



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

**ANÁLISIS DE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR
EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO EN RESPUESTA A
AGONISTAS FISIOLÓGICOS**

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

**PRESENTA:
M. en C. ANA ALICIA SÁNCHEZ TUSIE**

**TUTOR
Dra. CLAUDIA TREVIÑO SANTA CRUZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. RICARDO FÉLIX GRIJALVA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
Dr. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

CUERNAVACA, MORELOS. JUNIO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Claudia Treviño Santa Cruz en el Departamento de Genética del desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos, México.

Investigación realizada gracias a los proyectos de CONACyT 99333, DGAPA IN202212-3 y a la fundación Alexander von Humboldt. Además, Ana Alicia Sánchez Tusie fue estudiante del Programa Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM y contó con una beca doctoral CONACyT (2010-2014).

Agradecimientos

Durante seis años tuve la oportunidad de trabajar y formarme con personas a las cuales admiro profundamente, personas que con su ejemplo cotidiano demuestran su disciplina y cariño al trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Claudia Treviño Santa Cruz por todo su apoyo, cariño y paciencia durante la realización de esta tesis.

De igual manera agradezco al Dr. Alberto Darszon, al Dr. Takuya Nishigaki, a la Dra. Carmen Beltrán y al Dr. Ignacio López por todos sus comentarios y sugerencias a lo largo del proyecto.

A todos mis compañeros del laboratorio, en especial a todos los Godínez del “club del tupper” que hicieron de la hora de la comida un rato muy ameno.

A Yolo por tener ese trastorno obsesivo compulsivo que tanto ayuda en la vida y en los experimentos. A Espe por ser la mejor compañera del set de imágenes. A Omar por ser un inspector de la RAE y por ser la enciclopedia del espectáculo. A Julio por ser un pan. A Chío por ser la mejor compañera en congresos. A Francisco por enseñarme las canciones de Miley en cumbia. A Gerardo de Blas por todo su apoyo, consejos y locuras al inicio del proyecto “Anita, peor es casarse y vivir con la suegra”. A José Luis de la Vega por ser un consentido y la pieza fundamental del laboratorio.

A Grant por su cariño y apoyo durante mi estancia en Inglaterra, a Nisha por llevarme a todos los Pubs de Oxford y a Carmen Coxon por todas las recetas, los postres y por los chilly willies.

A mis amigos de toda la vida: Ere, Nash, Mau, Karen, Joffre, Rogelio y Alexis.

A Ernesto por hacerme mejor persona, por enseñarme a dar lo mejor de mí, por tener mil proyectos juntos, por hacer todo más divertido, por compartir sus sueños conmigo.

Y obviamente a mí a mamá por todo lo que hace por mí y por ser la mejor mamá del mundo.

Índice General

	Página
Resumen.....	6
Resumen en Inglés (Abstract).....	8
Abreviaturas.....	9
Introducción.....	10
Antecedentes.....	18
Hipótesis.....	28
Objetivos.....	28
Métodos.....	29
Síntesis de NAADP-AM.....	29
Obtención de espermatozoides.....	30
Incorporación del indicador Fluorescente.....	32
Medición de cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en una población de espermatozoides.....	33
Análisis de datos de las mediciones de Ca^{2+} en población.....	33
Identificación de los reservorios ácidos en el espermatozoide humano.....	33
Sitios de unión del Ned-19 en el espermatozoide humano.....	34
Adquisición de imágenes de espermatozoides cargados con Fluo3.....	35
Análisis Estadístico.....	35
Resultados	36
Discusión	54
Conclusión	56
Perspectivas	56
Referencias.....	57
Artículos Publicados.....	66

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Esquema del espermatozoide humano.....	10
Figura 2. Diagrama de la Espermatogénesis.....	12
Figura 3. Diagrama del ovocito rodeado por la zona pelúcida y por células del cúmulus.....	15
Figura 4. En ausencia de Ca^{2+} externo, el $\delta\text{pCPT-O-Metil-AMPC}$ genera una onda de Ca^{2+} que comienza en pieza media y se propaga hacia la cabeza del espermatozoide.....	19
Figura 5. Comunicación entre reservorios internos de Ca^{2+} inducida por NAADP.....	20
Figura 6. Reacciones catalizadas por las ADP-ribosil ciclasas.....	22
Figura 7. Síntesis del NAADP-AM.....	30
Tabla 1. Valores de referencia mínimos del semen humano.....	31
Figura 8. Diagrama esquemático del protocolo experimental para la separación de espermatozoides móviles de la muestra mediante el método de swim up (nado hacia arriba).....	30
Figura 9. El Ned-19 es un compuesto fluorescente que inhibe la señalización del NAADP de manera selectiva.....	34
Figura 10. La ADPRc-AM no induce incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espermatozoide humano.....	37
Figura 11. El NAADP-AM moviliza Ca^{2+} en el espermatozoide humano de manera dosis dependiente.....	38
Figura 12. Curva dosis respuesta de los incrementos de Ca^{2+} inducidos por NAADP-AM en espermatozoides humanos.....	39
Figura 13. La incubación del Ned-19 por 10 minutos inhibe el incremento de Ca^{2+} inducido por NAADP-AM en la población de espermatozoides.....	40
Figura 14. El análogo del NAADP (Ned-19) se acumula en reservorios ácidos en el espermatozoide humano.....	41
Figura 15. Los reservorios ácidos del espermatozoide humano son sensibles a Bafilomicina y GPN.....	42
Figura 16. El GPN inhibe el incremento de Ca^{2+} inducido por NAADP-AM en la población de espermatozoides.....	43
Figura 17. GPN inhibe el incremento de Ca^{2+} inducido por NAADP-AM en la población de espermatozoides.....	44
Figura 18. En presencia de 100 nM de $[\text{Ca}^{2+}]$ externo se disminuye la señalización de NAADP-AM.....	46
Figura 19. En presencia de 100 nM de $[\text{Ca}^{2+}]$ externo se disminuye la señalización de NAADP-AM.....	46
Figura 20. Los inhibidores de CatSper disminuyen la señalización de NAADP-AM.....	48
Figura 21. El NAADP a diferencia de la ADPRc incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espermatozoide humano en presencia de 100 nM de Ca^{2+} externo.....	49
Figura 22. El espermatozoide humano sintetiza NAADP	51
Figura 23. Modelo propuesto de la participación del NAADP durante la reacción acrosomal.....	54

Resumen

Actualmente somos más de 7000 millones de personas en el mundo y tanto las economías desarrolladas como las emergentes presentan altas tasas de embarazos no planeados a pesar de la disponibilidad de anticonceptivos seguros y efectivos. La educación sexual y los anticonceptivos modernos (tanto hormonales como no hormonales) han mejorado la calidad de vida de las mujeres, sin embargo no todos son adecuados para todas las usuarias, lo cual destaca la necesidad de desarrollar nuevos y mejores anticonceptivos masculinos reversibles. Para poder desarrollar este tipo de tecnología es importante conocer con detalle la fisiología celular del espermatozoide y caracterizar las vías de señalización celular particulares del espermatozoide que conllevan a la fecundación. Uno de los procesos que el espermatozoide debe llevar a cabo para fecundar al óvulo es la Reacción Acrosomal (RA) que consiste en la fusión de la membrana del acrosoma (vesícula ácida derivada del Golgi) con la membrana plasmática del espermatozoide produciéndose la liberación de enzimas líticas que permiten al espermatozoide atravesar las capas externas del óvulo. Este evento exocitótico está regulado por las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, sin embargo, se desconocen las entidades moleculares que participan en este proceso. El espermatozoide cuenta con dos reservorios intracelulares de Ca^{2+} localizados en la pieza media (envoltura nuclear redundante) y en la parte anterior de la cabeza (el acrosoma). Al analizar la movilización de Ca^{2+} inducida con agonistas de la RA se observa un incremento en el Ca^{2+} que comienza en pieza media y se propaga hacia el acrosoma por lo que es probable que ocurra una comunicación entre éstos reservorios. En otros tipos celulares, la molécula encargada de esta comunicación entre reservorios es el Dinucleótido Fosforilado de Ácido Nicotínico y de Adenina (NAADP por sus siglas en inglés), un segundo mensajero que induce la liberación de Ca^{2+} de reservorios ácidos. El NAADP actúa como un disparador de la señal de Ca^{2+} ya que amplifica la señal induciendo la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR por sus siglas en inglés) de otros reservorios. En trabajos previos se demostró que el espermatozoide de erizo de mar sintetiza NAADP. En el presente trabajo caracterizamos la participación del NAADP en la fisiología del espermatozoide humano. Al adicionar NAADP en su forma permeable (NAADP-AM) en espermatozoides humanos, cargados con un colorante fluorescente sensible a Ca^{2+} , observamos incrementos en los niveles intracelulares de Ca^{2+} incluso en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Utilizando LysoTracker, una sonda fluorescente que selectivamente se acumula en compartimentos ácidos, identificamos dos reservorios de este tipo localizados en la cabeza y en la pieza media del espermatozoide. La naturaleza ácida de estos reservorios se confirmó al eliminar la tinción utilizando un bloqueador de la

bomba de protones vacuolar denominado Bafilomicina o al eliminar los reservorios ácidos utilizando Glicil-L-Fenilalanina-2-Naftilamida (GPN por sus siglas en inglés), un disruptor osmótico de lisosomas. De igual manera, utilizamos un análogo fluorescente permeable del NAADP, el Ned-19, para teñir las regiones subcelulares afines al NAADP las cuales se sobreponen con la tinción del LysoTracker. Estos resultados contribuyen al entendimiento de la fisiología del espermatozoide humano y la manera en la que este regula sus vías de señalización a través de la concentración de Ca^{2+} intracelular para poder fecundar al óvulo.

Resumen en Inglés (Abstract)

Nowadays we are more than 7000 millions of people in the world and in developed and less-developed countries there is an increase in unplanned pregnancies despite the availability of safe and effective contraceptives. Sexual education and modern contraceptives (hormonal and non-hormonal) have improved the quality of life of women, however, not all are suitable for all users, which highlights the need to develop new and improved reversible male contraceptive. To develop such compounds it is important to understand the sperm physiology and all the signaling pathways involved in the process of fertilization. One of the processes sperm must undergo to fertilize the egg is the Acrosome Reaction (AR) that consists in the fusion of the acrosome membrane with the sperm plasma membrane releasing the enzymes that allow the sperm to penetrate the outer layers of the egg. This exocytotic event is regulated by intracellular Ca^{2+} concentrations; however, the molecular entities involved in this process are still under study. The sperm has two intracellular Ca^{2+} stores located in the mid piece (redundant nuclear envelope) and the anterior part of head (acrosome). When the Ca^{2+} response induced by agonists of the AR is analyzed, an initial increase in the Ca^{2+} signal is observed in the flagellar mid piece that spreads towards the acrosome suggesting a communication between the Ca^{2+} stores. In other cell types, the molecule involved in the communication between stores is the Nicotinic Acid Adenin Dinucleotide Phosphate (NAADP), a second messenger that induces the release of Ca^{2+} from acidic stores. NAADP triggers the Ca^{2+} signaling by amplifying the signal due to the Calcium Induced Calcium Release (CICR) process. Previous works have shown that sea urchin sperm synthesizes NAADP. Here we characterized the participation of NAADP in human sperm physiology. When adding the permeable form of NAADP (NAADP-AM) in human sperm cells loaded with Ca^{2+} fluorescent dyes, it generates an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration even in the absence of extracellular Ca^{2+} . Using LysoTracker, we identified two acidic stores located in the head and in the mid piece of the sperm. The acidic nature of the stores was confirmed by eliminating the LysoTracker fluorescence using Bafilomycin, an inhibitor of the vacuolar proton pump or after lysosomal bursting with glycyl-L-phenylalanine-2-naphthylamide. The selective fluorescent NAADP analog, Ned-19, stained the same subcellular regions as LysoTracker, suggesting that these stores are the targets of NAADP action. These results contribute to the understanding of the physiology of human sperm and the mechanisms by which the Ca^{2+} signaling pathways are regulated to allow sperm to fertilize the egg.

Abreviaturas

8pCPT-O-metil-AMPC, 8-(4-Clorofeniltio)-2'-O-metiladenosina3', 5'-monofosfato monosódico cíclico.

ACs, adenilato ciclasa soluble.

ADPRc, adenosin difosfato ribosa cíclica.

AMPC, adenosin monofosfato cíclico.

ATP, adenosin trifosfato.

BSA, albúmina sérica bobina.

Ca_v, canales de Ca²⁺ modulados por voltaje.

CICR, liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺.

DAG, diacilglicerol.

DIEA, diisopropiletilamina.

ENR, envoltura nuclear redundante.

EPAC, proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por AMPC.

FSH, hormona folículo estimulante.

GPN, Glicil-L-Fenilalanina-2-Naftilamida.

IP₃, inositol trifosfato.

LH, hormona luteinizante.

NAAD, dinucleótido ácido adenin nicotínico.

NAADP, dinucleótido fosforilado de ácido nicotínico y de adenina.

NAADP-AM, NAADP en su forma permeable.

NADP, fosfato dinucleotido adenin nicotinamida.

Pg, progesterona.

PIP₂, fosfatidil inositol 4,5-bifosfato.

PKA, proteína cinasa A.

PLC, fosfolipasa C.

RA, reacción acrosomal.

RE, retículo endoplásmico.

SOCE, entrada de Ca²⁺ operada por pozas.

TPC, canales de dos poros.

TRPC, canales catiónicos de potencial transiente.

V-H ATPasa, bomba de protones vacuolar.

ZP, zona pelúcida.

Introducción

La fecundación es el evento biológico más importante en los organismos de reproducción sexual, en el cual los gametos masculino y femenino se fusionan generando un nuevo individuo.

El espermatozoide es una célula haploide compuesta principalmente por cabeza y flagelo (Figura 1). En la *cabeza* se encuentra el acrosoma (vesícula ácida derivada del Golgi) y el núcleo, ambos rodeados de una pequeña cantidad de citoplasma. El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas (hialuronidasa y acrosina entre otras) que le ayudan al espermatozoide a penetrar las capas externas del óvulo. El *flagelo* está compuesto por pieza media, principal y terminal. En la pieza media se localizan las mitocondrias en un arreglo de vaina helicoidal. A lo largo de la pieza media y principal se encuentra el axonema que confiere movimiento al espermatozoide gracias a la hidrólisis de ATP. El axonema posee dos microtúbulos centrales rodeados por nueve pares de microtúbulos asociados con dineínas. Las dineínas son ATPasas que funcionan como motores moleculares que producen la fuerza motriz que impulsa al flagelo.

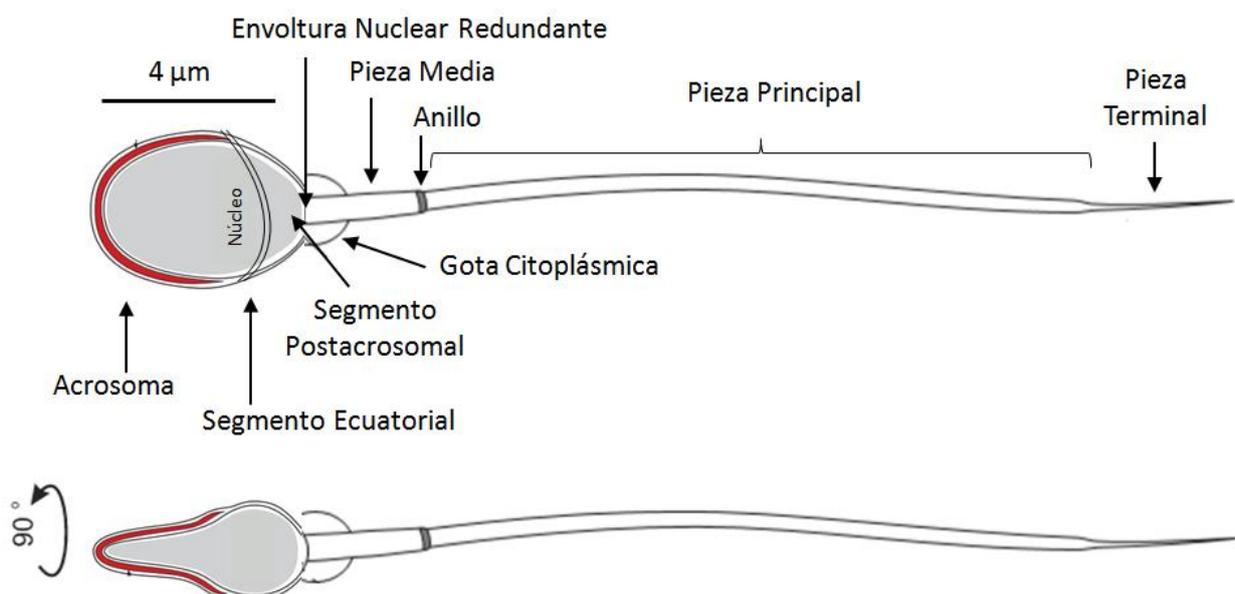


Figura 1. Esquema del espermatozoide humano. Componentes principales del espermatozoide humano. En la cabeza se localiza el núcleo y el acrosoma rodeados por una pequeña cantidad de citoplasma. El flagelo se divide en

pieza media, pieza principal y pieza terminal. La pieza media se separa de la pieza principal por el anillo. Se indican los segmentos ecuatoriales y postacrosomales así como la gota citoplásmica, frecuente en espermatozoides eyaculados. Asimismo se señala a la envoltura nuclear redundante (ENR), un grupo de vesículas remanentes de la envoltura nuclear producto de la compactación del núcleo. Modificado de (Darszon et al. 2011).

El espermatozoide es una célula altamente diferenciada que se forma a través de un proceso denominado espermatogénesis (Figura 2) y que ocurre en los túbulos seminíferos del testículo. Este proceso comienza con la proliferación de las espermatogonias, células madre diploides que se localizan en la base del epitelio de los túbulos y proliferan por mitosis. Existen dos tipos de espermatogonias: las tipo A y las tipo B. Las espermatogonias tipo A se dividen dando origen a espermatogonias tipo B, las cuales van a llevar a cabo el proceso de diferenciación y cuyos descendientes, los espermatoцитos primarios, entrarán a la primera división meiótica generando dos espermatoцитos secundarios, éstos entran a meiosis II y se obtienen dos espermátidas redondas las cuales llevarán a cabo el proceso de espermiogénesis que implica: una reducción de la cantidad de citoplasma generando un cuerpo residual, la condensación de la cromatina (sustitución de histonas por protaminas) para compactar el material genético, la formación de la vesícula acrosomal a partir del aparato de Golgi, la formación del flagelo a partir de la región centriolar y el agrupamiento de las mitocondrias en la base del flagelo (Huleihel, Abuelhija & Lunenfeld 2007). Se calcula que el testículo humano produce alrededor de ~1000 espermatozoides por segundo (Amann and Howards 1980).

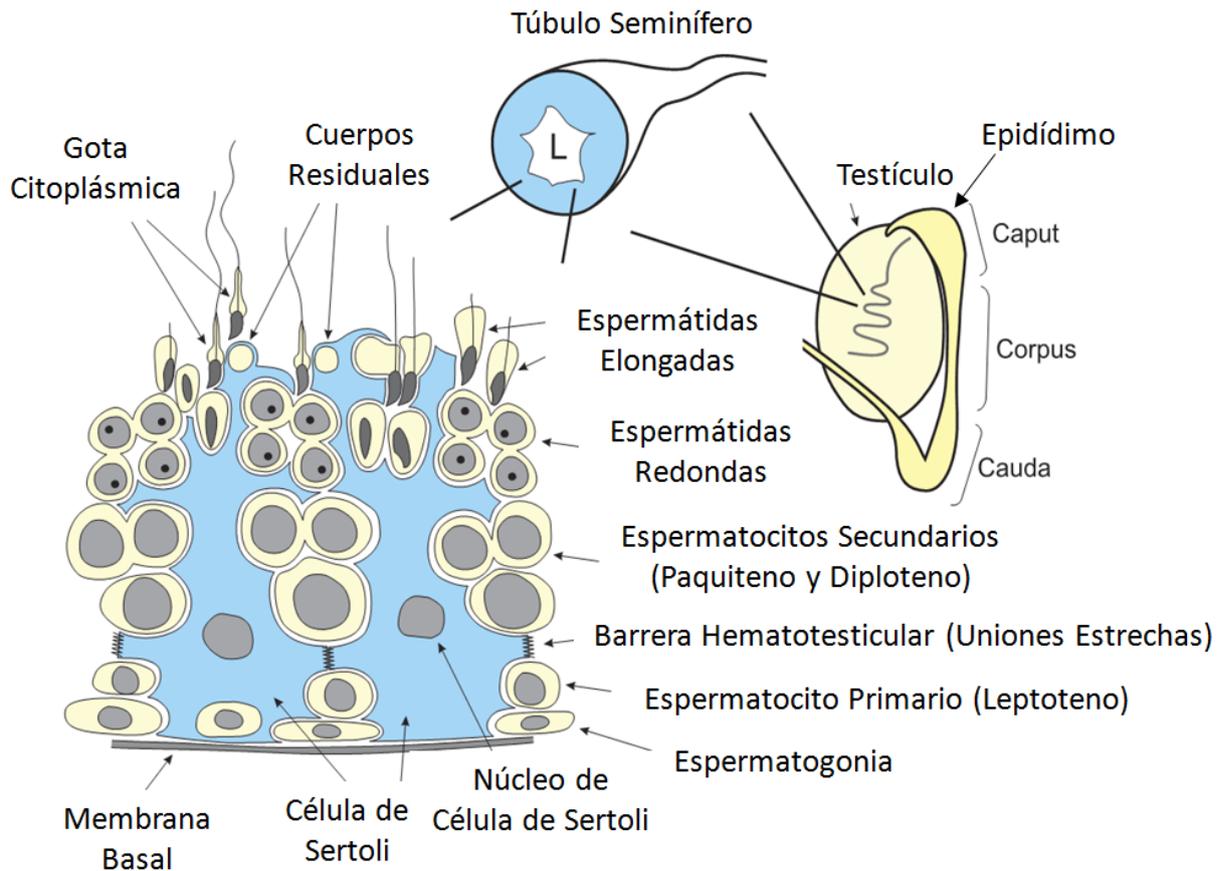


Figura 2. Diagrama de la Espermatogénesis. Se indica el corte longitudinal de un túbulo seminífero y la luz del mismo (L). El proceso de diferenciación comienza en la membrana basal y termina en el lumen del túbulo seminífero (L) con el apoyo estructural y funcional de las células de Sertoli (indicadas en azul). Las espermatogonias (células madre germinales) se localizan cerca de la membrana basal. Los espermatocitos primarios (Leptoteno) se diferencian de las espermatogonias y sobrepasan la barrera hematotesticular formada por uniones estrechas de células de Sertoli adyacentes. Los espermatocitos secundarios (Paquiteno y Diploteno) se forman en la primera meiosis y se convierten en espermátidas redondas en la segunda meiosis. Las espermátidas elongadas son células en espermiación que conllevan cambios morfológicos importantes en el núcleo y el cuerpo celular. Durante la fase final de la espermiación, se elimina una gran parte del contenido citoplasmático el cual se fagocita por las células de Sertoli para formar los espermatozoides completamente diferenciados, el citoplasma residual se conoce como gota citoplásmica. Los espermatozoides recién formados se transportan al epidídimo, el cual está compuesto por un túbulo altamente enrollado. El epidídimo se divide en caput, corpus y cauda y el paso del espermatozoide por cada uno de éstos es necesario para el proceso de maduración del espermatozoide (Tomado de Darszon et al. 2011).

