementary Table 1. The PCR profile was 40 cycles of amplification (94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 30 s) and a final extension at 72 °C for 3 min. The PCR products were separated on agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized in a UVP-TM12 transilluminator (UVP, Upland, CA). Identity of amplified fragments was confirmed by DNA sequencing.

2.6. Statistical analysis

Independent experiments were performed using samples from at least five different semen donors. Data processing was done using the KyPlot 2.0 program (Qualest, Japan). In all cases, differences between raw experimental and control data were tested by unpaired Student's *t*-Tests. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

Initially, we tested the ability of the purified rhZP2, ZP3 and ZP4 to induce human sperm AR. Both rhZP3 (10 ng/ μ l) or rhZP4 (10 ng/ μ l) were able to significantly induce AR in capacitated sperm, compared with control condition (Fig. 1). Unexpectedly, although to a lesser extent, both proteins also induced AR in non-capacitated sperm. As anticipated, there was no significant induction of AR in capacitated or non-capacitated sperm with rhZP2 (10 ng/ μ l). The Ca^{2+} ionophore A23187 (10 μ M) was used as a positive control, for both capacitated and non-capacitated cells. The raw mean value of AR obtained with A23187 was $42.54 \pm 1.16\%$, $n = 9$. These data corroborated that recombinant ZP glycoproteins produced in baculovirus-infected Sf9 cells retained their biological activity as previously reported [7], and that induction of AR by rhZP3 and rhZP4 was more efficient in capacitated sperm.

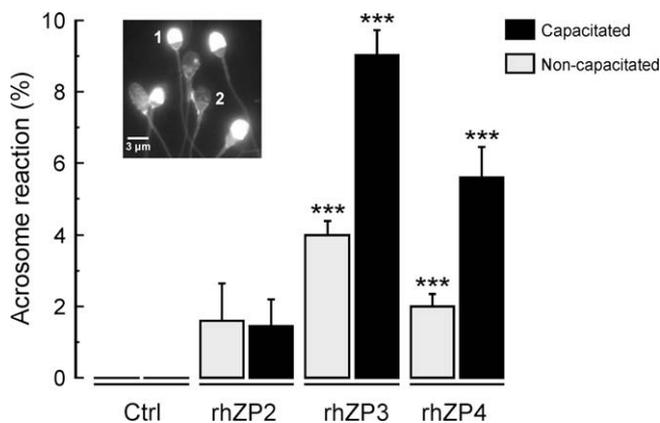


Fig. 1. rhZP3 and rhZP4 induce the AR in human sperm. Capacitated and non-capacitated sperm were incubated in the presence of rhZP2, rhZP3, rhZP4 (10 ng/ μ l) or in buffer alone as control. The acrosomal status was evaluated as described under Materials and methods. Both, rhZP3 and rhZP4 induced significantly the AR in capacitated and non-capacitated sperm and the highest values were obtained with capacitated sperm exposed to rhZP3. The percentages of AR obtained with rhZP2 were not statistically different from control conditions. The data represent means \pm SEM of six experiments. *** $P < 0.001$ vs. corresponding negative control. Inset: fluorescence microscopy image of FITC-PSA stained sperm after exposure to rhZP3. Intact cells present a fluorescent acrosome (1) while acrosome reacted cells have no fluorescence or fluorescence only around the equatorial segment (2).

As the involvement of Ca_v channels on rhZP-induced AR in human sperm remains controversial, and members of each subfamily have been immunolocalized in human sperm, inhibitors for the three Ca_v subfamilies (see Supplementary Table 2) were tested. We focused our efforts on rhZP3 actions as it is the most potent biological AR inducer.

The first set of experiments examined the effect of blockers for Ca_v3 subfamily. Different Ni^{2+} concentrations can distinguish between Ca_v3 isoforms. $\text{Ca}_v3.2$ is the most Ni^{2+} -sensitive isoform ($\text{IC}_{50} \sim 13 \mu\text{M}$), whereas $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.3$ are less sensitive with $\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$ [11]. Fig. 2A shows that Ni^{2+} inhibits the rhZP3-induced AR in a dose-dependent manner, with an estimated IC_{50} of $23 \pm 10 \mu\text{M}$. These data are consistent with the involvement of $\text{Ca}_v3.2$ channels in the ZP3-evoked AR [12]. We also tested mibefradil and nifedipine as Ca_v3 inhibitors, though it is worth noting

that they can also block Ca_v1 channels, depending on the concentration used [13,14]. Using three times the reported IC_{50} for Ca_v3 channels [11,15], mibefradil (15 μM) and nifedipine (1.2 μM) inhibited the AR by 65% and 60%, respectively (Fig. 2B).

Different studies support the presence of Ca_v1 channels in human sperm [16–18]. Therefore, we next used four selective Ca_v1 antagonists (diltiazem, calciseptine, nimodipine and verapamil). Except for verapamil, the doses used were equal to threefold the IC_{50} to ensure maximal inhibition. As shown in Fig. 3A, the AR was inhibited by 30 μM diltiazem, 3 μM calciseptine and 3 μM nimodipine. Unexpectedly, 10 and 80 μM verapamil did not inhibit the AR, even though the activity of the compound used in AR experiments was verified blocking L-type currents in the clonal pituitary GH₃ cell line (Supplementary Fig. 1). The verapamil AR insensitivity could be explained by the differential expression of Ca_v subunits in human sperm.

Using RT-PCR and RNase protection assays, Park and colleagues [18] detected the expression of $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v2.2$, $\text{Ca}_v2.3$, $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ and $\text{Ca}_v3.3$ subunits in human sperm. However, these authors did not investigate the expression of mRNAs for auxiliary subunits. Therefore, the expression of the mRNA coding the $\alpha_2\delta$, β and γ auxiliary subunits in human sperm was herein explored. On the basis of reported sequences, three sets of PCR primers were designed: (1) for $\alpha_2\delta-1$, (2) for γ_2 and (3) for all β subunits (Supplementary Table 1). These primers amplified products of the appropriate size from human sperm and human brain cDNA used as a positive control (Fig. 3B, left panel). As expected, no amplification of the neuronal γ_2 subunit (used as negative control) was found in human sperm. Though the band intensities amplified from sperm were generally weaker than those from brain, we detected bands with primers for $\alpha_2\delta-1$ and β_{1-4} (primers target the four isoforms). We next examined the expression of the individual members of the β subfamily in human sperm by RT-PCR using four sets of specific primers (Supplementary Table 1). Specific bands for β_1 , β_2 and β_4 but not β_3 were detected (Fig. 3B, right panel).

Lastly, the Ca_v2 family has not been clearly implicated in mouse AR; however, at least one member of this family, namely $\text{Ca}_v2.3$ was immunolocalized in human sperm [1]. Therefore in this last set of experiments we used ω -Agatoxin IVA, ω -Conotoxin GVIA and SNX-482, three specific antagonists of $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$ and $\text{Ca}_v2.3$ channels, respectively. Fig. 4 shows that human AR was basically insensitive to all three toxins, and though addition of