En humanos, el tiempo total de duración de la espermatogénesis y espermiogénesis es de 64 días y al momento de liberarse los espermatozoides del epitelio seminífero son aún inmaduros e incapaces de tener movilidad progresiva y fecundar al óvulo. El espermatozoide adquiere esas habilidades a medida que

atraviesa el epidídimo. Durante esta etapa, denominada maduración, ocurren cambios funcionales en procesos metabólicos, entre ellos, la fosforilación y desfosforilación de las proteínas motoras (microtúbulos conectados a dineínas) del axonema, que dan como resultado la activación de la motilidad (Darszon et al. 2011). El proceso de maduración en el epidídimo dura entre 10-14 días en humanos. El epidídimo se divide en caput, corpus y cauda y cada una de estas regiones secreta diferentes factores que regulan la maduración del espermatozoide (Cooper 1990). Los espermatozoides que han madurado en el epidídimo son capaces de moverse activamente, pero no tienen la capacidad de fecundar. Durante la eyaculación, los espermatozoides del epidídimo entran en contacto con el líquido seminal y el prostático conformando el semen. De igual manera, los espermatozoides del semen aún no son capaces de fecundar al óvulo. Esta capacidad la adquieren después de permanecer algún tiempo en el tracto genital femenino, periodo denominado capacitación. El proceso de la capacitación se describió por primera vez a principios de la década de 1950 en experimentos independientes de Austin y Chang donde demostraron que es necesario que el espermatozoide permanezca en el tracto genital femenino antes de ser capaz de fecundar al óvulo (Austin 1952; Chang 1951). Estos trabajos fueron el preámbulo para que, en menos de diez años, Chang publicara la primera fertilización in vitro en conejos utilizando óvulos y espermatozoides de conejos negros que se implantaron en conejas blancas y toda la descendencia fueron conejos negros (Chang 1951). A pesar de que han transcurrido más de seis décadas desde el descubrimiento de la capacitación, el mecanismo molecular de este proceso no se entiende por completo. Publicaciones recientes indican que cambios funcionales involucrados en la capacitación resultan de la combinación de procesos secuenciales y en algunos casos paralelos. La capacitación comprende múltiples eventos de señalización. Un ejemplo de esto es el hecho de que los espermatozoides eyaculados son células móviles, sin embargo este tipo de motilidad no es suficiente para penetrar las capas que rodean al óvulo. Para que el espermatozoide sea capaz de fecundar debe modificar su batido flagelar de simétrico y activo a uno mucho más vigoroso y asimétrico. Esta regulación en la motilidad está modulada por cambios en el ambiente iónico que rodea al espermatozoide, que “hiperactivan” el nado del espermatozoide. A medida que el espermatozoide viaja del epidídimo hacia el tracto genital femenino enfrenta cambios significativos en la osmolaridad y en la concentración de varios iones. Después de mezclarse con los fluidos seminales, los espermatozoides encuentran un ambiente extracelular donde la concentración de K^+ se reduce, mientras que las concentraciones de HCO_3^- y Na^+ se incrementan significativamente. Las concentraciones de HCO_3^- se elevan de 4 mM, en la cauda del epidídimo (Asari et al. 1996), a 20 mM en el plasma seminal y el tracto femenino (Maas, Storey, and Mastroianni 1977; Okamura et al. 1985). El incremento en la concentración extracelular de HCO_3^- estimula a la adenilato ciclasa soluble (ACs), incrementa los niveles intracelulares de AMPc, que activan a la PKA (Okamura et al. 1985) lo que resulta en la fosforilación de un grupo de proteínas (Arcelay et al. 2008). Además, como es de esperarse, los cambios en la concentración de iones alteran el potencial de membrana celular (Demarco IA et al., 2003).

Otros de los parámetros cruciales son las $[Ca^{2+}]_i$ y el pH_i (Yanagimachi 1994). Ambos aumentan durante la capacitación (Baldi et al. 2014; DasGupta, Mills, and Fraser 1993; Galantino-Homer et al. 2004) y se sabe que, para inducir la capacitación *in vitro* es necesario que el medio de incubación contenga: Ca^{2+} , albúmina sérica y HCO_3^- (Visconti et al. 2002; Yanagimachi 1994). En el espermatozoide de ratón, este proceso requiere un mínimo de 100-200 μM de $[Ca^{2+}]_e$ (Fraser 1987; Marín-Briggiler et al. 2003), sin embargo, usualmente se utiliza 2 mM Ca^{2+} en los medios capacitantes.

Por su parte, la albúmina es importante para remover el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide para inducir la reorganización y el cambio en la fluidez de la membrana (Cross 2003), estos cambios en la membrana plasmática del espermatozoide inducida por la albúmina pueden modular los flujos de Ca^{2+} y HCO_3^- que activan a la ACs y los incrementos en los niveles intracelulares de AMPc (Visconti et al. 2002). La albúmina también puede actuar de manera independiente a la vía del AMPc al inducir la fosforilación de serin-treoninas (Jha et al. 2006).

Otro de los eventos importantes en el espermatozoide, necesarios para la fecundación, es la reacción acrosomal (RA), un proceso de exocitosis que en los mamíferos consiste en la fusión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide, produciéndose la liberación de enzimas líticas acrosomales que permiten al espermatozoide atravesar las células que rodean al óvulo así como las capas externas del óvulo (Figura 3) (Darszon et al. 2011).

Actualmente existe un gran debate en el campo sobre la identidad molecular de los inductores fisiológicos y sobre cuándo y dónde ocurre la RA. El modelo clásico, propone a la zona pelúcida (ZP) que rodea al óvulo como el inductor fisiológico de la RA. La ZP está compuesta por una matriz de cuatro glicoproteínas en humano (ZP1-ZP4), mientras que en ratón sólo existen tres glicoproteínas (Monné, Han, and Jovine 2006). De estas la ZP3 se consideraba como inductor principal de la RA (Ducibella, Schultz, and Ozil 2006; Wassarman and Litscher 2009; Litscher, Williams, and Wassarman 2009). Se han propuesto varios candidatos como los receptores de ZP3, sin embargo, los ratones nulos de todos estos candidatos son fértiles (Baba et al. 2002; Wassarman and Litscher 2009) por lo que varios reportes sugieren múltiples sitios de reconocimiento entre gametos (Nixon and Aitken 2009; van Gestel et al. 2007). Estudios más recientes, en espermatozoide de ratón, demostraron que la RA se induce al momento en el que el espermatozoide atraviesa las células del cúmulus que rodean al óvulo (M. Jin et al. 2011) (Figura 3). En el estudio observan que los espermatozoides comienzan la RA antes de llegar a la ZP y son capaces de penetrar la zona, fusionarse con la membrana del ovocito y fecundar. Además, se incrementa la tasa de fecundación *in vitro* al

coincubar los ovocitos con las células del cúmulus, lo que destaca la importancia de las células del cúmulus y su matriz en la fecundación *in vivo* (M. Jin et al. 2011). Estos hallazgos rompen con paradigmas establecidos y obligan a investigar e interpretar de manera diferente la interacción del espermatozoide tanto con las células del cúmulus como con el ovocito.

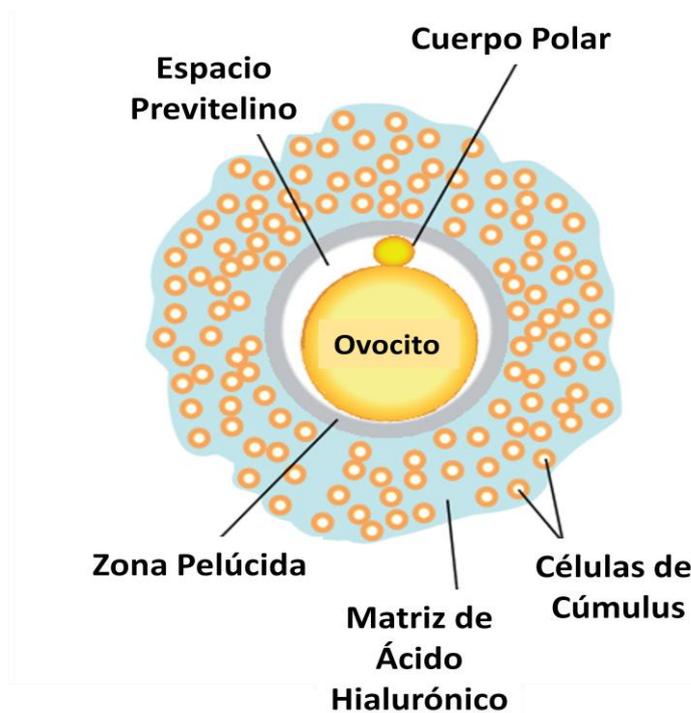


Figura 3. Diagrama del ovocito rodeado por la zona pelúcida y por células del cúmulus. Durante la ovulación, el folículo ovárico se rompe liberando al óvulo rodeado de células de la granulosa, las cuales proliferan y forman múltiples capas de células del cúmulus que rodean al ovocito ovulado (amarillo). La presencia de las células del cúmulus favorece la fecundación *in vitro* (M. Jin et al. 2011; Tokuhiro et al. 2012). El aumento en las concentraciones de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) induce un proceso proliferativo en las células del cúmulus, las cuales secretan ácido hialurónico (azul) que genera una dispersión de las células del alrededor del ovocito. Las células del cúmulus están separadas del ovocito por la ZP (gris) la cual está conformada, en humanos, por cuatro proteínas (ZP1-4). Modificado de (Okabe 2013) .

Independientemente del inductor o el sitio de la inducción de la RA, solo espermatozoides reaccionados son capaces de fecundar al óvulo y es indiscutible que los flujos iónicos a través de la membrana plasmática del espermatozoide son importantes para que esta se lleve a cabo. Estos flujos se producen a través de transportadores de membrana, como pueden ser canales iónicos, intercambiadores o ATPasas y contribuyen a modular la concentración de diversos iones. Particularmente se sabe que los flujos de Ca^{2+} , son fundamentales para la movilidad, la capacitación y la RA (Darszon et al. 2011) . La movilización de Ca^{2+} tanto

del interior como del exterior de la célula es esencial para la RA (Yanagimachi 1994). De igual manera, al incubar los espermatozoides con una gran variedad de antagonistas de canales de Ca^{2+} se inhibe este proceso, lo que enfatiza la importancia de los canales de Ca^{2+} en la RA (Darszon et al. 2006; Florman, Jungnickel, and Sutton 2008; Publicover, Harper, and Barratt 2007). El modelo propuesto de la cascada de señalización de la RA presenta una respuesta de Ca^{2+} bifásica que involucra al menos tres tipos de canales permeables a Ca^{2+} , dos de los cuales se ubican en la membrana plasmática del espermatozoide. En el espermatozoide de ratón, al inducir la RA con ZP ocurre un incremento rápido y transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que alcanza su cúspide a los 50 ms y vuelve a su estado basal en aproximadamente 200 ms (Arnoult et al., 1999). La farmacología y cinética de este ingreso son consistentes con la apertura de canales de Ca^{2+} modulados por voltaje de la subfamilia 3 (Ca_v3), sin embargo evidencias recientes obtenidas con ratones nulos para al menos dos miembros de esta familia que resultan en ratones fértiles, cuestionan la participación de estos canales durante la RA (Escoffier et al. 2007). El segundo incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la RA se caracteriza por ser lento y sostenido, y su duración puede ser de varios segundos e incluso minutos. Se ha propuesto que el primer ingreso de Ca^{2+} ocasionado por ZP3, activa a una $\text{PLC}\delta 4$ (Fukami et al. 2003) que al metabolizar PIP_2 produce diacilglicerol (DAG) e IP_3 , el IP_3 es soluble en el citoplasma y se une a sus receptores ubicados en la membrana acrosomal y libera el Ca^{2+} que contiene este reservorio (Walensky and Snyder 1995). Esta liberación de Ca^{2+} ocasiona una segunda entrada de Ca^{2+} a través de canales operados por pozas (SOCE por sus siglas en inglés Store Operated Calcium Entry o SOC) (O'Toole et al. 2000). Existe un gran número de evidencias que apoyan la presencia de esta entrada tipo SOCE en espermatozoides de mamífero y de erizo de mar, en todos los casos se observa una entrada de Ca^{2+} dependiente de Ca^{2+} externo, que ocurre después de movilizar el Ca^{2+} de los reservorios internos (Blackmore 1993; Dragileva, Rubinstein, and Breitbart 1999; O'Toole et al. 2000; Hirohashi and Vacquier 2003; Ardón et al. 2009). Experimentos en un modelo de espermatozoides permeabilizados de humano, han sugerido que esta segunda entrada de Ca^{2+} activa a la ACs que sintetiza AMPc. El AMPc activa a EPAC, el cual desencadena dos cascadas de señalización paralelas activando a proteínas G pequeñas, una de ellas activa a la $\text{PLC}\epsilon$ sintetizando IP_3 y permitiendo una segunda salida de Ca^{2+} de alguno de los reservorios. Esta segunda salida de Ca^{2+} activa la maquinaria de fusión de membranas de los SNARES previamente ensamblada por la cascada de señalización paralela. Esta maquinaria de fusión de membranas va a permitir la unión entre la membrana del acrosoma y la membrana plasmática del espermatozoide (Branham et al. 2009).

Sin embargo, ninguno de los canales propuestos en el modelo anterior de la reacción acrosomal se han registrado electrofisiológicamente en espermatozoides capacitados y como se mencionó anteriormente muchos de los ratones nulos para estas proteínas presentan fenotipos fértiles o subfértiles.

Otra de las moléculas fisiológicas inductoras de la reacción acrosomal y cuyo canal ligando se conoce para humanos es la progesterona. La progesterona, también conocida como P4, es una hormona esteroide involucrada principalmente en el ciclo menstrual, la fecundación, la gestación y en la embriogénesis. Se sintetiza principalmente en el cuerpo lúteo, la placenta y las células del cúmulus. La progesterona está presente en todo el tracto genital femenino alcanzando concentraciones micromolares en el cúmulus (Osmanet al., 1989; Muncie et al., 2006). Recientemente se reportó que la progesterona activa al canal catiónico, específico del espermatozoide, CatSper, lo cual genera una entrada de Ca^{2+} en esta célula (Lishko, Botchkina, and Kirichok 2011; Strünker et al. 2011; Brenker et al. 2012a). Existen registros de las corrientes del canal CatSper y varias publicaciones sugieren que este canal controla la concentración intracelular de Ca^{2+} y por lo tanto, el batido flagelar del espermatozoide de ratón, particularmente la hiperactivación (Ren 2011; Chang and Suarez 2011). Además, los ratones nulos para las diferentes subunidades de CatSper (1 a 4) son infértiles (Qi et al., 2007). El canal se activa con concentraciones pico y micro molares de progesterona y el incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular inducidas por progesterona se reducen en presencia de los inhibidores de CatSper (Lishko, Botchkina, and Kirichok 2011; Strünker et al. 2011).

Como se mencionó anteriormente, trabajos recientes demostraron que, en el modelo de ratón, la RA ocurre en las células del cúmulus (Bedford 2011; M. Jin et al. 2011; Sun, Chung, and Chan 2011) donde hay altas concentraciones de progesterona, lo cual podría sugerir a la progesterona como la inductora de la RA (M. Jin et al. 2011).

Además, independientemente de identificar al inductor de la RA, es importante entender cómo se regula la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espermatozoide. Una publicación reciente de Publicover y colaboradores demostró que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regula la motilidad del espermatozoide generando diferentes comportamientos en el batido flagelar que el espermatozoide utiliza para ascender el tracto reproductor femenino y poder fecundar al óvulo. Este grupo propone que los reservorios de Ca^{2+} se movilizan a través de la CICR y que la activación de CatSper genera diferentes comportamientos funcionales de acuerdo a la sensibilidad del reservorio de Ca^{2+} (Alasmari et al. 2013).

Antecedentes

La cascada de señalización de la RA implica una vía de señalización compleja, para facilitar su estudio generalmente se utilizan moléculas permeables que activan la cascada río abajo del inicio de la señalización. Un ejemplo de esto es el uso del análogo permeable del AMPc que activa de manera específica a EPAC denominado 8pCPT-O-metil-AMPc. Utilizando este compuesto se analizó la movilización de Ca^{2+} intracelular en el espermatozoide humano eliminando el Ca^{2+} externo con la finalidad de descartar la entrada de Ca^{2+} externo y únicamente analizar la movilización del Ca^{2+} de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} (Figura 4) (DeBlas et al., no publicado). Al momento de activar a EPAC, se observa un incremento en el Ca^{2+} intracelular que comienza en pieza media y se propaga hacia la cabeza del espermatozoide lo que aparenta ser una comunicación entre dos reservorios de Ca^{2+} (Figura 4). En esta célula se proponen como reservorios de Ca^{2+} al acrosoma, que es una vesícula ácida derivada del Golgi, a la envoltura nuclear redundante (remanentes de envoltura nuclear y retículo endoplásmico) localizada en la parte posterior del núcleo y al collar de mitocondrias presentes en pieza media (Costello et al. 2009).

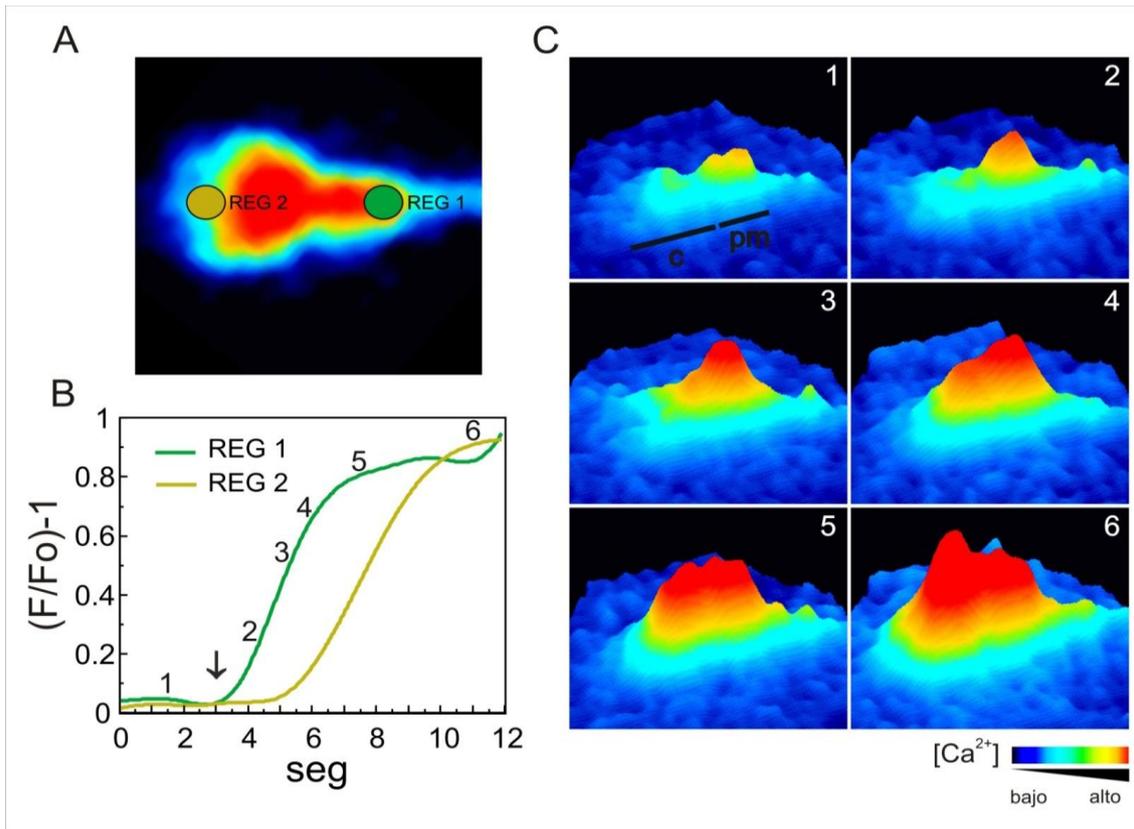


Figura 4. En ausencia de Ca^{2+} externo, el 8pCPT-O-Metil-AMPc genera una onda de Ca^{2+} que comienza en pieza media y se propaga hacia la cabeza del espermatozoide. A) Se muestran dos regiones de interés, la primera localizada en la pieza media del espermatozoide (REG 1) y la segunda localizada en la parte posterior de la cabeza del espermatozoide (REG 2). B) Cinética de los incrementos en fluorescencia al activar a EPAC (flecha) en las dos regiones de interés indicadas en A. C) Secuencia de imágenes (1-6) donde se analizan los incrementos en el Ca^{2+} intracelular en una escala de pseudocolor donde bajas concentraciones de Ca^{2+} se indican en colores fríos mientras que altas concentraciones se indican con colores cálidos. Se indica la región de la pieza media (pm) y la región de la cabeza (c) de un espermatozoide al momento de agregar 8pCPT-O-Metil-AMPc (De Blas et al., no publicado).