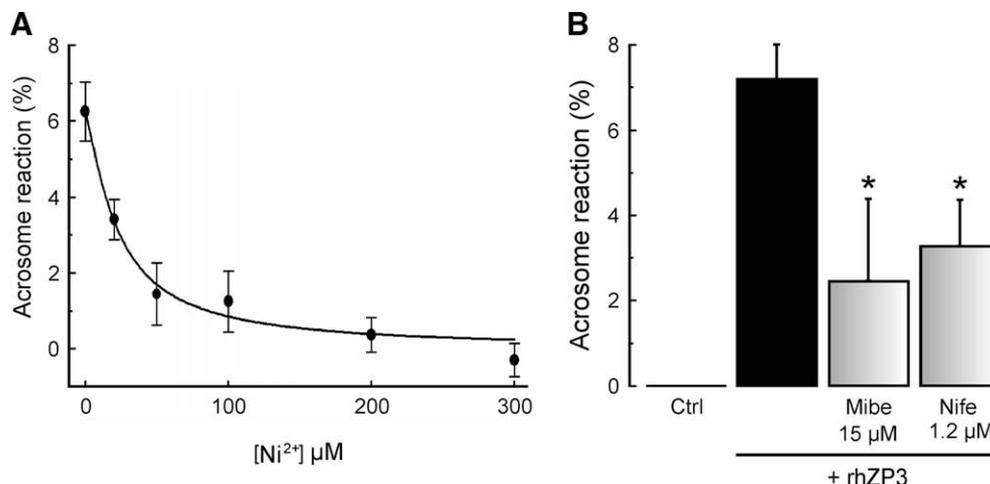


Fig. 2. rhZP3-induced AR is inhibited by Ca_v3 channel antagonists. (A) Nickel (Ni^{2+}) inhibits in a dose-dependent manner the rhZP3-induced AR. Capacitated sperm were incubated in the presence of increasing concentrations of Ni^{2+} or in buffer alone as control. The AR was induced with rhZP3 (10 ng/ μ l) and the acrosomal status was determined as described under Materials and methods. The decreasing percentages of the dose-response curve were fitted with the Hill equation to obtain the IC_{50} , which estimated value was $23 \pm 10 \mu\text{M}$. (B) Mibefradil and nifedipine inhibit the rhZP3-induced AR. Capacitated sperm were preincubated (15 min) either with buffer alone, mibefradil (15 μM) or nifedipine (1.2 μM). AR was initiated by adding rhZP3 (10 ng/ μ l) and acrosomal status was evaluated. The data in A and B represent means \pm SEM of six and five experiments, respectively. $P < 0.05$ vs. rhZP3 alone.

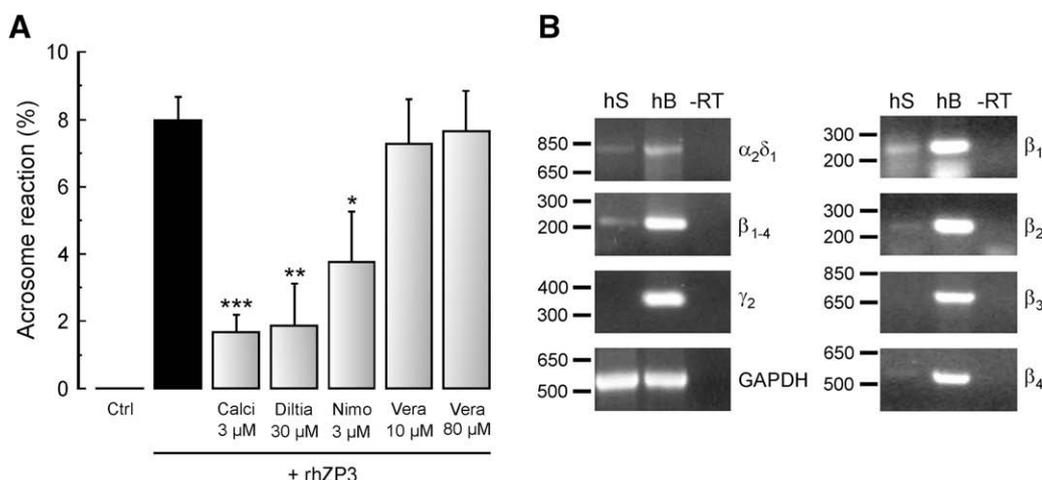


Fig. 3. rhZP3-induced AR is inhibited by Ca_v1 channel antagonists and auxiliary subunits for Ca_v1 channels are present in human sperm. (A) Capacitated sperm were preincubated in the presence of calciseptine (Calci), diltiazem (Diltia), nimodipine (Nimo) and verapamil (Vera) at the indicated concentrations or with buffer alone. The AR was initiated by adding rhZP3 (10 ng/ μ l) to each condition and acrosomal status was evaluated. The presence of calciseptine, diltiazem and nimodipine showed a significant decrease of AR compared with rhZP3 alone, but no difference was observed with verapamil. The data represent means \pm SEM, from four to five experiments. * $P < 0.05$ vs. rhZP3 alone. (B) Left. Primers for $\alpha_2\delta_1$, β_{1-4} and γ_2 were used in human sperm (hS) or brain (hB) cDNA. Fragments were amplified in all cases in brain samples, $\alpha_2\delta_1$ and β_{1-4} were detected in sperm but not the neuronal specific γ_2 . As positive control the amplification of GAPDH is shown and the negative control was the cDNA reaction without reverse transcriptase (-RT). Right. Specific primers for each β subunit were used with human sperm (hS) and brain (hB) cDNA. All four subunits were detected in brain and β_1 , β_2 and β_4 were found in sperm. Molecular weight markers (base pair) are indicated to the left of each panel.

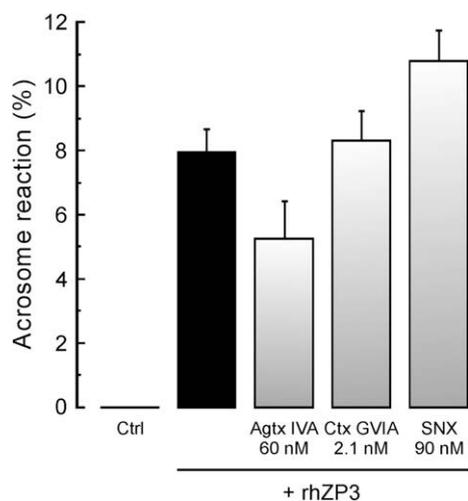


Fig. 4. rhZP3-induced AR is not affected by Ca_v2 channel antagonists. Capacitated sperm were preincubated in the presence of specific inhibitors for each member of the Ca_v2 subfamily: ω -Agatoxin IVA (Agtx IVA), ω -Conotoxin GVIA (Ctx GVIA) or SNX-482 (SNX) at the indicated concentrations or in buffer alone as control. The AR was initiated by adding rhZP3 (10 ng/ μ l) to each condition and acrosomal status was evaluated. Neither of the toxins produced statistically significant differences compared with rhZP3 alone. The data represent means \pm SEM of four experiments.

ω -Agatoxin IVA caused a minor decrease on AR, it was not statistically significant.

Given that Ca^{2+} entry through store-operated channels (SOCs) also regulates mouse sperm AR, we tested SKF96365 (SKF), an inhibitor of SOCs, in rhZP3-induced AR. We found that SKF96365 (20 μ M) effectively inhibited acrosomal loss, suggesting a role of SOCs in the regulation of Ca^{2+} signaling during human sperm AR induced by rhZP3 (Supplementary Fig. 2).

4. Discussion

The scarcity of native ZP has halted the understanding of physiologically induced AR. Our findings illustrate the pertinence of using recombinant proteins. The quantities and rapid production

of these proteins allow the performance of a variety of studies and pharmacological screenings.

As mentioned earlier, Ca_v channels appear to play a major role in mouse sperm. The Ca_v3 subfamily is composed by $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ and $\text{Ca}_v3.3$ [19] subunits. In particular, $\text{Ca}_v3.2$ has been described as essential for AR [4,20,21]. However, this generally accepted view was challenged by the development of $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ null mice [22]. Though Ca^{2+} currents were abolished in spermatogenic cells from $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice, and Ca^{2+} imaging experiments revealed that Ca^{2+} influx in response to KCl was reduced in sperm, no differences were observed in the Ca^{2+} signaling induced by ZP. Likewise, the reproduction parameters were not altered in either $\text{Ca}_v3.1$ or $\text{Ca}_v3.2$ knock-out mice. Double knock-out mice are required to clarify the possibility of compensation.

The pharmacological profile with Ca_v3 antagonists was similar to that obtained recently using purified native human ZP3 and ZP4 glycoproteins [6]. The overall results suggested the participation of Ca_v3 channels in ZP-induced AR. However, we still cannot rule out the possibility that other Ca^{2+} channels or a combination of them may also contribute to the AR.

Regarding the Ca_v1 subfamily, three out of four specific blockers for these channels inhibited the rhZP3-induced AR, strongly suggesting the involvement of these channels in this process. Our observation of the verapamil insensitivity of rhZP3-induced AR is consistent with a previous report in which recombinant ZP3 induction of AR was sensitive to pimozide but not to verapamil [23]. The lack of effectiveness of verapamil to block the AR might be explained by the expression of splice variant(s) of Ca_v1 channels with atypical pharmacological properties. Indeed, it has been proposed that the reported tissue selectivity of various Ca_v channel blockers, including verapamil, is determined by three main factors: the membrane potential, the Ca_v subunit and the type of co-expressed auxiliary subunit [24]. In this regard, molecular studies have shown that Ca_v1 channels consist of four subunits. Electrophysiological and pharmacological properties are defined primarily by the ion-conducting α_1 subunit. However, the auxiliary subunits ($\alpha_2\delta$, β and γ) modulate the trafficking as well as the biophysical and pharmacological properties of the α_1 subunit. Interestingly, there is evidence suggesting that the β auxiliary subunit modify not only the electrophysiological properties of the Ca_v1 channel