Actualmente sabemos que, en la señalización por cambios en el Ca^{2+} no sólo es importante la concentración sino también los componentes espacio temporales de estos cambios. Este tipo de señalización observada en el espermatozoide al inducir la RA se puede explicar con el modelo de comunicación entre reservorios de Ca^{2+} que probablemente sucede también en el espermatozoide.

Existen tres segundos mensajeros que permiten la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. Uno de ellos es el IP_3 que reconoce a su receptor localizado en RE. Otro es la ribosa cíclica ADP (ADPRc) que reconoce receptores de rianodina también localizados en el RE. Esta poza se reabastece mediante la ATPasa de Ca^{2+} que se puede bloquear con Tapsigargina. El tercero de los segundos mensajeros que liberan

Ca²⁺ y el más potente, es el Dinucleótido Fosforilado de Ácido Nicotínico y de Adenina o NAADP que induce la liberación de Ca²⁺ de reservorios ácidos como endosomas y lisosomas. Este tipo de pozas se reabastecen generalmente mediante la bomba de protones vacuolar y un intercambiador Ca²⁺/protón (Figura 5) (Calcraft et al. 2009).

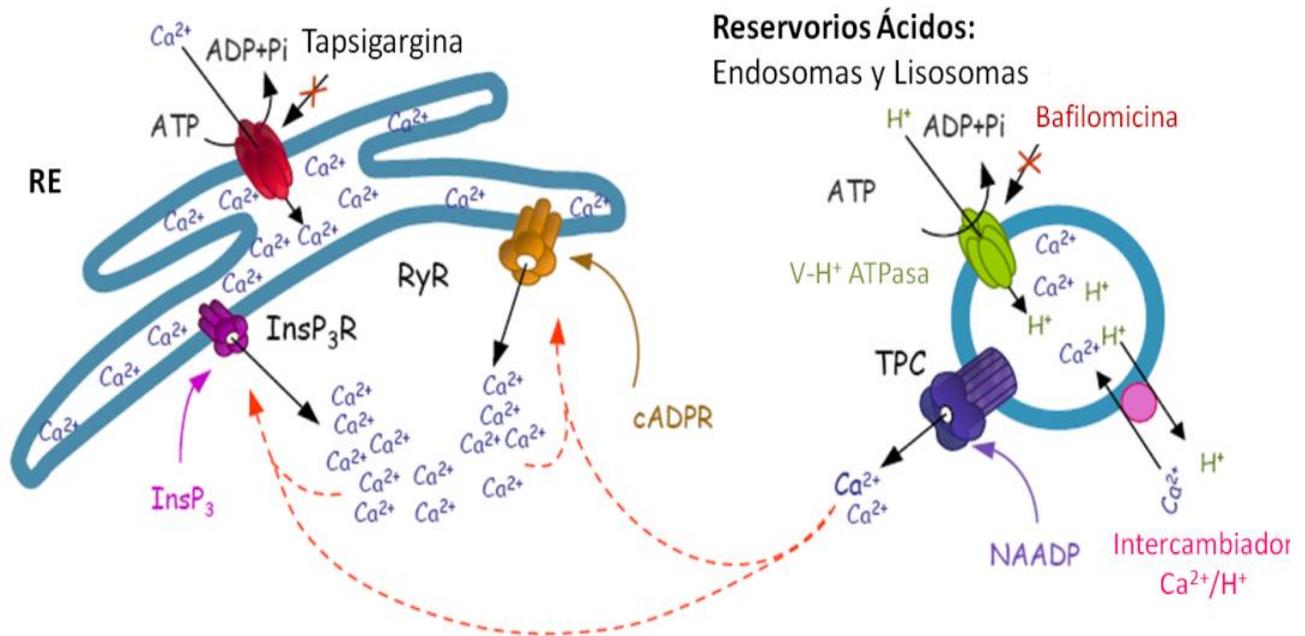


Figura 5. Comunicación entre reservorios internos de Ca²⁺ inducida por NAADP. Tanto el retículo endoplásmico (RE) como los reservorios ácidos (endosomas y lisosomas) son los principales reservorios de Ca²⁺. Los receptores de IP₃ (InsP₃R) y los receptores de rianodina (RyR) regulan la liberación de Ca²⁺ del RE. Ambos tipos de receptores se activan por sus ligandos (IP₃ y cADPR, respectivamente) así como por la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (líneas rojas punteadas). El contenido de Ca²⁺ en el RE se mantiene gracias a la ATPasa de Ca²⁺, la cual es sensible a Tapsigargina. Por el contrario, el NAADP induce la liberación de Ca²⁺ de reservorios ácidos. Uno de los canales propuestos como blanco del NAADP son los canales de dos poros o TPC por sus siglas en inglés. La bomba de protones vacuolar (V-H ATPasa), sensible a Bafilomicina, acidifica el lumen de endosomas y lisosomas, mientras que el intercambiador Ca²⁺/H⁺ permite la acumulación de Ca²⁺ en reservorios ácidos siempre y cuando haya H⁺ en el lumen. Por lo tanto, es posible eliminar el contenido de Ca²⁺ del reservorio ácido al agregar Bafilomicina, eliminar los H⁺ del medio y permitir que el Ca²⁺ salga a través de los mecanismos de fuga. La liberación de Ca²⁺ inducida por el NAADP amplifica la señal de Ca²⁺ intracelular al activar el mecanismo de liberación de Ca²⁺ inducido por Ca²⁺ de otros reservorios (líneas rojas punteadas).

En el modelo se propone que el NAADP es el inductor más potente de salida de Ca²⁺ de reservorios ya que es capaz de activar la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (CICR), es decir, esta primera salida de Ca²⁺, activa a receptores de IP₃ o de rianodina, vaciando otros reservorios de Ca²⁺ amplificando la señal,

funcionando como un disparador o gatillo de la señalización por Ca^{2+} (Calcraft et al. 2009). Mecanismo que probablemente ocurra durante la RA del espermatozoide.

Como se mencionó anteriormente, un incremento sostenido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por minutos se asocia con la RA. Existen varios reportes en los que se indica que los reservorios internos participan en este incremento, los cuales liberan su contenido de Ca^{2+} a través del receptor de IP_3 (Darszon et al. 2011; Florman, Jungnickel, and Sutton 2008; Publicover, Harper, and Barratt 2007) y del receptor de rianodina tipo 3 en espermatozoides maduros (Giannini et al. 1995; Treviño et al. 1998; Chiarella et al. 2004). La liberación de Ca^{2+} de los reservorios activa a los canales de Ca^{2+} activados por el vaciamiento de pozas (SOCs) ocasionando un incremento de Ca^{2+} sostenido. Se han identificado a los componentes de la respuesta SOC en el espermatozoide de ratón y humano como son las proteínas STIM, Orai y TRPC. STIM es una proteína localizada en la membrana de reservorios de Ca^{2+} como el RE, cuando se libera Ca^{2+} del reservorio, STIM se desplaza hacia la membrana plasmática y activa la entrada de Ca^{2+} a través de los canales TRPC y Orai, incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el citoplasma y restableciendo la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los reservorios (Costello et al. 2009; Darszon et al. 2012).

En cuanto al estudio de segundos mensajeros que movilizan Ca^{2+} , uno de los primeros trabajos en el espermatozoide fue el de Walensky & Snyder en 1995 donde reportaron la presencia de componentes del sistema de señalización de fosfoinosítidos en el espermatozoide de mamífero. Identificaron tanto proteínas G como isoformas de la fosfolipasa C (PLC) en la región acrosomal del espermatozoide, las cuales generan IP_3 (Walensky and Snyder 1995).

Más adelante Billington et al., en el 2006 publicó uno de los primeros trabajos donde se analizó la presencia de otros segundos mensajeros que movilizan Ca^{2+} como la ADPRc y el NAADP, encontrando una maquinaria de síntesis activa que es capaz de sintetizar concentraciones micromolares de ADPRc en el espermatozoide humano. Sin embargo, con los métodos utilizados no detectaron NAADP (Billington et al. 2006). Años después, en un estudio de espermatozoides fusionados con prostasomas se reportó nuevamente la presencia de ADPRc pero no de NAADP en espermatozoides humanos (Park et al. 2011). Sin embargo, en el 2010 Vasudevan et al., en espermatozoides de erizo de mar, reportó que el incremento de Ca^{2+} , inducido por la gelatina de los ovocitos, estimula la síntesis de NAADP y presenta canales sensibles a este compuesto que liberan Ca^{2+} del acrosoma (Vasudevan et al. 2010). La participación del NAADP en el espermatozoide humano no es clara y es importante utilizar otro tipo de metodologías para establecer de manera precisa su participación en la reacción acrosomal del espermatozoide.

El NAADP se sintetiza en respuesta a varios estímulos externos dependiendo del tipo celular a partir del NADP y ácido nicotínico mediante las ADPRibosil ciclasas que realiza un intercambio de bases generando el NAADP. De manera interesante, la misma enzima sintetiza ADPRc. Esta enzima se encuentra anclada en membrana y dependiendo del pH se favorece la síntesis de uno u otro compuesto. Es importante destacar que la enzima también se encarga de degradar el compuesto y su presencia se ha reportado en espermatozoides de erizo de mar (Vasudevan, Galione, and Churchill 2008) (Figura 6).

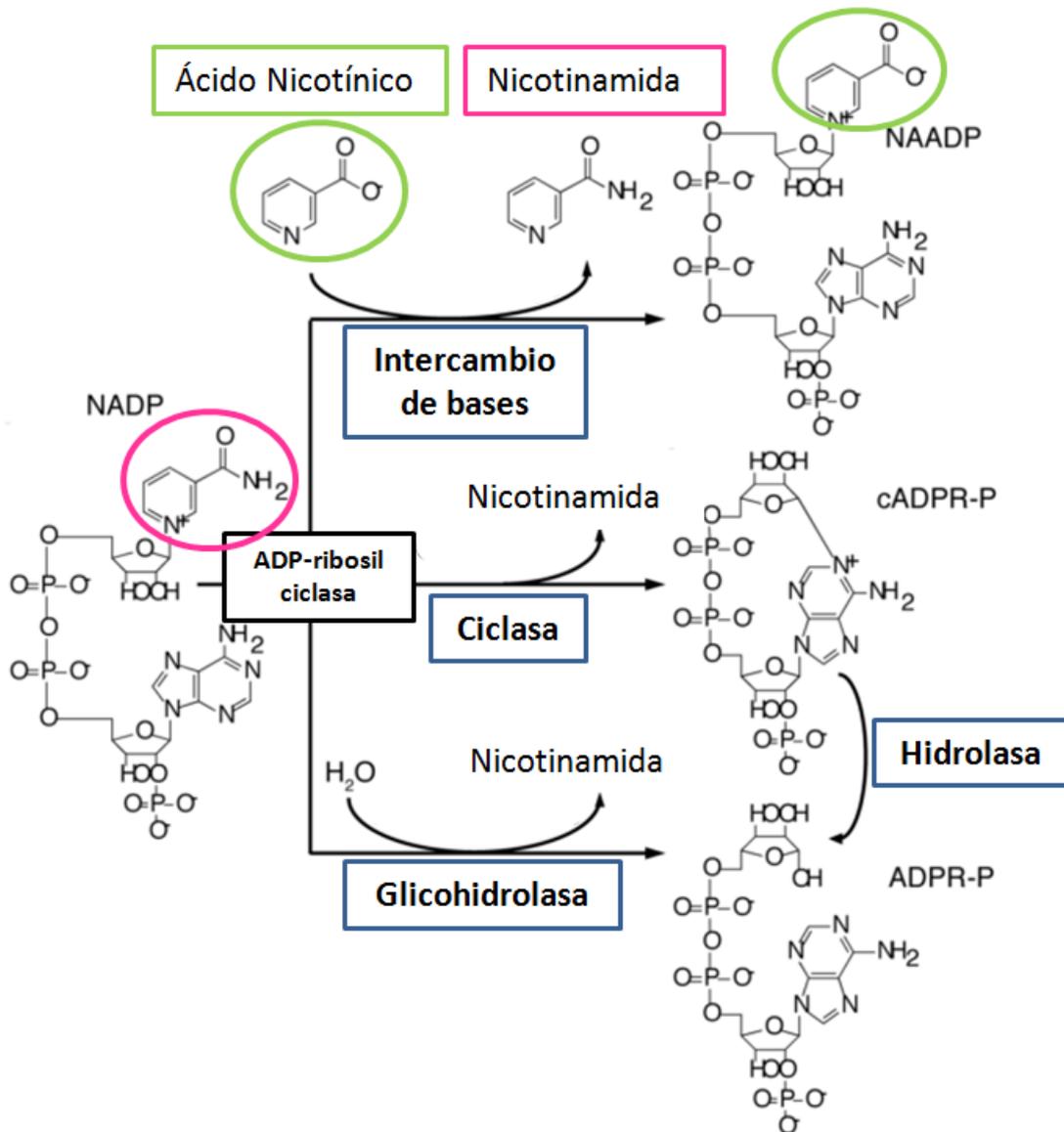


Figura 6. Reacciones catalizadas por las ADP-ribosil ciclasas. A partir del NADP y ácido nicotínico (verde), las ADP-ribosil ciclasas realizan un intercambio de bases generando el NAADP. Estas enzimas también tienen actividad de ciclasas generando la ribosa cíclica ADPR. Otras reacciones que también llevan a cabo las ADP ribosil ciclasas son hidrocilaciones que sintetizan ADP ribosil fosfato (Tomado de Vasudevan et al., 2008).

El descubrimiento del NAADP como segundo mensajero que moviliza Ca^{2+} comenzó con los trabajos de Lee y colaboradores quienes observaron que un derivado del NADP era capaz de inducir incrementos en el Ca^{2+} en homogenados de ovocitos de erizo de mar (Clapper et al. 1987). En estudios posteriores, purificaron y separaron los derivados obtenidos del tratamiento alcalino del NADP. El ensayo mostró que el derivado activo era distinto al NADP y al NADPH, el peso molecular del compuesto activo era una unidad mayor al NADP y que ni el NADP ni el NAAD eran capaces de movilizar Ca^{2+} incluso al adicionar elevadas concentraciones, mientras que el NAADP provocó una liberación de Ca^{2+} con una EC_{50} de 30 nM (Lee, Aarhus, and Graeff 1995). Años después, el mismo grupo mostró que el NAADP es capaz de liberar Ca^{2+} de reservorios distintos a los activados por la ADPRc, esto lo demostraron utilizando ovocitos de erizo de mar, los cuales, al centrifugarlos, se polarizan dejando de un lado el RE y de otro los reservorios ácidos como endosomas y lisosomas. Mostraron visualmente los reservorios de Ca^{2+} sensibles a ADPRc y a NAADP utilizando técnicas de fluorescencia que permiten generar imágenes de Ca^{2+} . Los resultados mostraron que los reservorios a pesar de estar separados físicamente, interaccionan durante la fecundación (Lee and Aarhus 2000). Los organelos blancos del NAADP se identificaron posteriormente como reservorios ácidos relacionados con lisosomas (Grant C Churchill et al. 2002). Además, Churchill & Galione mostraron que el NAADP induce oscilaciones de Ca^{2+} que inician al liberar Ca^{2+} de reservorios ácidos y continúan al inducir la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) (G C Churchill and Galione 2001).

Como podemos ver, la participación del NAADP en la movilización de los reservorios de Ca^{2+} era clara. Sin embargo, por mucho tiempo no se tenía claro el blanco de este segundo mensajero y a la fecha existe una gran controversia en el campo.

El hecho de que el NAADP moviliza Ca^{2+} a través de un mecanismo distinto fue claro desde el principio ya que la respuesta era insensible a los inhibidores de los incrementos de Ca^{2+} inducidos por IP_3 , ADPRc o rianodina (Lee and Aarhus 1995).

Dentro de los receptores propuestos considerados como ligandos del NAADP están: los canales catiónicos TRP-ML1 localizados en reservorios ácidos (Zhang and Li 2007) y los canales de dos poros o TPC por sus siglas en inglés (Two Pore Channels), también expresados en lisosomas y endosomas (Calcraft et al. 2009).

Muallem y colaboradores analizaron la posible interacción física y funcional entre TRP-ML1 y los canales TPC. TRP-ML1 colocaliza e inmunoprecipita con los canales TPC2 (Yamaguchi et al. 2011). Sin embargo, la sobreexpresión de los TPC potencia la respuesta de NAADP a diferencia de la sobreexpresión de

TRP-ML1. Además, las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por NAADP en células pancreáticas son idénticas en ratones silvestres y en ratones nulos para TRP-ML1. Estos resultados muestran que a pesar la interacción entre los canales, éstos funcionan como dos canales iónicos independientes y que los canales TPC, pero no los TRP-ML1, responden a NAADP (Yamaguchi et al. 2011).

A pesar de que se han demostrado los efectos del NAADP sobre los canales TPC, no se ha identificado el sitio de unión del NAADP en estos canales. Para detectar directamente éstos sitios de unión, Walseth y colaboradores desarrollaron un ensayo de fotoafinidad para el receptor del NAADP utilizando el, 5- N_3 -NAADP, el cual presenta las mismas propiedades de afinidad y especificidad para inducir la liberación de Ca^{2+} . La prueba detectó tres proteínas de 30, 40 y 45 kD en homogenados de ovocitos de erizo de mar, lo cual no coincide con el peso de los canales TPC. Al utilizar células de mamífero (SKBR3, HEK293 y células pancreáticas de ratón) identificaron dos proteínas de unión de 22 y 23 kDa, las cuales son más abundantes en fracciones citosólicas pero también están unidas a membrana donde su afinidad al NAADP sobre el NADP es mayor (Lin-moshier et al. 2012).

Incluso al sobre expresar al TPC1 y TPC2 en las SKBR3 no observan cambios en el marcaje con respecto a las células control sin transfectar, lo que sugiere que los TPC no se unen directamente al NAADP. Incluso, al trabajar con células que carecen de TPC1 y TPC2 observan el mismo patrón donde interaccionan proteínas de 22 y 23 KDa. Estos resultados sugieren que la estrategia de fotoafinidad no puede detectar a los TPC o que los TPC no se unen directamente al NAADP (Guse 2012).

Un reporte reciente identificó un posible ligando de canales TPC, al hacer un ensayo para identificar interacciones proteína-proteína utilizando los dominios intracelulares de TPC2, encontraron que tanto TPC1 como TPC2 se unen a la proteína antiapoptótica Hax-1, la cual se localiza predominantemente en citoplasma e interacciona con el dominio C terminal de TPC2 (Lam and Galione 2013). Sin embargo, no se han comprobado efectos fisiológicos de la unión de Hax-1 a los canales TPC ni la manera en cómo esta asociación contribuye en funciones celulares.

Por el momento podemos asumir que los canales TPC no son los únicos blancos del NAADP y que este segundo mensajero interactúa con pequeñas proteínas citosólicas. Probablemente, estas proteínas citosólicas se unen a diferentes canales iónicos, lo que explicaría la habilidad del NAADP para regular varios canales.

Para poder entender con mayor detalle las funciones celulares que son reguladas por el NAADP, es importante desarrollar herramientas que faciliten el estudio de este “nuevo” segundo mensajero. Uno de los retos principales que presenta el estudio del NAADP, es una característica de todos los segundos mensajeros celulares y es el hecho de ser una molécula cargada, lo cual funciona muy bien para las células ya que evita la salida de la molécula a través de la membrana. Esta característica es muy efectiva desde el punto de vista biológico pero, desde el punto de vista experimental, genera dificultades importantes, ya que estos segundos mensajeros deben ser inyectados, cargados vía liposomas o electroporados. Todas estas técnicas son experimentalmente demandantes, crean alteraciones celulares que afectan la fisiología de la célula y por lo tanto los resultados observados y sólo se pueden utilizar en determinados tipos celulares y claramente no en espermatozoides.

Una de las herramientas que ayudó de manera importante al entendimiento y caracterización del IP_3 como segundo mensajero de Ca^{2+} fue el desarrollo del IP_3 permeable, en el que los grupos cargados de este segundo mensajero se enmascararon con esterificaciones que le permiten al IP_3 atravesar la membrana plasmática y una vez dentro de la célula, con ayuda de enzimas estererasas, se retiran las esterificaciones, se exponen las cargas del segundo mensajero las cuales impiden la salida del IP_3 , generando la acumulación de este segundo mensajero, permitiendo su acción en el interior celular.

Utilizando la misma estrategia con la que sintetizaron IP_3 , Parkesh y colaboradores publicaron en el 2007 la síntesis de un análogo permeable del NAADP utilizando el acetoximetil éster (AM) para generar NAADP-AM (Figura 7), el cual es capaz de inducir señalizaciones de Ca^{2+} reguladas por NAADP. De igual manera, mostraron que el NAADP-AM entra en las células y que las estererasas retiran los grupos AM liberando al NAADP y haciéndolo biológicamente funcional en el interior de la célula. Este tipo de herramientas facilitan de manera importante la investigación en el campo sobre el papel fisiológico del NAADP.

De igual manera, el desarrollo de inhibidores específicos es fundamental para caracterizar cascadas de señalización como la movilización de Ca^{2+} inducida por NAADP en el espermatozoide. Naylor en el 2009 reportó que el Ned-19 es un bloqueador potente de la liberación de Ca^{2+} inducida por NAADP, además de ser específico y permeable. Esto lo demostró midiendo cambios en el Ca^{2+} en un homogenado de ovocitos de erizo de mar, inducidos por NAADP. La preincubación con 100 μM de Ned-19 inhibe completamente la respuesta inducida por NAADP pero no la de la cADPR ni la del IP_3 (Naylor et al. 2009). Otros fármacos que se han utilizado para caracterizar la comunicación entre reservorios de Ca^{2+} son la Bafilomicina (1 μM) un inhibidor de la ATPasa de H^+ vacuolar la cual, permite mantener el gradiente de protones necesario para la entrada de Ca^{2+} en el reservorio ácido o bien la Glicil-L- Fenilalanina-2-Naftilamida o GPN (50 μM), un

disruptor osmótico de los lisosomas (Vasudevan et al., 2008). Recientemente se reportó que el compuesto BZ194 inhibe selectivamente la respuesta inducida por NAADP en células T (Dammermann et al. 2009).

Para caracterizar este tipo de señalización en nuestro modelo celular es importante destacar que el espermatozoide es una célula altamente diferenciada que carece de retículo endoplásmico, de Aparato de Golgi y de toda la maquinaria de síntesis de proteínas. Es una célula que no se puede cultivar ni transfectar. En esta célula se proponen como reservorios de Ca^{2+} al acrosoma, que es una vesícula ácida derivada del Golgi, a la envoltura nuclear redundante localizada en la parte posterior del núcleo y al collar de mitocondrias presentes en pieza media (Figura 1). Se desconoce cómo interaccionan estas pozas entre sí y si el NAADP participa esta interacción en el espermatozoide humano.

Existen varias razones en las que nos podemos basar para hipotetizar que NAADP participa en la reacción acrosomal:

- El acrosoma es un organelo ácido relacionado con los lisosomas (Dell'Angelica et al. 2000) y el NAADP libera Ca^{2+} de organelos similares a lisosomas en varios tipos celulares (Grant C Churchill et al. 2002; Galione and Petersen 2005).
- La farmacología utilizada para inhibir la señalización de Ca^{2+} en la RA como el verapamil, un inhibidor de canales de Ca^{2+} activados por voltaje o como el SKF96365 también bloquean la liberación de Ca^{2+} inducida por NAADP (Hohenegger et al. 2002; Morgan and Galione 2008).
- En el espermatozoide de erizo de mar, Vasuderman et al., en el 2010 reportó que el incremento de Ca^{2+} estimula la síntesis de NAADP y presenta canales sensibles a este compuesto que liberan Ca^{2+} del acrosoma (Vasudevan et al. 2010).
- Al inducir la RA en el espermatozoide humano se observa una propagación del Ca^{2+} que comienza en la pieza media del espermatozoide y se propaga hacia la parte anterior de la cabeza en un periodo de 12 s, lo que nos indica un proceso de señalización y no de difusión entre éstos dos reservorios de Ca^{2+} (Figura 4). En otros tipos celulares, NAADP regula la comunicación entre reservorios liberando Ca^{2+} de reservorios ácidos, que inducen la respuesta CICR (Calcraft et al. 2009) y es probable que esto esté ocurriendo durante la RA.

La caracterización detallada de las moléculas que participan en la cascada señalización que induce la RA contribuye al entendimiento de ciertas patologías en los procesos de fecundación y su posible tratamiento. Así mismo, el estudio de estos procesos puede ayudar al desarrollo de anticonceptivos masculinos reversibles.

Hipótesis

El NAADP es capaz de liberar Ca^{2+} de reservorios ácidos, incrementando los niveles intracelulares de Ca^{2+} que inducen la reacción acrosomal del espermatozoide humano.

Objetivo General

Analizar la respuesta de Ca^{2+} inducida por NAADP y su farmacología en espermatozoides de humano.

Objetivos Particulares

- ✓ Sintetizar NAADP-AM.
- ✓ Analizar la movilización de Ca^{2+} inducida por diferentes concentraciones de NAADP-AM en una población de espermatozoides humanos cargados con fluo3 AM utilizando el espetrofluorómetro.
- ✓ Probar los efectos de diferentes concentraciones de los inhibidores de la señalización de NAADP, como el Ned-19, el GPN y la Bafilomicina en la señalización de Ca^{2+} del espermatozoide.
- ✓ Identificar reservorios ácidos en el espermatozoide humano.
- ✓ Estudiar la movilización de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} al eliminar el Ca^{2+} externo analizando imágenes de célula única del espermatozoide.

Métodos

Síntesis de NAADP-AM

El NAADP se sintetizó a partir de NADP (1 mM) y ácido nicotínico (100 mM) utilizando una reacción de intercambio de bases catalizada por una ADP-ribosil ciclasa (17–83 ng/ml) a pH 5, la reacción es lineal y a los 30 min, a temperatura ambiente, el 60% del sustrato está presente (Aarhus et al. 1995). Disolvimos el NAADP (0.030 g, 0.040 mmol) en 0.5 ml de diisopropiletilamina (DIEA) ($C_8H_{19}N$) y evaporamos para formar la sal diisopropiletilamonio, este procedimiento se repitió tres veces. La sal se disolvió en 2 ml de acetonitrilo (CH_3CN), el cual disuelve un amplio rango de compuestos iónicos y compuestos no polares. Agregamos nuevamente DIEA (0.026 g, 0.201 mmol) a la mezcla y dejamos agitar a temperatura ambiente por 15 min bajo una atmósfera de gas argón, el cual es un gas más denso que el oxígeno y desplaza toda la humedad que hay en el ambiente evitando que moléculas de H_2O se unan al NAADP, la hidraten e impidan su esterificación. Adicionamos lentamente acetoximetil bromida (0.031 g, 0.201 mmol) y dejamos en agitación por 24 h (Figura 7). Comprobamos la desaparición del material inicial NAADP mediante cromatografía (H_2O : metanol: ácido acético: 10:3:0.2). Filtramos los sólidos de la reacción y evaporamos la solución hasta secarla y observar un sólido amarillo claro. El sólido se lavó con éter para eliminar el acetoximetil bromida que no reaccionó.

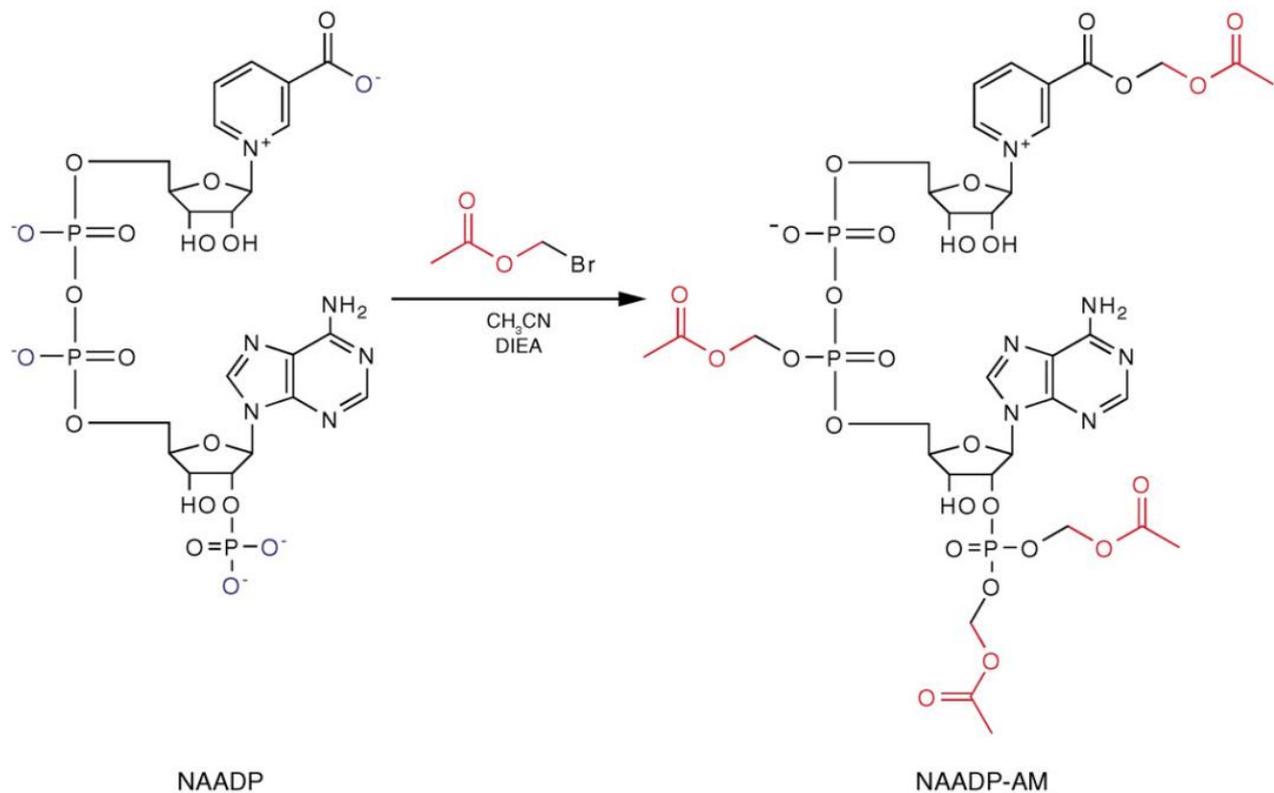


Figura 7. Síntesis del NAADP-AM. De lado izquierdo se muestra la estructura del NAADP resaltando en azul las cargas negativas de la molécula. Al adicionar acetoximetilbromida se esterifican y enmascaran las cargas negativas del NAADP por grupos acetoximetil indicados en rojo del lado derecho de la reacción (Tomado de Parkesh et al. 2008).

Obtención de espermatozoides

En todos los experimentos se utilizaron espermatozoides que se obtuvieron de muestras de donadores sanos, con un periodo de abstinencia sexual entre 2 y 7 días y que cumplieran con los parámetros de la Organización Mundial de la Salud (Tabla 1). Cada muestra de semen se colectó en el laboratorio dentro de un frasco de plástico estéril. Después de la eyaculación, el semen presenta una consistencia semi sólida con cuerpos coagulados, para favorecer la heterogeneidad de la muestra, el frasco se incubó en una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂ durante ~40 minutos, promoviendo que la muestra comienza a licuarse, es decir a mezclarse, perder su espesor e hidratarse (Ota et al. 2013)(Edition). Posteriormente, los espermatozoides móviles se separaron del semen mediante la técnica de swim-up (*nado hacia arriba*) (Figura 8) (Makler 1984).

Parámetro	Valor límite de referencia mínimo
Volumen	> 1.5ml
pH	7.2-7.8
Concentración Espermática	>20 x10 ⁶ de espermatozoides por ml
Cantidad Total de Espermatozoides	>40 x10 ⁶
Movilidad	>40% con movilidad progresiva o > 25% con movilidad progresiva lineal
Morfología	> 4% espermatozoides con morfología normal
Viabilidad	> 50% espermatozoides vivos.

Tabla 1. Valores de referencia mínimos del semen humano. Parámetros de la Organización Mundial de la Salud determinados por una distribución normal de la población fértil (Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano, 2011).

El método de nado hacia arriba se basa en la migración de los espermatozoides del fluido seminal hacia a una capa superior de medio artificial dentro de un tubo de ensayo, es decir, únicamente los espermatozoides que son capaces de moverse pueden nadar a la fase superior, las células inmóviles permanecen en la fase inferior. En este caso se colocó dentro de un tubo, 500 µl de semen previamente licuado, y sobre este se agregó 500 µl de medio HAM's F-10 suplementado 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 400 µl superiores de la fase de medio HAM's F-10, y se realizó un lavado (3500 rpm, 5 min). Finalmente se ajustó la concentración de espermatozoides (1X10⁶/ml).

Los espermatozoides móviles (1X10⁶/ml) se incubaron en medio HAMS suplementado durante 5 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.

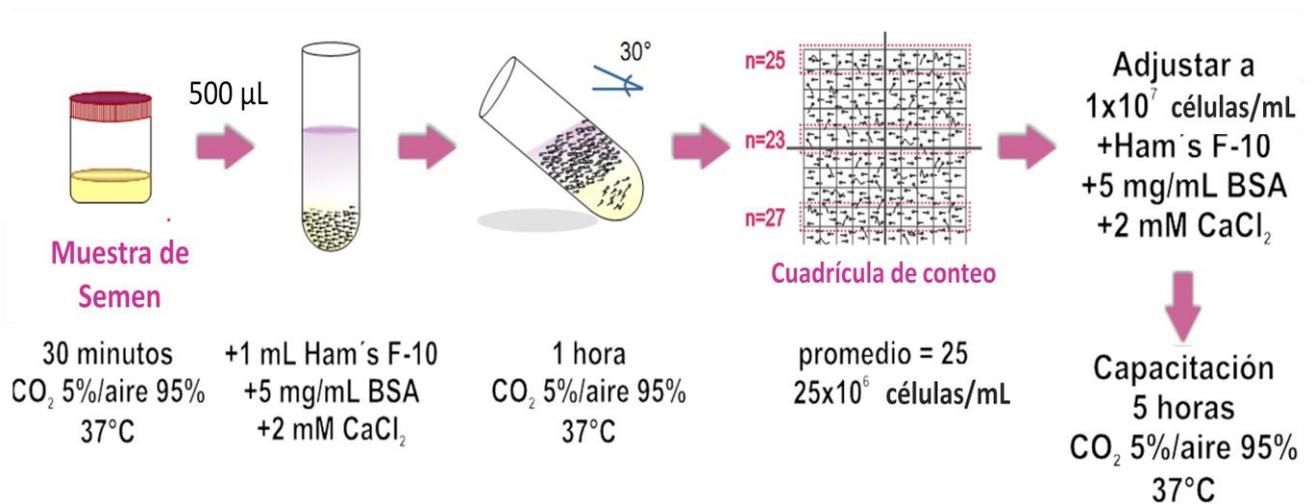


Figura 8. Diagrama esquemático del protocolo experimental para la separación de espermatozoides móviles de la muestra mediante el método de swim up (nado hacia arriba). La muestra se incuba por un periodo de 30 min a 37°C con 5% de CO₂ para disminuir su viscosidad, se colocan 500 µl de la muestra en el fondo de los tubos de ensayo y sin romper las fases se agrega 1 ml del medio Ham's suplementado con BSA y CaCl₂ a cada uno. Los tubos se inclinan 30° para facilitar el nado de los espermatozoides móviles hacia la fase superior y se incuban nuevamente a 37°C con 5% de CO₂ durante 1 hora. Posteriormente, recuperamos 400 µl de la fase superior de cada uno de los tubos colectándolos en un solo tubo, tomamos 10 µl para cuantificar la concentración de la células utilizando la cámara Makler, cuantificamos el número de espermatozoides móviles presentes en tres filas o columnas de la cuadrícula. El promedio del conteo de estas nos indica el millón de células por mililitro. Ajustamos la concentración de células y capacitamos durante 5 horas a 37°C con 5% de CO₂ (Modificado de (Mata-Martínez et al. 2013).

Incorporación del indicador Fluorescente

La medición del cambio en la concentración de Ca²⁺ intracelular se hizo empleando el colorante fluorescente sensible a Ca²⁺ fluo3 AM. Para introducir el colorante en las células capacitadas, diluimos la concentración de células que se ocuparon dependiendo del tipo de experimento en un volumen de 1 ml con una concentración final de 2 µM de fluo3 AM e incubamos 30 min a 37°C con 5% de CO₂. Al terminar lavamos las células y resuspendimos en medio de registro ajustando la concentración a 100 millones de espermatozoides por ml.

Medición de cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en una población de espermatozoides

Los registros de Ca^{2+} se obtuvieron utilizando un Espectrofluorómetro SLM-AMINCO operado por el software de adquisición OLIS Global Works. Para excitar al fluoróforo Fluo3AM utilizamos una longitud de excitación de 505 nm registrando la longitud de emisión de 525 nm. En la cámara de muestra del fluorómetro colocamos un tubo de ensayo con 570 μ l de medio de registro, 30 μ l de la suspensión de espermatozoides (100×10^6 espermatozoides/ml) y una barra magnética para agitar la muestra. Los datos se adquieren con una frecuencia de 0.5 Hz durante 6 min.

Análisis de datos de las mediciones de Ca^{2+} en población

La computadora registra la intensidad de fluorescencia captada por el espectrofluorómetro a lo largo del tiempo mediante el programa OLIS GlobalWorks. Los datos se importan de este programa a Excel en donde hicimos el análisis y las gráficas de fluorescencia contra tiempo. En el eje de las Y graficamos $(F/F_0)-1$, donde F es la fluorescencia registrada a lo largo del tiempo y F_0 es el promedio de la intensidad de fluorescencia que se registra en los primeros 50 segundos del trazo.

En las gráficas de barras se indican las deltas parciales (ΔP), es decir, la diferencia de la intensidad máxima de fluorescencia obtenida después de la adición de un compuesto (NAADP-AM ó Progesterona) y la intensidad de la fluorescencia pocos segundos antes de la adición del mismo. Además, los datos graficados están normalizados a la respuesta control, es decir, el control representa el 100% de la respuesta del NAADP-AM ó Progesterona indicando los errores estándar que se obtuvieron ($n=3$).

Los datos los ajustamos a la ecuación de Hill para calcular la IC_{50} de los inhibidores utilizando el programa Sigma Plot 11. El programa permite hacer un ajuste con la función de Hill de los datos experimentales para determinar la concentración del inhibidor que se requiere para bloquear la mitad de la respuesta máxima.

Identificación de los reservorios ácidos en el espermatozoide humano

Una vez terminada la capacitación de los espermatozoides, retiramos el medio capacitante y resuspendemos en 500 μ l de medio de registro (en mM: NaCl 94, KCl 4, $MgSO_4$ 1, HEPES 30, ácido láctico 10, $CaCl_2$ 2, $NaHCO_3$ 1, dextrosa 5). La muestra se separa en 4 tubos con 100 μ l cada uno. Uno de los tubos se utiliza a manera de control. El segundo se incubó 20 min con 1 μ M de LysoTracker (colorante fluorescente

unido a aminas básicas débiles parcialmente protonadas en pH neutro que se acumula en reservorios ácidos). El tercero con 3 μM de Bafilomicina, un inhibidor de la ATPasa Vacuolar, durante 1 hora. El cuarto tubo se incubó con la misma concentración de Bafilomicina durante el mismo periodo y posteriormente se le agregó 1 μM de LysoTracker por 20 min. Los espermatozoides se adhieren a los cubreobjetos tratados con Poly-L-Lisina 0.1% (diluida 1:10 en H_2O), se les agrega medio de registro y se observa la fluorescencia del LysoTracker al excitar con una longitud de 577 nm y de emisión de 590 nm utilizando el microscopio confocal de fluorescencia Bio-RAdMRC600, laser Kr-Ar, con tres líneas de excitación a 488 nm, 568 nm, 647 nm, adaptado a un microscopio de epifluorescencia Axioskop de Zeiss de óptica infinita, con objetivos 40X/0.75 Ph2, DIC y 100X1.3 Ph3 oil. El microscopio cuenta con un motor Z para realizar cortes ópticos, un digitalizador de imágenes y cámara fotográfica.

Sitios de unión del Ned-19 en el espermatozoide humano

El Ned-19 (donado amablemente por el Dr. Grant Churchill) además de ser un inhibidor potente del NAADP es un compuesto fluorescente permeable a la membrana plasmática (Figura 9). Incubamos los espermatozoides capacitados con 100 μM de Ned-19 en medio de registro durante 4 horas. Los espermatozoides se adhieren a los cubreobjetos tratados con Poly-L-Lisina (1:10 en H_2O), se les agregó medio de registro y se observa la fluorescencia al excitar con una longitud de 368 nm y de emisión de 425 nm utilizando el Microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico IX81 invertido con líneas laser de 405 nm, 458 nm, 488 nm, 514 nm, 543 nm, 633 nm utilizando un objetivo 60X S/1.3.

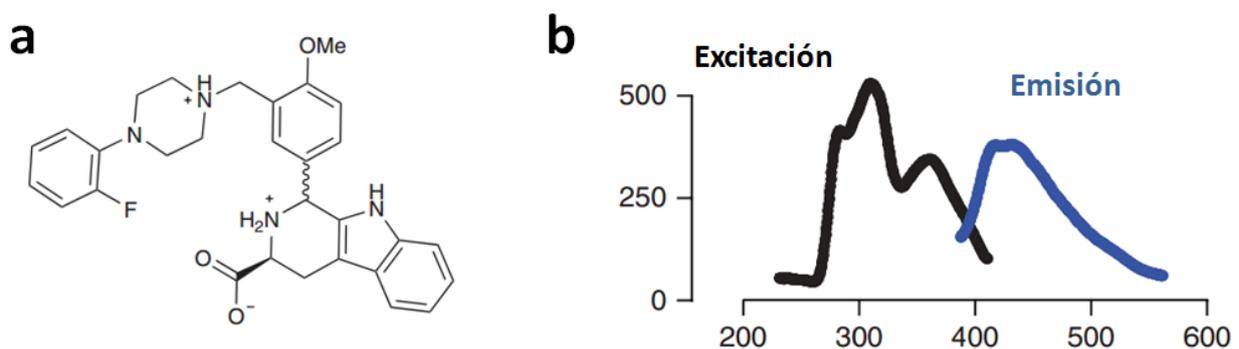


Figura 9. El Ned-19 es un compuesto fluorescente que inhibe la señalización del NAADP de manera selectiva. a) Estructura química del Ned-19. b) Espectro de excitación (368 nm) y emisión (425 nm) del Ned-19.