but also its interaction with channel blockers including phenylalkylamines (PAA). In particular, it has been shown that the β_3 subunit increased the efficiency of the verapamil block [25], while the β_2 subunit decreased the use-dependent block of Ca_v1 channels caused by the related PAA gallopamil [26]. Taken together, our data agree with the proposal that the lack of verapamil blocking effect on the AR might be due to the presence of an enriched proportion of Ca_v1 channels containing the β_2 subunit in the plasma membrane of human sperm. Further studies are needed to strengthen this proposal. The results using Ca_v2 blockers suggest that this family of channels does not play a significant role during rhZP3-induced AR.

In conclusion, our studies advance our understanding of the Ca_v channel diversity in human sperm and provide a solid groundwork for functional analysis of the Ca_v channel contribution to ZP3-induced AR. It appears that several types of voltage-dependent Ca^{2+} channels as well as SOC channels are activated during the AR. The use of recombinant proteins may allow crucial investigations of molecules involved in human sperm–zona interaction process. It will be interesting to compare the pharmacology of the ZP4 induced AR with the ZP3-induced AR to elucidate the participation of Ca_v s and/or SOCs on these processes.

Role of the funding source

This work was supported financially by NIH Grants R01 HD03808207A1 (to A.D.), CONACyT-Mexico (49113 to A.D., 39860 to R.F., 47011 to M.C. and 99333 to C.T.), DGAPA/UNAM (IN211809 to A.D. and IN204109 to C.T.).

Acknowledgments

The authors thank Shirley Ainsworth, Marcela Ramírez, Juan Manuel Hurtado, Roberto Rodríguez and Elizabeth Mata for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.059](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.059).