Adquisición de imágenes de espermatozoides cargados con Fluo3

El microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Eclipse, TE300) cuenta con una cámara CCD (“charge-couple device”, por sus siglas en inglés) de alta sensibilidad (DV887, Andor Ixon). La fuente de luz de excitación es un LED color cian (Lumileds Lighting LLC) conectado a un controlador estroboscópico y sincronizado con la cámara CCD. Las células se mantienen a 37°C con un controlador de temperatura (Medical System Corp, TC-202) junto con un calentador para objetivos (Warner Instruments, TC-124-A). Las imágenes se colectaron con un objetivo 60X (Nikon Plan Flour AN:1.40, de aceite). Se ocupó una resolución espacial de 2 x 2 (que corresponden a 512 x 512) que abarcan un campo de 200 x 200 μm . La velocidad de adquisición de imágenes fue de una imagen cada 250 ms.

Para adherir las células cargadas, los cubreobjetos se trataron con Poli-L-lisina (dilución 1:10) que permite que los espermatozoides se peguen por la cabeza permitiendo el movimiento libre del flagelo. Los datos se analizan utilizando el programa Andor y se exportan al programa Excel 2007 para su posterior análisis.

Análisis Estadístico

Para evaluar el nivel de significancia de los datos aplicamos el análisis de varianza ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de comparación múltiple Tukey-Kramer.

Resultados

Para poder determinar qué segundos mensajeros de Ca^{2+} son capaces de generar señales en el espermatozoide, cuantificamos los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en poblaciones de espermatozoides inducidos por diferentes concentraciones de ADPRc-AM y de NAADP-AM, dos segundos mensajeros permeables que a la fecha no se han probado en espermatozoides de humano y se desconocía si éstos eran capaces de inducir incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides humano.

Registramos la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo, colocando 3×10^6 células capacitadas cargadas con fluo3 AM en un volumen de 600 μl utilizando el medio de registro (ver material y métodos) suplementado con 2 mM de Ca^{2+} . En la figura 9 se muestran los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por la adición de diferentes concentraciones de ADPRc-AM a los 80 segundos del trazo, a los 130 segundos agregamos 4 μM de progesterona (Pg) a manera de control positivo. Como podemos ver en la figura 10, diferentes concentraciones de ADPRc-AM no inducen incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides humanos. Sin embargo, los espermatozoides responden a la progesterona, lo que nos indica que las células están vivas, que el colorante se incorporó de manera adecuada en la célula y que los espermatozoides son capaces de responder ante compuestos que incrementan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espermatozoide (Figura 10).

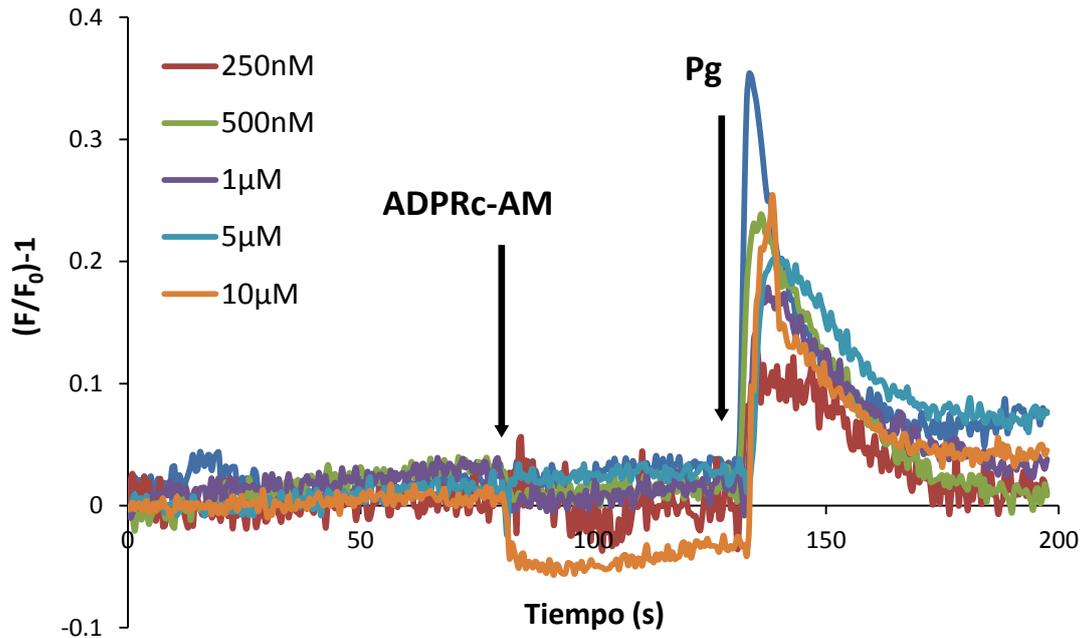


Figura 10. La ADPRc-AM no induce incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide humano. Se muestran trazos representativos de los registros la intensidad de la fluorescencia contra el tiempo de espermatozoides humanos cargados con fluo3 AM. A los 80 segundos adicionamos las concentraciones indicadas en cada trazo de ADPRc-AM. A los 130 segundos agregamos 4 μ M de Progesterona (Pg) como control positivo. (n=3).

En contraste con lo observado al agregar diferentes concentraciones de ADPRc-AM en espermatozoides humanos, el NAADP-AM induce incrementos en los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ de manera dosis dependiente, es decir, a mayor concentración de NAADP-AM mayor incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 11).

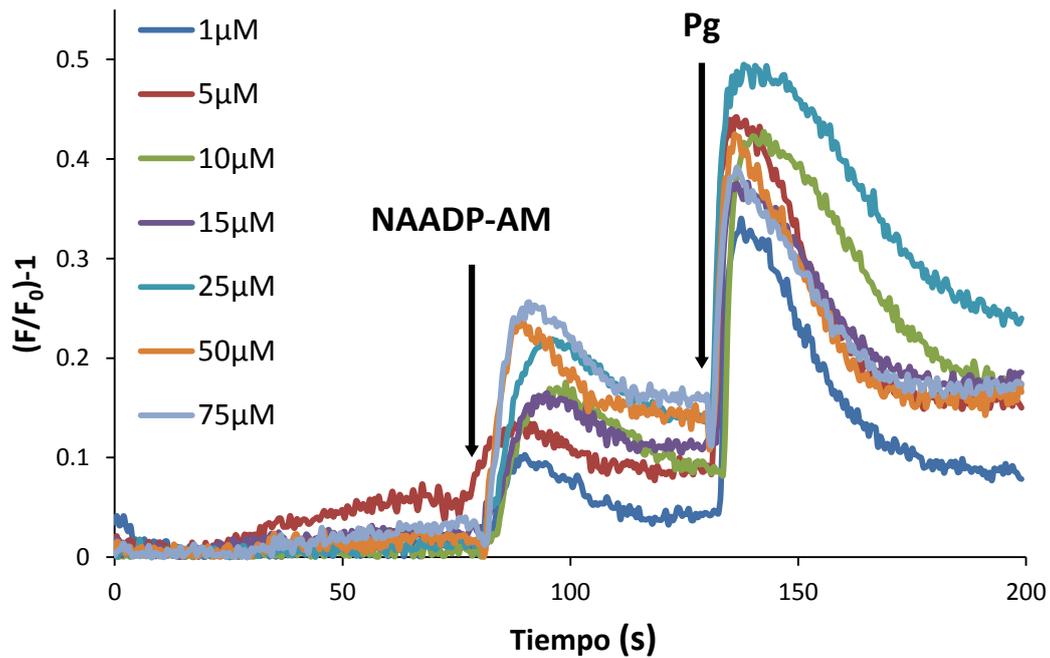


Figura 11. El NAADP-AM moviliza Ca^{2+} en el espermatozoide humano de manera dosis dependiente. Se muestran trazos representativos de los registros en la intensidad de la fluorescencia contra el tiempo de espermatozoides humanos cargados con Fluo3AM. A los 80 segundos adicionamos las concentraciones indicadas en cada trazo de NAADP-AM. A los 130 segundos agregamos 4 μM de Progesterona (Pg) como control positivo. (n=9).

La Figura 12 muestra la curva dosis respuesta del NAADP-AM utilizando un rango de concentraciones entre 0.1 μM y 150 μM , como control positivo utilizamos nuevamente 4 μM de Pg y como control negativo utilizamos 50 μM de NAADP no permeable (NP), con el cual no observamos incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

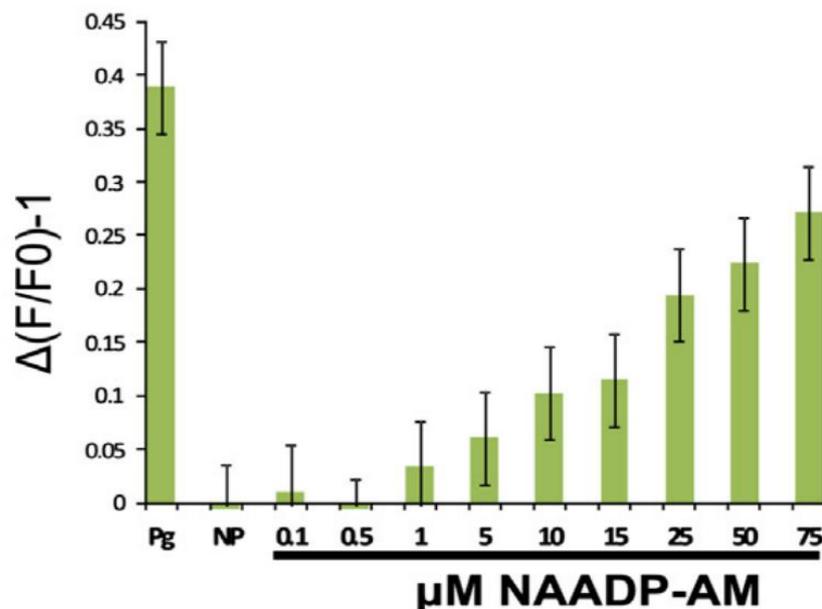


Figura 12. Curva dosis respuesta de los incrementos de Ca^{2+} inducidos por NAADP-AM en espermatozoides humanos. La fluorescencia máxima del fluo3 AM al agregar las diferentes concentraciones de NAADP-AM (n=6). Las barras indican el error. NP = 50 μM NAADP no permeable, Pg = 4 μM Progesterona.

Es importante destacar que la síntesis del NAADP-AM presenta problemas en la purificación. Al momento de hacer los lavados, el NAADP-AM tiende a hidrolizarse, por tal motivo, el NAADP-AM no es un compuesto puro. Al trabajar con concentraciones mayores a 50 μM , el NAADP-AM genera artefactos en la fluorescencia que se observan incluso al agregar NAADP-AM en medio de registro sin células. Por tal motivo, no es posible establecer la EC_{50} del NAADP-AM en el espermatozoide, ya que para esto es necesario obtener respuestas fisiológicas saturantes. Sin embargo, decidimos utilizar una concentración de 15 μM , la cual no es saturante, no presenta artefactos en la fluorescencia (Figura 11).

Para caracterizar de mejor manera la señalización del NAADP, utilizamos el Ned-19, el inhibidor específico de NAADP. Después incubar distintos tiempos y diferentes concentraciones del inhibidor determinamos que al incubar 100 μM de Ned-19 durante 10 minutos en agitación constante se inhibe el 75% del incremento de Ca^{2+} inducido por 15 μM de NAADP-AM (Figura 13).

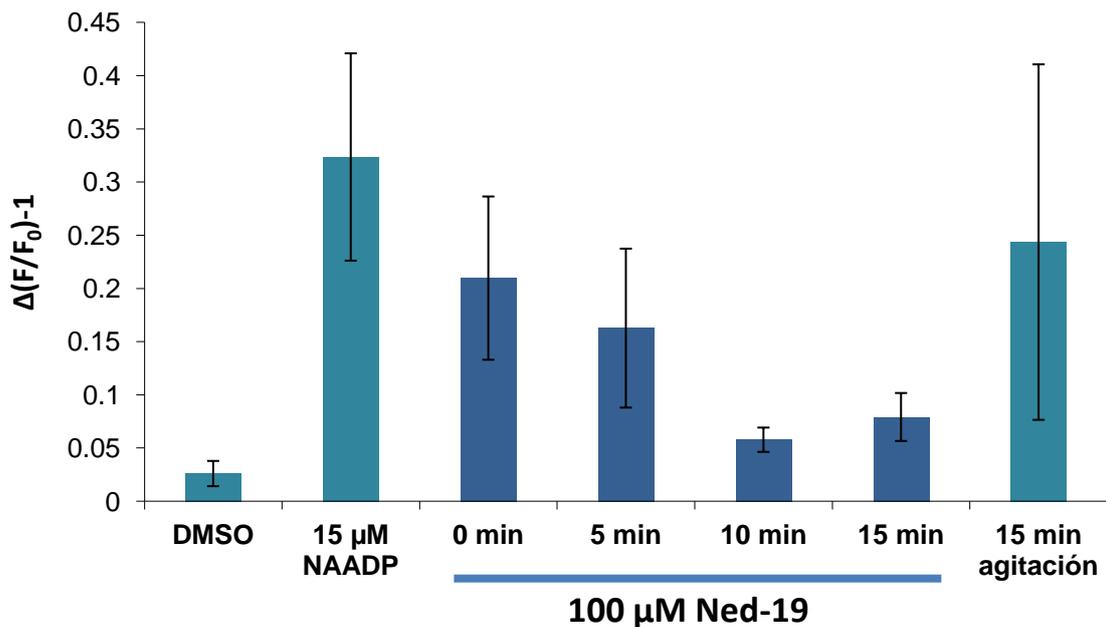


Figura 13. La incubación del Ned-19 por 10 minutos inhibe el incremento de Ca^{2+} inducido por NAADP-AM en la población de espermatozoides. Se indican los promedios de la fluorescencia máxima inducida por el NAADP-AM (graficada como la variación (Δ) de la fluorescencia (F) / fluorescencia inicial (F_0) en presencia de 100 μ M de Ned-19. El inhibidor se incubó entre 0 y 15 minutos en agitación constante. n=6. Las barras indican el error.

La incubación de 100 μ M de Ned-19 durante 10 minutos en agitación constante inhibe la señalización de Ca^{2+} inducida por 15 μ M de NAADP-AM de manera evidente pero no significativa estadísticamente. Es importante destacar que la agitación constante durante 15 min de las células no ocasiona diferencias significativas en los incrementos de Ca^{2+} inducidos por NAADP-AM.

El Ned-19, además de ser el inhibidor selectivo de la señalización del NAADP, es un compuesto fluorescente que presenta una longitud de excitación de 368 nm y una de emisión de 425 nm (Figura 8). Utilizamos esta propiedad para identificar los sitios de unión del Ned-19 en espermatozoides capacitados y de esta manera determinar indirectamente la localización de los canales TPC o del blanco del NAADP ya que aun no se ha comprobado de manera inequívoca que el NAADP se una directamente a los canales TPC (Figura 14).

Para poder determinar si los sitios de unión del Ned-19 en el espermatozoide son reservorios ácidos en los que el NAADP-AM podría liberar Ca^{2+} , incubamos los espermatozoides con LysoTracker Red o con LysoSensor Green. La fluorescencia de ambos indicadores refleja compartimentos ácidos donde se acumulan los indicadores y se utilizan generalmente como marcadores de lisosomas en muchos tipos celulares. Como

podemos ver en la figura 14 la fluorescencia del Ned-19 se superpone con la fluorescencia de ambos compuestos.

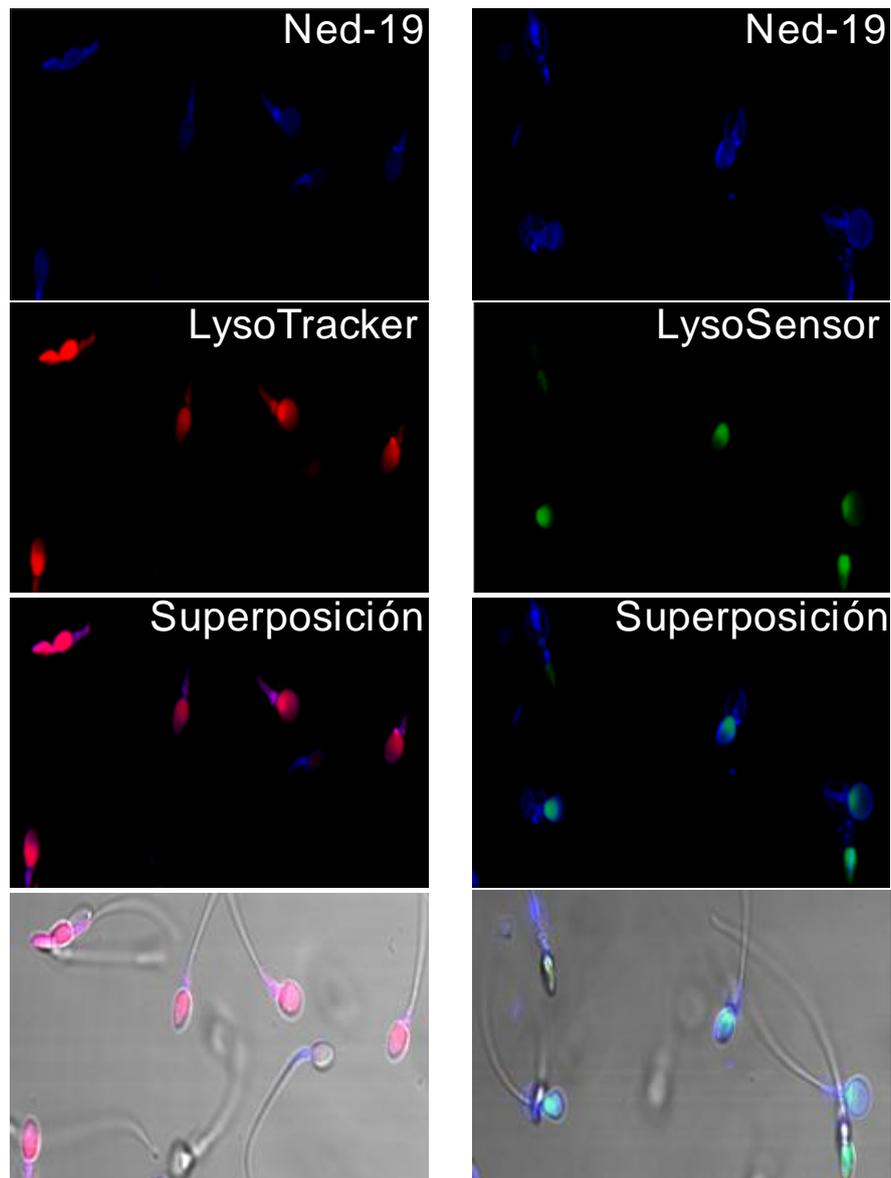


Figura 14. El análogo del NAADP (Ned-19) se acumula en reservorios ácidos en el espermatozoide humano. Imágenes de fluorescencia de espermatozoides incubados con Ned-19 y LysoTracker o LysoSensor. Se muestra la señal de fluorescencia de cada indicador y la superposición del Ned-19 y el LysoTracker así como la superposición del Ned-19 y el LysoSensor (n=3).

Tanto el LysoTracker como el LysoSensor emiten fluorescencia en la región de la cabeza y en la pieza media del espermatozoide humano, zonas donde se localiza la ENR y el acrosoma, ambos reportados como reservorios de Ca^{2+} en el espermatozoide (Costello et al. 2009) pero de los cuales se desconocía su naturaleza ácida. Para corroborar la acidez de estos compartimentos, incubamos las células con Bafilomicina, un inhibidor de la bomba de protones vacuolar. Al bloquear esta bomba de protones se disipa el gradiente de

protones y disminuye la fluorescencia de los colorantes dependientes de acidez. Como podemos observar en la figura 15 B, la Bafilomicina disminuye la tinción del LysoTracker Red, no afectando la tinción del MitoTracker. Otro método alternativo que disipa el gradiente de protones de reservorios ácidos es el uso del glicil-L-fenilalanina-2-naftilamida (GPN), un agente permeable a la membrana celular que se acumula en lisosomas donde se convierte en un producto impermeable por la enzima catepsina, resultado en la lisis del organelo (Berg et al., 1994). De manera consistente con los resultados obtenidos con la Bafilomicina, el GPN también disminuye la tinción del LysoTracker Red (Figura 15 C).

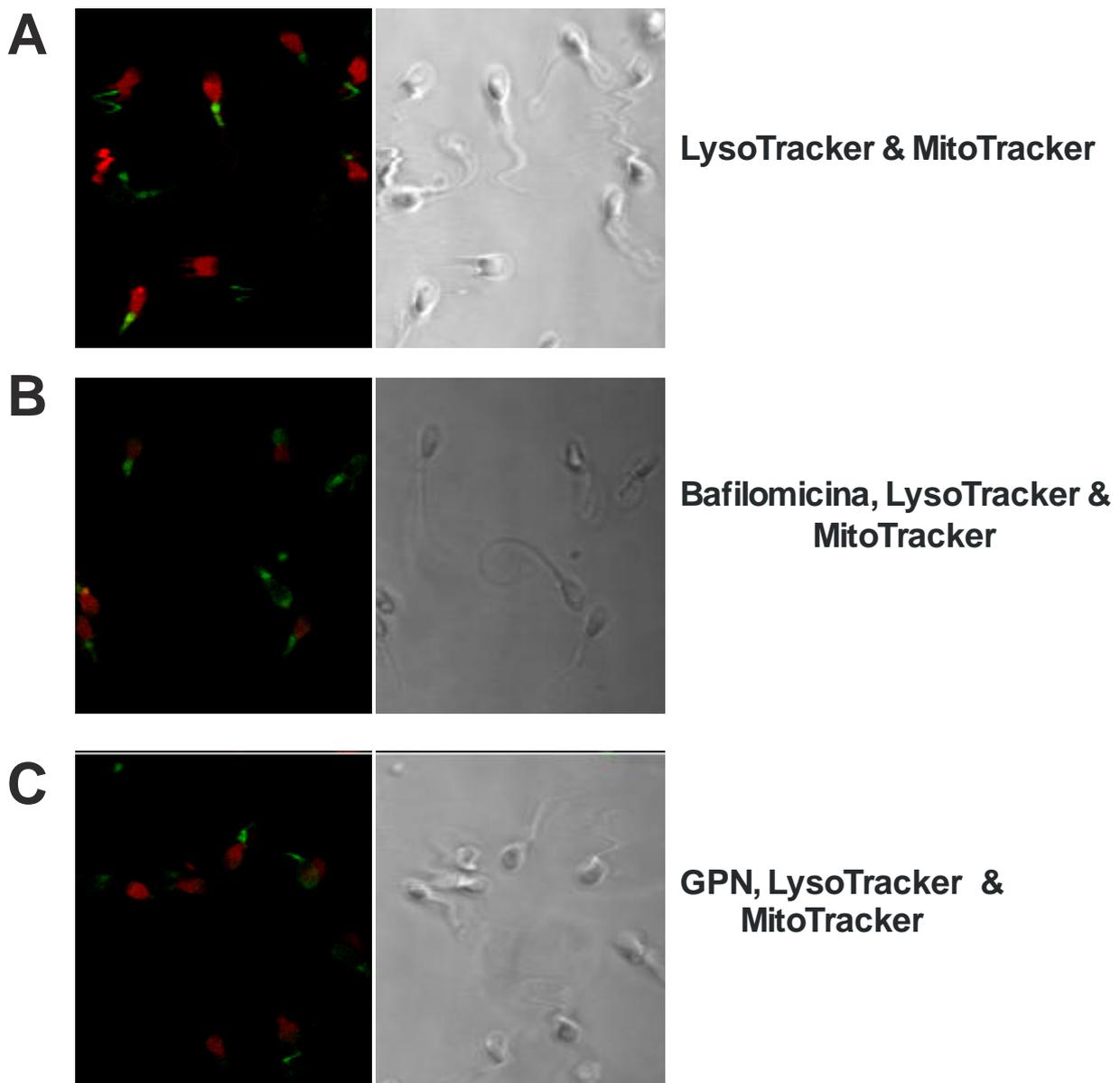


Figura 15. Los reservorios ácidos del espermatozoide humano son sensibles a Bafilomicina y GPN. a) (arriba) Imagen de Fluorescencia de células cargadas con LysoTracker (Ex=577 nm/ Em=590 nm), abajo; sobreposición del contraste de fases y la fluorescencia b) Espermatozoides incubados con 3 μ M de Bafilomicina (inhibidor de la ATPasa

de H⁺ vacuolar) no presentan fluorescencia c) La preincubación de los espermatozoides con 3 μM de Bafilomicina elimina la tinción con LysoTracker d) Los espermatozoides no presentan autofluorescencia en las longitudes de onda utilizadas. En b), c) y d) el inserto muestra la imagen de fluorescencia correspondiente a la imagen de contraste de fases. (n=3).

A pesar de que la Bafilomicina (3 μM) es capaz de disipar el gradiente de protones en el espermatozoide al incubarlo durante 1 h (Fig. 15 B), no inhibimos la respuesta del NAADP-AM al incubarlo con las distintas concentraciones de Bafilomicina durante 30 minutos o 1 hora, ni al incubarlo en agitación constante durante 15 minutos dejando otros 15 minutos de incubación. Por lo que probamos otros inhibidores como el GPN, el disruptor osmótico de los lisosomas para caracterizar la activación del NAADP.

El GPN es un tripéptido que se hidroliza por la enzima lisosomal catepsina C, la acumulación intralisosomal de los productos hidrolizados (amino ácidos) no difunden hacia a fuera del lisosoma por su polaridad causando la lisis osmótica de más del 90% de los lisosomas en otros tipos celulares (Berg et al. 1994). En la figura 16 podemos ver cómo al agregar 50 μM de GPN a los 30 segundos del trazo se inhibe tanto la movilización de Ca²⁺ inducida por NAADP-AM como por Progesterona.

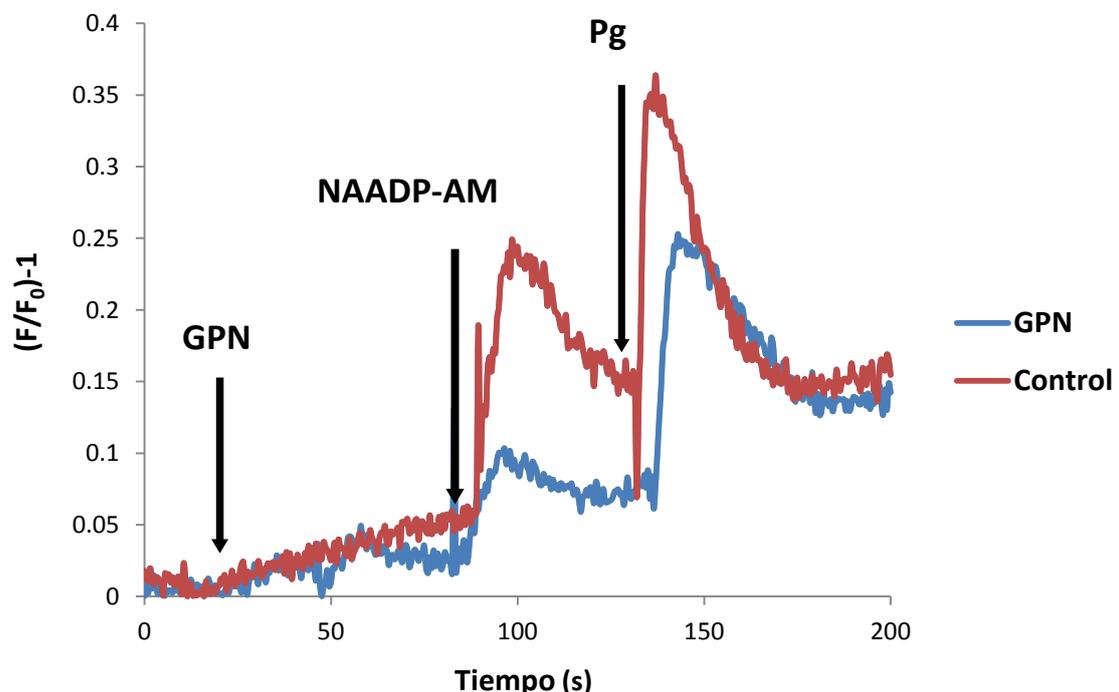


Figura 16. El GPN inhibe el incremento de Ca²⁺ inducido por NAADP-AM en la población de espermatozoides. En azul se muestra la cinética de los incrementos en fluorescencia del fluo3 AM al agregar 50 μM de GPN a los 30 segundos del trazo, 15 μM de NAADP-AM a los 80 segundos del trazo y 4μM de Progesterona (Pg). En rojo se muestra el trazo control en ausencia del GPN (n=6).

Para cuantificar el porcentaje de inhibición, graficamos el promedio de los incrementos máximos de cada experimento en presencia y ausencia del inhibidor. En la figura 17 podemos ver que el GPN inhibe el 75% de la señalización de NAADP-AM, sin embargo, al hacer el análisis estadístico no se obtienen diferencias significativas debido a la gran variabilidad en los resultados (n=6).

De igual manera, incubamos el GPN durante 5 minutos para permitir una mejor difusión del GPN y por lo tanto una mayor lisis osmótica de los reservorios ácidos, curiosamente la inhibición es menor, disminuyendo a tan sólo un 40% los incrementos inducidos por NAADP-AM, lo que nos indica un efecto inespecífico del compuesto que afecta la señalización del NAADP-AM de manera reversible. De igual manera podemos ver que el GPN también tiene efectos en la señalización de progesterona ya que la inhibe en un 60% por lo que es probable que el GPN sea un inhibidor de CatSper, el receptor de progesterona (Figura 17). Ninguno de los datos mostrados presentó diferencias significativas en la inhibición al aplicar un análisis de varianza ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de comparación múltiple Tukey-Kramer.

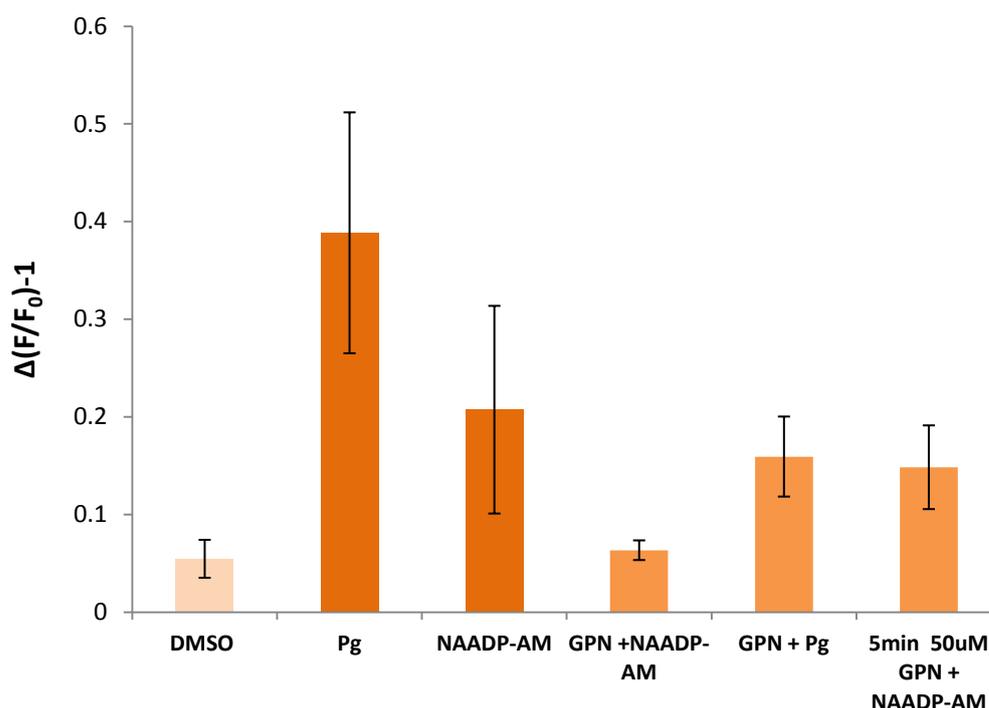


Figura 17. GPN inhibe el incremento de Ca^{2+} inducido por NAADP-AM en la población de espermatozoides. Se indican los promedios de la fluorescencia máxima inducida por la adición de DMSO (solvente), 4 μ M de Progesterona (Pg), 15 μ M de NAADP-AM, 50 μ M de GPN previos a la adición de 15 μ M de NAADP-AM, la incubación del GPN durante 5 minutos previos a la adición de NAADP-AM y 50 μ M de GPN previos a la adición de Progesterona. Los datos se grafican como fluorescencia (F) / fluorescencia inicial (F_0) en presencia de 50 μ M de GPN (n=6). Las barras indican el error.

Otro de los inhibidores de la señalización del NAADP, que se ha utilizado en otros tipos celulares, es el BZ194, una molécula sintética pequeña, derivada del ácido nicotínico, que al igual que el Ned-19, es capaz de inhibir la señalización del NAADP sin afectar la respuesta de la ADPRc o del IP₃ (Dammermann et al. 2009). De manera preliminar (n=2), al incubar diferentes concentraciones del BZ194 (1 μM-500 μM) durante 4 horas, pudimos ver una disminución del 40% de la respuesta del NAADP al trabajar con una concentración entre 1 y 500 μM de BZ194 (datos no mostrados).

Como se mencionó en los antecedentes, el NAADP es un segundo mensajero que permite la liberación de Ca²⁺ de reservorios ácidos induciendo una amplificación de la señal de Ca²⁺ a través de la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ de otros reservorios, los cuales activan la entrada de Ca²⁺ operada por pozas internas (SOC), es decir, la respuesta de Ca²⁺ inducida por NAADP es la suma total de tres componentes, el primero es la liberación de Ca²⁺ de reservorios ácidos, el segundo es la CICR y el tercero es la entrada tipo SOC. Por tal motivo, es importante determinar qué porcentaje de la respuesta que observamos con NAADP-AM proviene de la movilización de Ca²⁺ intracelular y qué porcentaje proviene de una entrada de Ca²⁺ externa. Para esto, disminuimos la concentración de Ca²⁺ externa de 2 mM a 100 nM utilizando el EGTA como agente quelante de Ca²⁺. Al utilizar una concentración de 100 nM de Ca²⁺ externo igualamos la concentración de Ca²⁺ extracelular con la concentración de Ca²⁺ citoplasmática y con esto eliminamos el componente de la entrada de Ca²⁺ extracelular al agregar NAADP. Al utilizar 100 nM de Ca²⁺ externo se disminuye la señalización de NAADP-AM en un 90% en los experimentos en población. Es decir, el 90% de la respuesta proviene de Ca²⁺ externo y el 10% restante es una señal similar a la observada al adicionar la cantidad correspondiente del solvente (DMSO) (Figura 18 y 19).

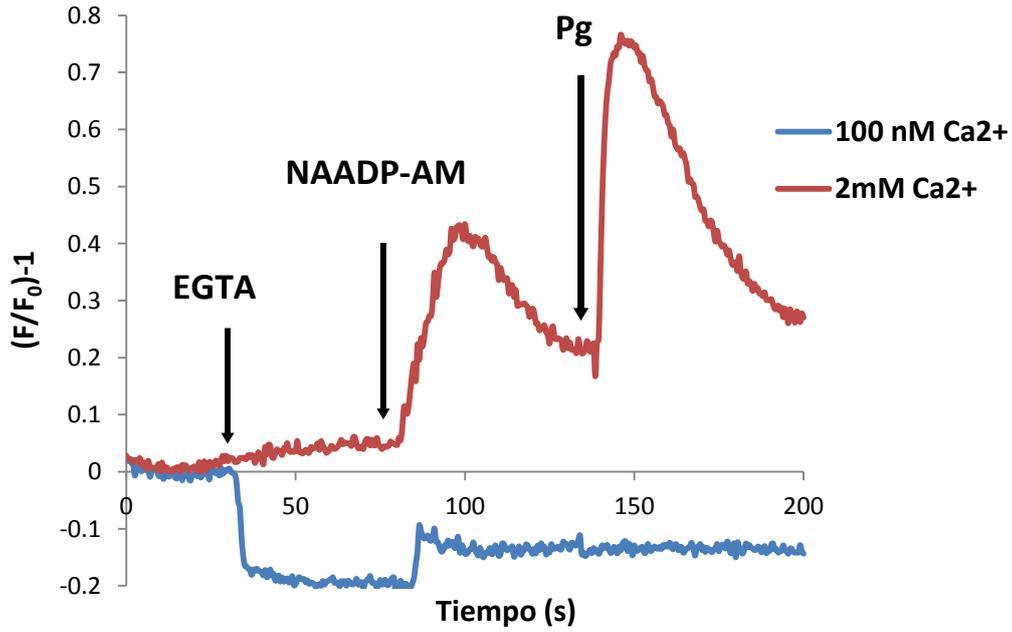


Figura 18. En presencia de 100 nM de $[Ca^{2+}]$ externo se disminuye la señalización de NAADP-AM. Se muestran trazos representativos de la cinética de los incrementos en fluorescencia del fluo3 AM. En rojo se muestra el trazo control en presencia de 2 mM Ca^{2+} donde se observa la respuesta a 15 μ M de NAADP-AM a los 80 segundos y a 4 μ M de Progesterona (Pg) a los 130 segundos del trazo. En el trazo azul se disminuyó el Ca^{2+} externo utilizando EGTA llevando a una concentración de 100nM, se muestran los incrementos al adicionar 15 μ M de NAADP-AM a los 80 segundos y a 4 μ M de Progesterona (Pg) a los 130 segundos del trazo(n=6).

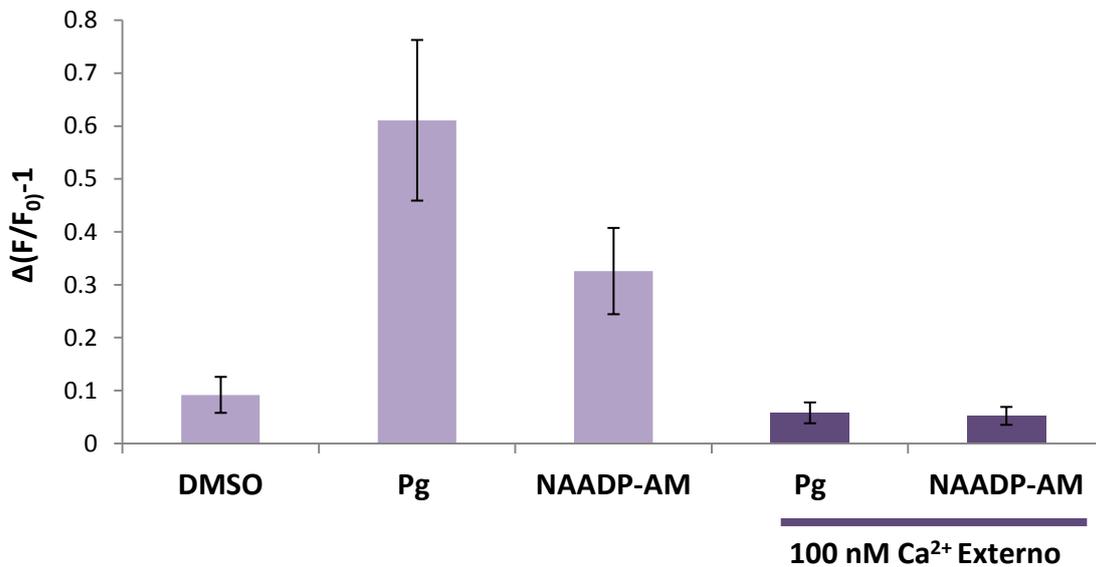


Figura 19. En presencia de 100 nM de Ca^{2+} externo se disminuye la señalización de NAADP-AM. Se indican los promedios de la fluorescencia máxima inducida por el DMSO 1%, Progesterona 4 μ M (Pg) y NAADP-AM en 2 mM de Ca^{2+} externo y en 100nM de Ca^{2+} externo (graficada como fluorescencia (F) / fluorescencia inicial (F_0)) n=5. Las barras indican el error.

A la par del momento en que realizamos estos experimentos, se publicaron resultados en los que demostraban que análogos de nucleótidos cíclicos activan al canal catiónico específico del espermatozoide (CatSper) (Brenker et al. 2012b) lo que nos hizo cuestionar si el NAADP-AM podría estar activando a este canal conformando parte de la respuesta a Ca^{2+} que observamos.

CatSper facilita la entrada del Ca^{2+} necesario para realizar cambios rápidos en la movilidad del espermatozoide que le permiten nadar a lo largo del tracto genital femenino y poder fecundar al óvulo. El canal está compuesto por cuatro subunidades (CatSper 1-4) (Navarro et al. 2008; Kirichok and Lishko 2011) y por lo menos por tres subunidades auxiliares (β, γ, δ) (Liu et al. 2007; Wang et al. 2009; Chung et al. 2011). El ratón nulo para CatSper es infértil y en humanos se demostró que el canal se activa por progesterona y prostaglandinas, lo que destaca la importancia del canal (Lishko, Botchkina, and Kirichok 2011; Strünker et al. 2011).

Brenker y colaboradores mostraron que CatSper se activa directamente por un rango diverso de moléculas orgánicas pequeñas (Brenker et al. 2012b). Este reporte generó consecuencias importantes en la interpretación de los efectos de las drogas en la $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide, particularmente cuando se utilizan altas concentraciones. En el trabajo muestran que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por análogos permeables de AMPc y GMPc refleja un efecto de éstos compuestos en el lado extracelular del canal CatSper. Esta observación explica porque otras técnicas más directas para elevar el AMPc como la fotoliberación no incrementan la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides humanos. Por tales motivos es importante analizar si el NAADP-AM activa a CatSper. Para esto, incubamos a los espermatozoides con dos inhibidores de CatSper; el NNC 550396 (10 μ M) y Mibefradil (40 μ M) en presencia de 2 mM de Ca^{2+} externo previos a la adición del NAADP-AM. Como podemos ver en la figura 20, los inhibidores del CatSper inhiben los incrementos de Ca^{2+} inducidos por NAADP-AM entre un 50 y 75%, dependiendo del inhibidor (n=5) (Figura 20).

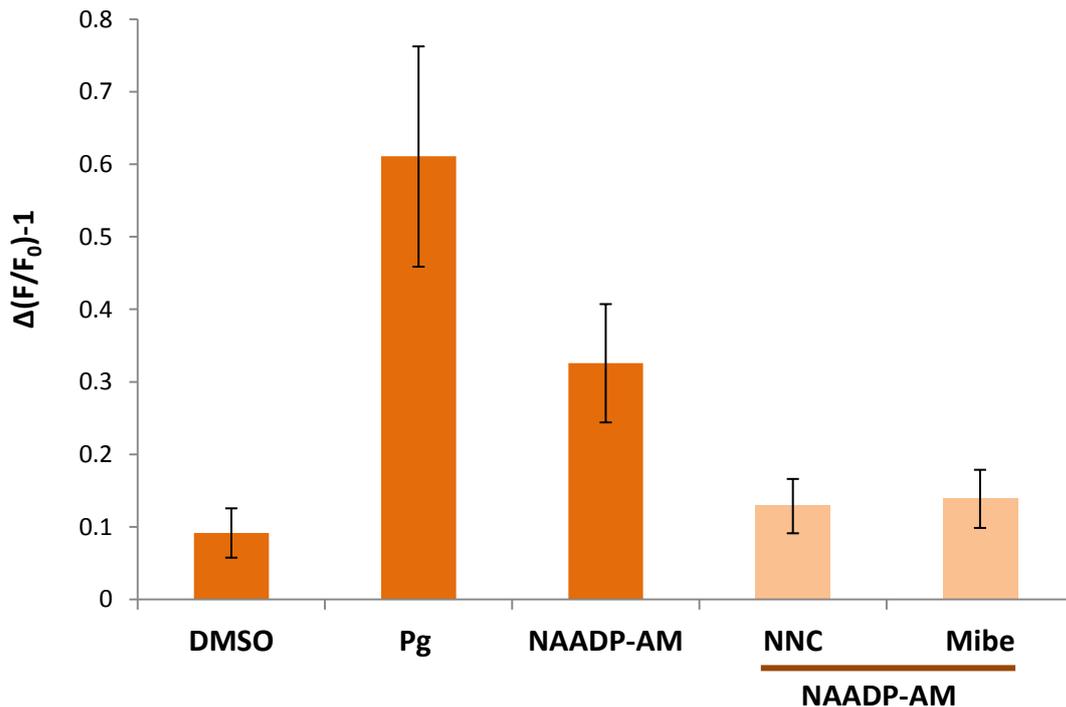


Figura 20. Los inhibidores de CatSper disminuyen la señalización de NAADP-AM. Se indican los promedios de la fluorescencia máxima inducida por la adición de DMSO (solvente), 4 μM de Progesterona (Pg), 15 μM de NAADP-AM, 10 μM de NNC 550396, 40 μM de Mibefradil adicionados de manera previa a la adición de 1 μM de NAADP-AM (n=5). Las barras indican el error.