References

- [1] A. Darszon, T. Nishigaki, C. Wood, C.L. Trevino, R. Felix, C. Beltran, Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology, *Int. Rev. Cytol.* 243 (2005) 79–172.
- [2] P.M. Wassarman, E.S. Litscher, Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida, *Int. J. Dev. Biol.* 52 (2008) 665–676.
- [3] C. Arnoult, I.G. Kazam, P.E. Visconti, G.S. Kopf, M. Villaz, H.M. Florman, Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 6757–6762.
- [4] C. Jimenez-Gonzalez, F. Michelangeli, C.V. Harper, C.L. Barratt, S.J. Publicover, Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores, *Hum. Reprod. Update* 12 (2006) 253–267.
- [5] B. Bhandari, P. Bansal, P. Talwar, S.K. Gupta, Delineation of downstream signalling components during acrosome reaction mediated by heat solubilized human zona pellucida, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8 (2010) 7.
- [6] P.C. Chiu, B.S. Wong, M.K. Chung, K.K. Lam, R.T. Pang, K.F. Lee, S.B. Sumitro, S.K. Gupta, W.S. Yeung, Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa, *Biol. Reprod.* (2008) 869–877.
- [7] P. Caballero-Campo, M. Chirinos, X.J. Fan, M.E. Gonzalez-Gonzalez, M. Galicia-Chavarria, F. Larrea, G.L. Gerton, Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function, *Biol. Reprod.* 74 (2006) 760–768.
- [8] S. Chakravarty, K. Suraj, S.K. Gupta, Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C, *Mol. Hum. Reprod.* 11 (2005) 365–372.
- [9] WHO, WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, Cambridge University Press, New York, 1999.
- [10] N.L. Cross, S. Meizel, Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm, *Biol. Reprod.* 41 (1989) 635–641.
- [11] J.H. Lee, J.C. Gomora, L.L. Cribbs, E. Perez-Reyes, Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block $\alpha 1H$, *Biophys. J.* 77 (1999) 3034–3042.
- [12] S. Stamboulian, D. Kim, H.S. Shin, M. Ronjat, M. De Waard, C. Arnoult, Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the $\text{Ca}_v3.1$ ($\alpha 1G$) calcium channel: $\text{Ca}_v3.2$ ($\alpha 1H$) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells, *J. Cell. Physiol.* 200 (2004) 116–124.
- [13] T.S. Lee, T. Kaku, S. Takebayashi, T. Uchino, S. Miyamoto, T. Hadama, E. Perez-Reyes, K. Ono, Actions of mibefradil, efonidipine and nifedipine block of recombinant T- and L-type Ca channels with distinct inhibitory mechanisms, *Pharmacology* 78 (2006) 11–20.
- [14] A. Shcheglovitov, T. Zhelay, Y. Vitko, V. Osipenko, E. Perez-Reyes, P. Kostyuk, Y. Shuba, Contrasting the effects of nifedipine on subtypes of endogenous and recombinant T-type Ca^{2+} channels, *Biochem. Pharmacol.* 69 (2005) 841–854.
- [15] T.N. Heady, J.C. Gomora, T.L. Macdonald, E. Perez-Reyes, Molecular pharmacology of T-type Ca^{2+} channels, *Jpn. J. Pharmacol.* 85 (2001) 339–350.
- [16] S. Benoff, C.C. Chu, J.L. Marmor, R.Z. Sokol, L.O. Goodwin, I.R. Hurley, Voltage-dependent calcium channels in mammalian spermatozoa revisited, *Front. Biosci.* 12 (2007) 1420–1449.
- [17] L.O. Goodwin, D.S. Karabinus, R.G. Pergolizzi, S. Benoff, L-type voltage-dependent calcium channel $\alpha 1C$ subunit mRNA is present in ejaculated human spermatozoa, *Mol. Hum. Reprod.* 6 (2000) 127–136.
- [18] J.Y. Park, H.J. Ahn, J.G. Gu, K.H. Lee, J.S. Kim, H.W. Kang, J.H. Lee, Molecular identification of Ca^{2+} channels in human sperm, *Exp. Mol. Med.* 35 (2003) 285–292.
- [19] E. Perez-Reyes, Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 117–161.
- [20] A. Darszon, J.J. Acevedo, B.E. Galindo, E.O. Hernandez-Gonzalez, T. Nishigaki, C.L. Trevino, C. Wood, C. Beltran, Sperm channel diversity and functional multiplicity, *Reproduction* 131 (2006) 977–988.
- [21] W.Y. Son, J.H. Lee, C.T. Han, Acrosome reaction of human spermatozoa is mainly mediated by $\alpha 1H$ T-type calcium channels, *Mol. Hum. Reprod.* 6 (2000) 893–897.
- [22] J. Escoffier, S. Boisseau, C. Serres, C.C. Chen, D. Kim, S. Stamboulian, H.S. Shin, K.P. Campbell, M. De Waard, C. Arnoult, Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ channels in sperm cells: an evaluation from $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice, *J. Cell. Physiol.* 212 (2007) 753–763.
- [23] Y. Ni, K. Li, W. Xu, L. Song, K. Yao, X. Zhang, H. Huang, Y. Zhang, Q.X. Shi, Acrosome reaction induced by recombinant human zona pellucida 3 peptides rhuZP3a22~176 and rhuZP3b177~348 and their mechanism, *J. Androl.* 28 (2007) 381–388.
- [24] L. Lacinova, A. Welling, E. Bosse, P. Ruth, V. Flockerzi, F. Hofmann, Interaction of Ro 40-5967 and verapamil with the stably expressed $\alpha 1$ -subunit of the cardiac L-type calcium channel, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274 (1995) 54–63.
- [25] L. Lacinova, A. Ludwig, E. Bosse, V. Flockerzi, F. Hofmann, The block of the expressed L-type calcium channel is modulated by the β_3 subunit, *FEBS Lett.* 373 (1995) 103–107.
- [26] S. Sokolov, R.G. Weiss, B. Kurka, F. Gapp, S. Hering, Inactivation determinant in the I-II loop of the Ca^{2+} channel $\alpha 1$ -subunit and β -subunit interaction affect sensitivity for the phenylalkylamine (–)gallopamil, *J. Physiol.* 519 (Pt. 2) (1999) 315–322.