El NAADP-AM activa una entrada de Ca^{2+} externo en donde, al menos, una parte corresponde a la activación del canal CatSper en los espermatozoides en estudios en población. Sin embargo, en los experimentos en población, el resultado que se obtiene es la suma de los incrementos en fluorescencia de todos los espermatozoides y como sabemos, existen diferentes estados de maduración y de capacitación por lo que, dentro de esta población, existen subpoblaciones de espermatozoides con diferente grado de maduración que la vuelve muy heterogénea. Por tal motivo, siempre es importante comparar los resultados obtenidos en experimentos en población con los observados en célula única donde podemos analizar las células de manera individual y además nos brinda resolución espacial, un ejemplo de esto es el experimento de la figura 4, al eliminar el Ca^{2+} externo y adicionar $\delta\text{pCPT-O-Me-AMPC}$ se observan incrementos en el Ca^{2+} intracelular que no se pueden observar en experimentos en población de espermatozoides (DeBlas G, comunicación personal). Por tal motivo, decidimos realizar este mismo experimento en célula única y en los que observamos que el NAADP-AM es capaz de inducir incrementos intracelulares de Ca^{2+} aún en ausencia de Ca^{2+} externo a diferencia de la ADPRc (Figura 21).

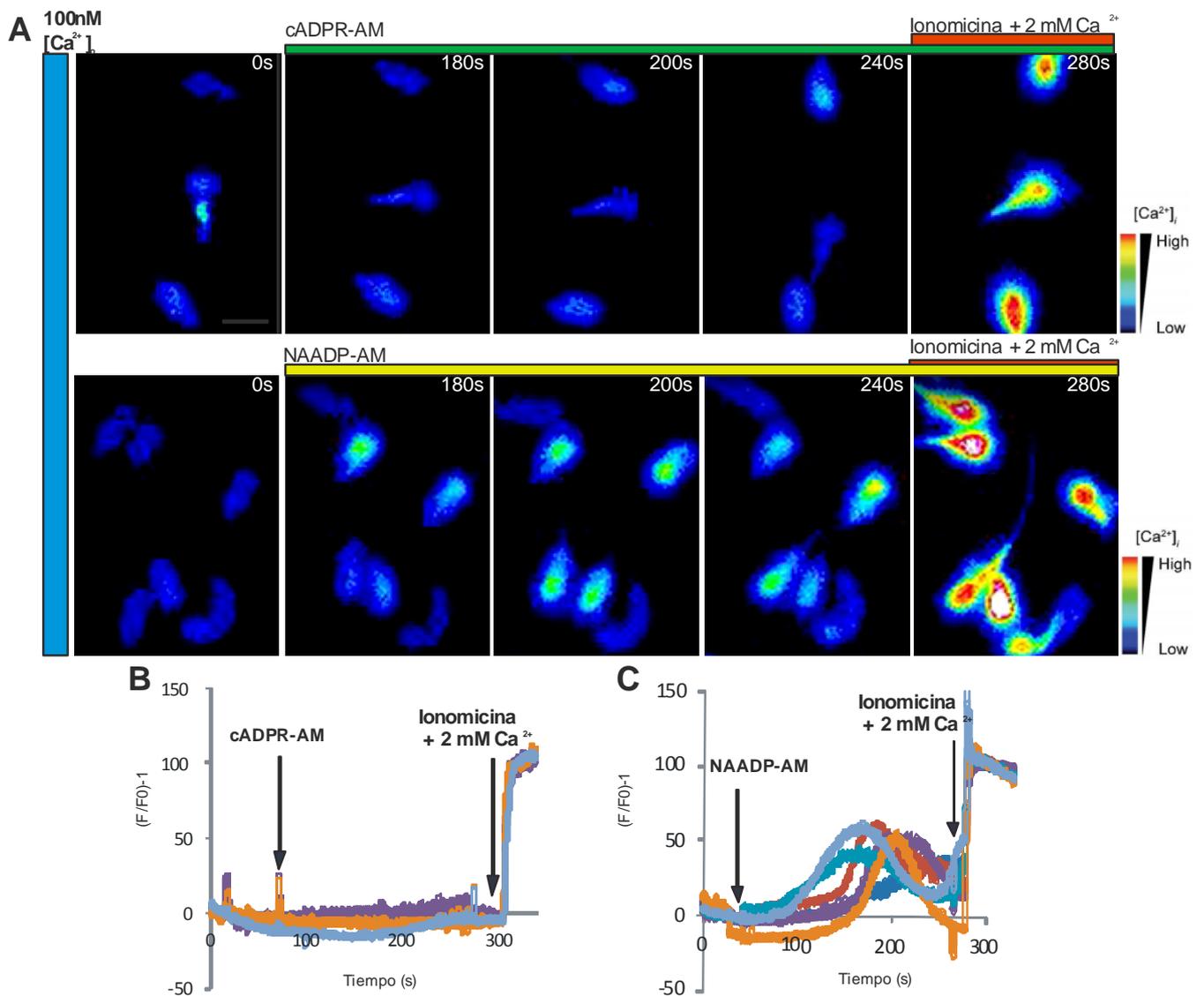


Figura 21. El NAADP a diferencia de la ADPRc incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide humano en presencia de 100 nM de Ca^{2+} externo. (A) Imágenes representativas de los cambios espacio temporales en la fluorescencia en experimentos en célula única antes y después de la adición de ADPRc-AM (arriba) o NAADP-AM (abajo); la escala de pseudocolor de negro a rojo indica incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ de bajo a alto. El tiempo se indica en segundos. Trazos representativos de los incrementos en fluorescencia de células individuales antes y después de la adición de ADPRc-AM (B) o NAADP-AM (C). Como control positivo agregamos Ionomicina 20 μ M + Ca^{2+} (n=5).

Una de las preguntas centrales del trabajo es si el espermatozoide humano cuenta con las enzimas necesarias para sintetizar NAADP. Como se mencionó en los antecedentes, en espermatozoides de erizo de mar (*Lytechinus pictus*) se reportó la presencia de una enzima con actividad de intercambio de bases (Vasudevan, Galione, and Churchill 2008). Realizando experimentos similares, nuestro grupo colaborador identificó la presencia de una enzima similar en el espermatozoide humano.

Para comprobar si los espermatozoides humanos presentan una actividad enzimática asociada a intercambio de bases (figura 6), incubaron espermatozoides capacitados con concentraciones saturantes de los sustratos NADP (10 mM) y ácido nicotínico (100 mM) durante una hora y analizaron mediante HPLC los sustratos y productos de la solución. Así mismo, incubaron los sustratos en ausencia de espermatozoides como control negativo. Los HPLC resultantes se muestran en la figura 22 A. Detectaron cuatro picos distintos en ausencia de espermatozoides, los cuales corresponden a la nicotinamida, al ácido nicotínico, al NADP y a la ADPR-P. Estos picos indican la presencia de ADPR-P contaminante y Nicotinamida, pero no NAADP en el NADP comercial. Detectaron un pico de NAADP al incubar los sustratos con los espermatozoides, lo que indica una síntesis enzimática. Esta conclusión se fortalece al ver un incremento en el segundo producto de la reacción del intercambio de bases, la nicotinamida. Debido a que se utilizaron espermatozoides intactos y la membrana celular no es permeable a los sustratos, la enzima se localiza muy probablemente en membrana. Para analizar si el espermatozoide posee actividad enzimática intracelular de síntesis de NAADP, los espermatozoides se permeabilizaron utilizando digitonina (50 μ M) o bien mediante ciclos de congelamiento (-80°C, 10 min) antes de la incubación con los sustratos. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de síntesis de NAADP entre las células permeabilizadas y las no permeabilizadas por lo que concluyen que el sitio catalítico de la enzima se localiza en el lado extracelular de la membrana plasmática igual a lo observado en el espermatozoide de erizo de mar (Vasudevan, Galione, and Churchill 2008).

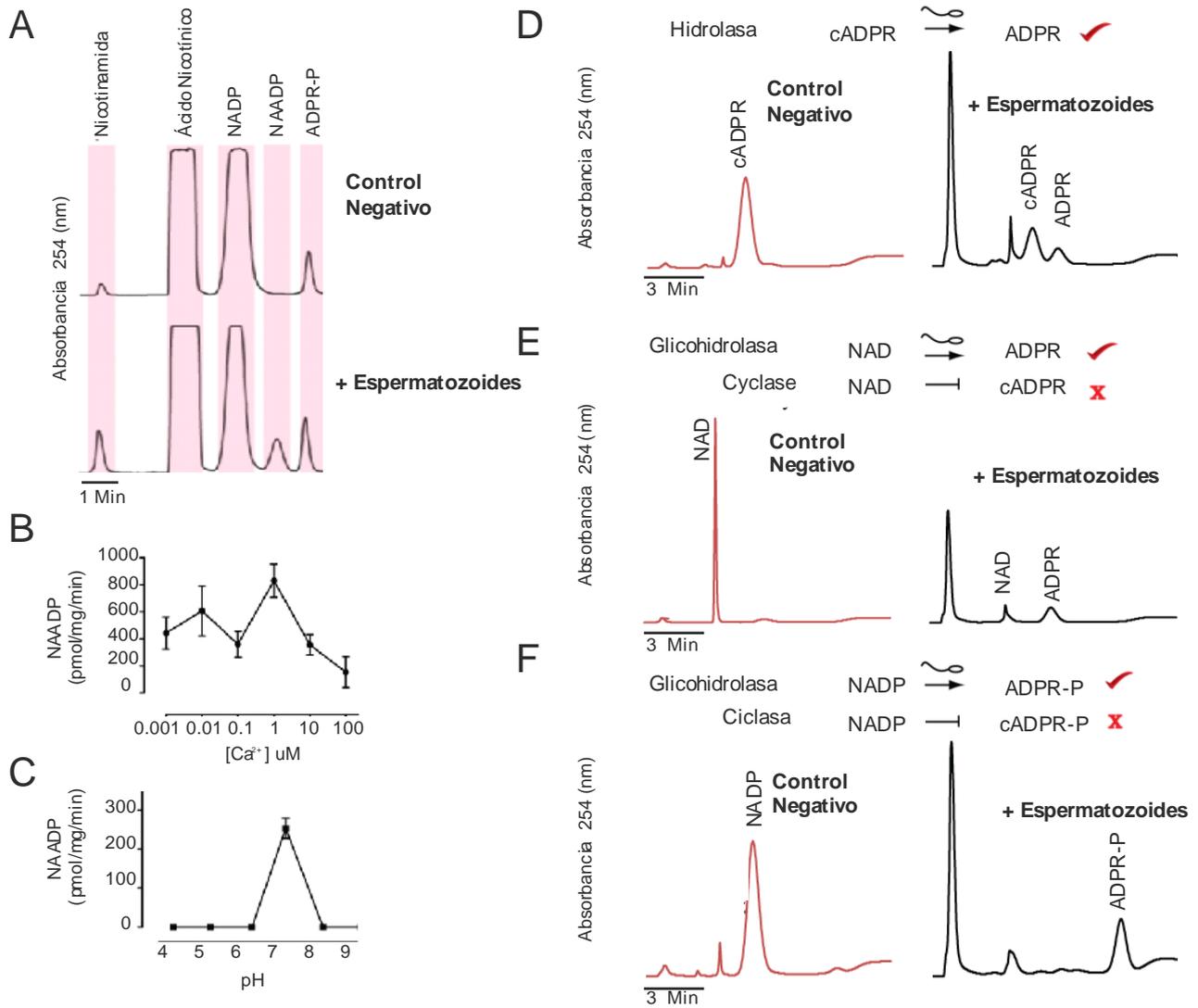


Figura 22. El espermatozoide humano sintetiza NAADP. (A) Trazos del HPLC después de la incubación con los sustratos necesarios para el intercambio de bases. Ácido nicotínico y NADP en ausencia o en presencia de espermatozoides. (B) Dependencia de Ca²⁺ y (C) pH en la actividad de intercambio de bases. Trazos de HPLC después de la incubación de ADPRc (D), NAD (E) o NADP (F) en ausencia o en presencia de espermatozoides.

En otros modelos celulares se sabe que la actividad enzimática de la CD38, la ADP ribosil ciclasa mas estudiada (D. Jin et al. 2007; Schmid et al. 2011; Ohta et al. 2011; Cosker et al. 2010) está regulada por Ca²⁺ y por pH (Vasudevan, Galione, and Churchill 2008) por lo que se analizó la influencia de éstos factores en la producción de NAADP en el espermatozoide humano. La dependencia de Ca²⁺ presenta una máxima producción de NAADP cerca de 1 µM de Ca²⁺ (Figura 22 B). La pH dependencia de la actividad de intercambio de base muestra un pico claro dentro de un rango de pH 7-8, mientras que en un pH <6 o >8 no se observa actividad (Fig. 22 C).

Como se mencionó anteriormente, la enzima CD38 es una ectoenzima con el dominio catalítico situado en el C-terminal, en el espacio extracelular, donde el pH ácido necesario para el intercambio de bases es prácticamente nulo. Esto genera una “paradoja topológica” de la enzima, es decir, la localización del sitio catalítico requiere de un mecanismo de transporte para la salida de los sustratos (NADP) y para la entrada de los productos (NAADP). Sin embargo, si la membrana es endocitada, el sitio catalítico de la enzima se localiza en el lumen del endosoma, donde el pH y la concentración de Ca^{2+} son idóneos para la síntesis del NAADP, necesitando nuevamente de los transportadores para la entrada de los sustratos y la salida de los productos de la enzima (Rutter and Bellomo 2008), los cuales aun no se identifican en el espermatozoide.

Discusión

En Septiembre del 2010 el Dr. Robert Edwards recibió el premio Nobel por el desarrollo de la técnica de fecundación *in vitro* en humanos. A partir del nacimiento del primer bebé de “probeta” en julio de 1978 (Stephoe and Edwards 1978) más de cuatro millones de bebés se han concebido utilizando esta técnica. Este excepcional hito se logró casi 100 años después de los primeros intentos de fecundación *in vitro* en mamíferos. Las dificultades para lograr la fecundación en mamíferos se debieron principalmente a la falta de conocimiento del comportamiento de los gametos *in vitro*. No fue hasta 1950 que Austin (AUSTIN 1952) y Chang (CHANG 1951) demostraron de manera independiente que el espermatozoide debe permanecer un tiempo en el tracto reproductor femenino por un periodo de tiempo antes de poder fecundar al óvulo.

De igual manera, la RA se descubrió en 1950 y actualmente desconocemos el mecanismo molecular involucrado en todo el proceso. Esto se debe en mayor parte, a las inusuales características del espermatozoide; su tamaño, la ausencia de organelos, la falta de transcripción y traducción de proteínas, su polaridad celular y su motilidad hacen del estudio del espermatozoide un gran reto para la aplicación de métodos tradicionales de fisiología, biología molecular y celular, imágenes y electrofisiología. Por tales motivos, el progreso en el entendimiento de la fisiología del espermatozoide ha sido significativamente lento.

A pesar de todas las limitaciones, sabemos que la señalización de Ca^{2+} es importante para la fisiología del espermatozoide, sin embargo, las entidades moleculares involucradas en el proceso están en debate. En el presente trabajo estudiamos la movilización de Ca^{2+} inducida por segundos mensajeros de Ca^{2+} , donde el NAADP pero no la ADPRc moviliza Ca^{2+} en el espermatozoide humano. Observamos que la señal de NAADP se inhibe por el Ned-19 y por el GPN. Debido a la modificación AM que presenta el NAADP para hacerlo permeable a la membrana celular es importante descartar la activación de CatSper, como se reportó para otras moléculas permeables (Brenker et al. 2012b). Utilizando imágenes en célula única, en donde eliminamos el Ca^{2+} extracelular para eliminar la entrada de Ca^{2+} a través de la activación de CatSper, observamos un incremento inducido por el NAADP. Es interesante notar que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ observado en estas condiciones presenta un retraso de 40 s en comparación con los experimentos en presencia de 2 mM de Ca^{2+} externo. Este retraso puede deberse a que el NAADP-AM debe retirar la modificación AM con ayuda de las esterases antes de poder incrementar los niveles intracelulares de Ca^{2+} .

Así mismo, para determinar la presencia de reservorios ácidos en espermatozoides humanos, realizamos tinciones utilizando LysoTracker Red y LysoSensor. Mostramos que ambos compuestos identifican compartimentos ácidos localizados en la cabeza y pieza media del espermatozoide. De manera interesante,

esta tinción correlaciona con la localización de los reservorios de Ca^{2+} en el espermatozoide (Jimenez-Gonzalez et al. 2006) así como con la fluorescencia del Ned-19. La preincubación de los espermatozoides con Bafilomicina disminuye la tinción del LysoTracker Red y del LysoSensor, lo que comprueba la naturaleza ácida de éstos compuestos. Basándonos en éstos resultados, proponemos que el NAADP juega un papel durante la señalización de Ca^{2+} en el espermatozoide humano.

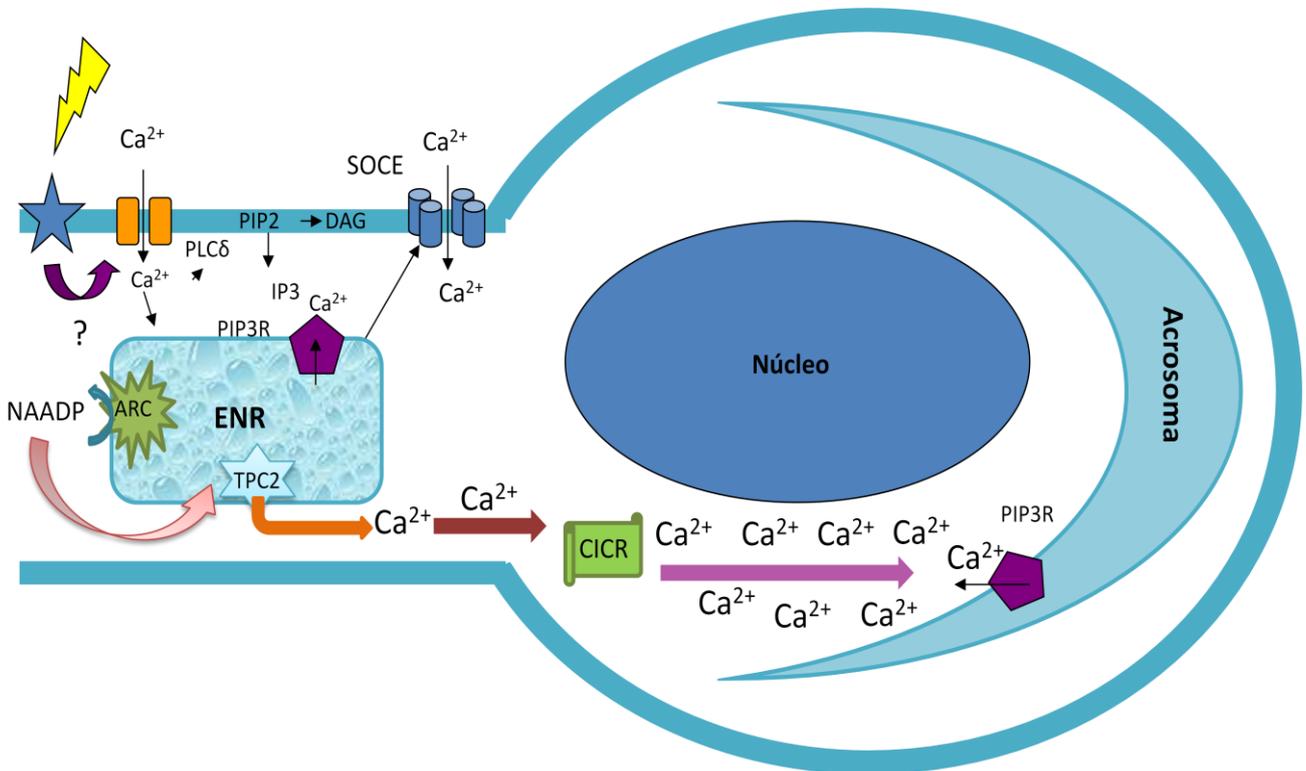


Figura 23. Modelo propuesto de la participación del NAADP durante la reacción acrosomal. Los diferentes estímulos (rayo amarillo) que inducen una entrada de Ca^{2+} al espermatozoide activan a la enzima ARC (verde), la cual sintetiza NAADP, el NAADP activa a los canales TPC2 localizados en reservorios ácidos como la envoltura nuclear redundante (ENR) permitiendo una pequeña salida de Ca^{2+} de los reservorios, esta liberación de Ca^{2+} genera una liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} de otros reservorios como el acrosoma amplificando la señalización de Ca^{2+} que conduce a la RA.

Con los datos obtenidos proponemos el siguiente modelo (Figura 23) en el que, de manera adicional a los mecanismos descritos en la introducción de este trabajo, proponemos que, la entrada de Ca^{2+} al espermatozoide activa a la enzima ARC, la cual sintetiza NAADP, el NAADP activa a los canales TPC2 localizados en reservorios ácidos como la envoltura nuclear redundante (ENR) permitiendo una pequeña salida de Ca^{2+} de los reservorios, esta liberación de Ca^{2+} genera una liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) de otros reservorios como el acrosoma amplificando la señalización de Ca^{2+} que conduce a la RA.

Existen muchos compuestos que son capaces de inducir la RA, todos estos requieren de la señalización de Ca^{2+} , por tal motivo, pensamos que la señalización por NAADP es un mecanismo más de señalización de Ca^{2+} que garantiza la RA durante el proceso de fecundación.

Recientemente Arndt et al., publicó un reporte que apoya nuestro modelo. En el trabajo identifican mediante Western Blot la presencia del canal TPC1 en espermatozoides de ratón, rata y humano. Comprueban la eficiencia del anticuerpo al no detectar la banda en el ratón nulo para TPC1 y al bloquear el anticuerpo con su péptido específico. Cabe destacar que el ratón nulo es fértil con camadas promedio y sin fenotipo diferente al ratón silvestre (mismo tamaño y peso en testículos así como concentración de espermatozoides). También inmunolocalizaron al canal en la membrana del acrosoma del espermatozoide de ratón utilizando microscopía electrónica. Utilizaron, al igual que nosotros, al Ned-19 para identificar los sitios de unión del NAADP y LysoTracker para identificar reservorios ácidos en espermatozoides de ratón. Ambas tinciones colocalizan en la región del acrosoma. Además, mostraron que el NAADP induce la RA en espermatozoides permeabilizados con estreptomicina O y que este efecto se inhibe en presencia de Ned-19 y no se observa en los ratones nulos para TPC1 (Arndt et al. 2014). Todos estos datos apoyan la hipótesis de la participación del NAADP en la fisiología del espermatozoide.

Conclusiones

- NAADP, a diferencia de la ADPRc, induce incrementos en la $[Ca^{2+}]$ intracelular en el espermatozoide humano.
- El incremento en la $[Ca^{2+}]$ intracelular inducida por NAADP-AM se inhibe por Ned-19.
- El Ned-19 se acumula en la pieza media y en el acrosoma.
- El espermatozoide presenta regiones ácidas en cabeza y pieza media.
- En los experimentos de célula única, el NAADP-AM es capaz de inducir incrementos en la $[Ca^{2+}]$; en presencia de 100nM de Ca^{2+} externo a diferencia de la ADPRc-AM.
- El espermatozoide de humano es capaz de sintetizar NAADP.

Perspectivas

- Utilizar la concanamicina para inhibir la señal de NAADP de en los experimentos de célula única.

Referencias

- Aarhus, R, R M Graeff, D M Dickey, T F Walseth, and H C Lee. 1995. "ADP-Ribosyl Cyclase and CD38 Catalyze the Synthesis of a Calcium-Mobilizing Metabolite from NADP." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (51) (December 22): 30327–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8530456>.
- Alasmari, Wardah, Sarah Costello, Joao Correia, Senga K Oxenham, Jennifer Morris, Leonor Fernandes, Joao Ramalho-Santos, et al. 2013. "Ca²⁺ Signals Generated by CatSper and Ca²⁺ Stores Regulate Different Behaviors in Human Sperm." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (9) (March 1): 6248–58. doi:10.1074/jbc.M112.439356. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3585060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Amann, R P, and S S Howards. 1980. "Daily Spermatozoal Production and Epididymal Spermatozoal Reserves of the Human Male." *The Journal of Urology* 124 (2) (August): 211–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6772801>.
- Arcelay, Enid, Ana M Salicioni, Eva Wertheimer, and Pablo E Visconti. 2008. "Identification of Proteins Undergoing Tyrosine Phosphorylation during Mouse Sperm Capacitation." *The International Journal of Developmental Biology* 52 (5-6) (January): 463–72. doi:10.1387/ijdb.072555ea. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18649259>.
- Ardón, F, E Rodríguez-Miranda, C Beltrán, A Hernández-Cruz, and A Darszon. 2009. "Mitochondrial Inhibitors Activate Influx of External Ca²⁺ in Sea Urchin Sperm." *Biochimica et Biophysica Acta* 1787 (1) (January): 15–24. doi:10.1016/j.bbabo.2008.10.003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19000650>.
- Arndt, Lilli, Jan Castonguay, Elisabeth Arlt, Dorke Meyer, Sami Hassan, Heike Borth, Susanna Zierler, et al. 2014. "NAADP and the Two-Pore Channel Protein 1 Participate in the Acrosome Reaction in Mammalian Spermatozoa." *Molecular Biology of the Cell* 25 (6) (March): 948–64. doi:10.1091/mbc.E13-09-0523. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24451262>.
- Asari, M, K Sasaki, K Miura, N Ichihara, and T Nishita. 1996. "Immunohistolocalization of the Carbonic Anhydrase Isoenzymes (CA-I, CA-II, and CA-III) in the Reproductive Tract of Male Horses." *American Journal of Veterinary Research* 57 (4) (April): 439–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8712504>.
- AUSTIN, C R. 1952. "The Capacitation of the Mammalian Sperm." *Nature* 170 (4321) (August 23): 326. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12993150>.
- Baba, Daichi, Shin-ichi Kashiwabara, Arata Honda, Kazuo Yamagata, Qing Wu, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, and Tadashi Baba. 2002. "Mouse Sperm Lacking Cell Surface Hyaluronidase PH-20 Can Pass through the Layer of Cumulus Cells and Fertilize the Egg." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (33) (August 16): 30310–4. doi:10.1074/jbc.M204596200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065596>.
- Baldi, E, R Casano, C Falsetti, C Krausz, M Maggi, and G Forti. 2014. "Intracellular Calcium Accumulation and Responsiveness to Progesterone in Capacitating Human Spermatozoa." *Journal of Andrology* 12 (5): 323–30. Accessed March 14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1765568>.
- Bedford, J M. 2011. "Site of the Mammalian Sperm Physiological Acrosome Reaction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (12) (March 22): 4703–4. doi:10.1073/pnas.1102296108.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3064386&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Berg, T O, E Strømhaug, T Løvdal, O Seglen, and T Berg. 1994. "Use of Glycyl-L-Phenylalanine 2-Naphthylamide, a Lysosome-Disrupting Cathepsin C Substrate, to Distinguish between Lysosomes and Prelysosomal Endocytic Vacuoles." *The Biochemical Journal* 300 (Pt 1 (May 15): 229–36. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1138146&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Billington, Richard a, Claire Harper, Elisa a Bellomo, Steve Publicover, Christopher L R Barratt, and Armando a Genazzani. 2006. "Characterization of Cyclic Adenine Dinucleotide Phosphate Ribose Levels in Human Spermatozoa." *Fertility and Sterility* 86 (4) (October): 891–8. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.030. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904113>.

Blackmore, P F. 1993. "Rapid Non-Genomic Actions of Progesterone Stimulate Ca²⁺ Influx and the Acrosome Reaction in Human Sperm." *Cellular Signalling* 5 (5) (September): 531–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8312130>.

Branham, María T, Matías A Bustos, Gerardo A De Blas, Holger Rehmman, Valeria E P Zarelli, Claudia L Treviño, Alberto Darszon, Luis S Mayorga, and Claudia N Tomes. 2009. "Epac Activates the Small G Proteins Rap1 and Rab3A to Achieve Exocytosis." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (37) (September 11): 24825–39. doi:10.1074/jbc.M109.015362. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2757186&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Brenker, Christoph, Normann Goodwin, Ingo Weyand, Nachiket D Kashikar, Masahiro Naruse, Miriam Krähling, Astrid Müller, U Benjamin Kaupp, and Timo Strünker. 2012a. "The CatSper Channel: A Polymodal Chemosensor in Human Sperm." *The EMBO Journal* 31 (7) (April 4): 1654–65. doi:10.1038/emboj.2012.30. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3321208&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Calcraft, Peter J, Margarida Ruas, Zui Pan, Xiaotong Cheng, Abdelilah Arredouani, Xuemei Hao, Jisen Tang, et al. 2009. "NAADP Mobilizes Calcium from Acidic Organelles through Two-Pore Channels." *Nature* 459 (7246) (May 28): 596–600. doi:10.1038/nature08030. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2761823&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Chang, Haixin, and Susan S Suarez. 2011. "Two Distinct Ca²⁺ Signaling Pathways Modulate Sperm Flagellar Beating Patterns in Mice." *Biology of Reproduction* 85 (2) (August): 296–305. doi:10.1095/biolreprod.110.089789. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3142258&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

CHANG, M C. 1951. "Fertilizing Capacity of Spermatozoa Deposited into the Fallopian Tubes." *Nature* 168 (4277) (October 20): 697–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14882325>.

Chiarella, Pieranna, Rossella Puglisi, Vincenzo Sorrentino, Carla Boitani, and Mario Stefanini. 2004. "Ryanodine Receptors Are Expressed and Functionally Active in Mouse Spermatogenic Cells and Their Inhibition Interferes with Spermatogonial Differentiation." *Journal of Cell Science* 117 (Pt 18) (August 15): 4127–34. doi:10.1242/jcs.01283. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280431>.

Chung, Jean-Ju, Betsy Navarro, Grigory Krapivinsky, Luba Krapivinsky, and David E Clapham. 2011. "A Novel Gene Required for Male Fertility and Functional CATSPER Channel Formation in

- Spermatozoa." *Nature Communications* 2 (January 11): 153. doi:10.1038/ncomms1153. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21224844>.
- Churchill, G C, and a Galione. 2001. "NAADP Induces Ca²⁺ Oscillations via a Two-Pool Mechanism by Priming IP₃- and cADPR-Sensitive Ca²⁺ Stores." *The EMBO Journal* 20 (11) (June 1): 2666–71. doi:10.1093/emboj/20.11.2666. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=125473&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Churchill, Grant C, Yuhei Okada, Justyn M Thomas, Armando a Genazzani, Sandip Patel, and Antony Galione. 2002. "NAADP Mobilizes Ca(2+) from Reserve Granules, Lysosome-Related Organelles, in Sea Urchin Eggs." *Cell* 111 (5) (November 27): 703–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12464181>.
- Clapper, D L, T F Walseth, P J Dargie, and H C Lee. 1987. "Pyridine Nucleotide Metabolites Stimulate Calcium Release from Sea Urchin Egg Microsomes Desensitized to Inositol Trisphosphate." *The Journal of Biological Chemistry* 262 (20) (July 15): 9561–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3496336>.
- Cooper, T G. 1990. "In Defense of a Function for the Human Epididymis." *Fertility and Sterility* 54 (6) (December): 965–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2245854>.
- Cosker, François, Nathalie Cheviron, Michiko Yamasaki, Alexis Menteyne, Frances E Lund, Marie-Jo Moutin, Antony Galione, and Jose-Manuel Cancela. 2010. "The Ecto-Enzyme CD38 Is a Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Synthase That Couples Receptor Activation to Ca²⁺ Mobilization from Lysosomes in Pancreatic Acinar Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (49) (December 3): 38251–9. doi:10.1074/jbc.M110.125864. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2992259&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Costello, Sarah, Francesco Michelangeli, Katherine Nash, Linda Lefievre, Jennifer Morris, Gisela Machado-Oliveira, Christopher Barratt, Jackson Kirkman-Brown, and Stephen Publicover. 2009. "Ca²⁺-Stores in Sperm: Their Identities and Functions." *Reproduction (Cambridge, England)* 138 (3) (September): 425–37. doi:10.1530/REP-09-0134. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3552241&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cross, Nicholas L. 2003. "Decrease in Order of Human Sperm Lipids during Capacitation." *Biology of Reproduction* 69 (2) (August): 529–34. doi:10.1095/biolreprod.102.013052. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700200>.
- Dammermann, Werner, Bo Zhang, Merle Nebel, Chiara Cordiglieri, Francesca Odoardi, Tanja Kirchberger, Naoto Kawakami, et al. 2009. "NAADP-Mediated Ca²⁺ Signaling via Type 1 Ryanodine Receptor in T Cells Revealed by a Synthetic NAADP Antagonist." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (26) (June 30): 10678–83. doi:10.1073/pnas.0809997106. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2697110&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Darszon, Alberto, Juan J Acevedo, Blanca E Galindo, Enrique O Hernández-González, Takuya Nishigaki, Claudia L Treviño, Chris Wood, and Carmen Beltrán. 2006. "Sperm Channel Diversity and Functional Multiplicity." *Reproduction (Cambridge, England)* 131 (6) (June): 977–88. doi:10.1530/rep.1.00612. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735537>.

- Darszon, Alberto, Takuya Nishigaki, Carmen Beltran, and Claudia L Treviño. 2011. "Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa." *Physiological Reviews* 91 (4) (October): 1305–55. doi:10.1152/physrev.00028.2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013213>.
- Darszon, Alberto, Claudia Sánchez-Cárdenas, Gerardo Orta, Ana a Sánchez-Tusie, Carmen Beltrán, Ignacio López-González, Gisela Granados-González, and Claudia L Treviño. 2012. "Are TRP Channels Involved in Sperm Development and Function?" *Cell and Tissue Research* 349 (3) (September): 749–64. doi:10.1007/s00441-012-1397-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580508>.
- DasGupta, S, C L Mills, and L R Fraser. 1993. "Ca(2+)-Related Changes in the Capacitation State of Human Spermatozoa Assessed by a Chlorotetracycline Fluorescence Assay." *Journal of Reproduction and Fertility* 99 (1) (September): 135–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8283430>.
- Dell'Angelica, E C, C Mullins, S Caplan, and J S Bonifacino. 2000. "Lysosome-Related Organelles." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (10) (July): 1265–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10877819>.
- Dragileva, E, S Rubinstein, and H Breitbart. 1999. "Intracellular Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase Regulates Calcium Influx and Acrosomal Exocytosis in Bull and Ram Spermatozoa." *Biology of Reproduction* 61 (5) (November): 1226–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10529268>.
- Ducibella, Tom, Richard M Schultz, and Jean-Pierre Ozil. 2006. "Role of Calcium Signals in Early Development." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17 (2) (April): 324–32. doi:10.1016/j.semcd.2006.02.010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16580237>.
- Edition, Fifth. "Examination and Processing of Human Semen."
- Escoffier, Jessica, Sylvie Boisseau, Catherine Serres, Chien-Chang Chen, Daesoo Kim, Séverine Stambouliau, Hee-Sup Shin, Kevin P Campbell, Michel De Waard, and Christophe Arnoult. 2007. "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." *Journal of Cellular Physiology* 212 (3) (September): 753–63. doi:10.1002/jcp.21075. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17450521>.
- Florman, Harvey M, Melissa K Jungnickel, and Keith A Sutton. 2008. "Regulating the Acrosome Reaction." *The International Journal of Developmental Biology* 52 (5-6) (January): 503–10. doi:10.1387/ijdb.082696hf. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18649263>.
- Fraser, L R. 1987. "Minimum and Maximum Extracellular Ca2+ Requirements during Mouse Sperm Capacitation and Fertilization in Vitro." *Journal of Reproduction and Fertility* 81 (1) (September): 77–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3668962>.
- Fukami, Kiyoko, Manabu Yoshida, Takafumi Inoue, Manabu Kurokawa, Rafael A Fissore, Nobuaki Yoshida, Katsuhiko Mikoshiba, and Tadaomi Takenawa. 2003. "Phospholipase Cdelta4 Is Required for Ca2+ Mobilization Essential for Acrosome Reaction in Sperm." *The Journal of Cell Biology* 161 (1) (April 14): 79–88. doi:10.1083/jcb.200210057. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2172882&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Galantino-Homer, Hannah L, Harvey M Florman, Bayard T Storey, Ina Dobrinski, and Gregory S Kopf. 2004. "Bovine Sperm Capacitation: Assessment of Phosphodiesterase Activity and Intracellular

- Alkalinization on Capacitation-Associated Protein Tyrosine Phosphorylation." *Molecular Reproduction and Development* 67 (4) (April): 487–500. doi:10.1002/mrd.20034. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14991741>.
- Galione, Antony, and Ole H Petersen. 2005. "The NAADP Receptor: New Receptors or New Regulation?" *Molecular Interventions* 5 (2) (April): 73–9. doi:10.1124/mi.5.2.4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821155>.
- Giannini, G, A Conti, S Mammarella, M Scrobogna, and V Sorrentino. 1995. "The Ryanodine Receptor/calcium Channel Genes Are Widely and Differentially Expressed in Murine Brain and Peripheral Tissues." *The Journal of Cell Biology* 128 (5) (March): 893–904. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2120385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Guse, Andreas H. 2012. "Linking NAADP to Ion Channel Activity: A Unifying Hypothesis." *Science Signaling* 5 (221) (April 24): pe18. doi:10.1126/scisignal.2002890. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22534131>.
- Hirohashi, Noritaka, and Victor D Vacquier. 2003. "Store-Operated Calcium Channels Trigger Exocytosis of the Sea Urchin Sperm Acrosomal Vesicle." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304 (2) (May 2): 285–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711312>.
- Hohenegger, Martin, Josef Suko, Regina Gscheidlinger, Helmut Drobny, and Andreas Zidar. 2002. "Nicotinic Acid-Adenine Dinucleotide Phosphate Activates the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor." *The Biochemical Journal* 367 (Pt 2) (October 15): 423–31. doi:10.1042/BJ20020584. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1222893&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Huleihel, Mahmoud, Mahmoud Abuelhija, and Eitan Lunenfeld. 2007. "In Vitro Culture of Testicular Germ Cells: Regulatory Factors and Limitations." *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 25 (4) (August): 236–52. doi:10.1080/08977190701783400. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18092232>.
- Jha, K N, A M Salicioni, E Arcelay, O Chertihin, S Kumari, J C Herr, and P E Visconti. 2006. "Evidence for the Involvement of Proline-Directed Serine/threonine Phosphorylation in Sperm Capacitation." *Molecular Human Reproduction* 12 (12) (December): 781–9. doi:10.1093/molehr/gal085. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050774>.
- Jimenez-Gonzalez, C, F Michelangeli, C V Harper, C L R Barratt, and S J Publicover. 2006. "Calcium Signalling in Human Spermatozoa: A Specialized 'Toolkit' of Channels, Transporters and Stores." *Human Reproduction Update* 12 (3): 253–67. doi:10.1093/humupd/dmi050. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16338990>.
- Jin, Duo, Hong-Xiang Liu, Hirokazu Hirai, Takashi Torashima, Taku Nagai, Olga Lopatina, Natalia a Shnyder, et al. 2007. "CD38 Is Critical for Social Behaviour by Regulating Oxytocin Secretion." *Nature* 446 (7131) (March 1): 41–5. doi:10.1038/nature05526. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287729>.
- Jin, Mayuko, Eiji Fujiwara, Yasutaka Kakiuchi, Masaru Okabe, Yuhkoh Satouh, Shoji A Baba, Kazuyoshi Chiba, and Noritaka Hirohashi. 2011. "Most Fertilizing Mouse Spermatozoa Begin Their Acrosome Reaction before Contact with the Zona Pellucida during in Vitro Fertilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (12) (March 22): 4892–6. doi:10.1073/pnas.1018202108. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3064341&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Kirichok, Yuriy, and Polina V Lishko. 2011. "Rediscovering Sperm Ion Channels with the Patch-Clamp Technique." *Molecular Human Reproduction* 17 (8) (August): 478–99. doi:10.1093/molehr/gar044. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3136206&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lam, Andy K M, and Antony Galione. 2013. "The Endoplasmic Reticulum and Junctional Membrane Communication during Calcium Signaling." *Biochimica et Biophysica Acta* 1833 (11) (November): 2542–59. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770047>.
- Lee, H C, and R Aarhus. 1995. "A Derivative of NADP Mobilizes Calcium Stores Insensitive to Inositol Trisphosphate and Cyclic ADP-Ribose." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (5) (February 3): 2152–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7836444>.
- . 2000. "Functional Visualization of the Separate but Interacting Calcium Stores Sensitive to NAADP and Cyclic ADP-Ribose." *Journal of Cell Science* 113 Pt 24 (December): 4413–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11082034>.
- Lee, H C, R Aarhus, and R M Graeff. 1995. "Sensitization of Calcium-Induced Calcium Release by Cyclic ADP-Ribose and Calmodulin." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (16) (April 21): 9060–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7721819>.
- Lin-moshier, Yaping, Timothy F Walseth, Dev Churamani, Sean M Davidson, James T Slama, Robert Hooper, Eugen Brailoiu, Sandip Patel, and Jonathan S Marchant. 2012. "Photoaffinity Labeling of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Targets in Mammalian" 287 (4): 2296–2307. doi:10.1074/jbc.M111.305813.
- Lishko, Polina V, Inna L Botchkina, and Yuriy Kirichok. 2011. "Progesterone Activates the Principal Ca²⁺ Channel of Human Sperm." *Nature* 471 (7338) (March 17): 387–91. doi:10.1038/nature09767. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412339>.
- Litscher, Eveline S, Zev Williams, and Paul M Wassarman. 2009. "Zona Pellucida Glycoprotein ZP3 and Fertilization in Mammals." *Molecular Reproduction and Development* 76 (10) (October): 933–41. doi:10.1002/mrd.21046. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19504560>.
- Liu, Jin, Jingsheng Xia, Kwang-Hyun Cho, David E Clapham, and Dejian Ren. 2007. "CatSperbeta, a Novel Transmembrane Protein in the CatSper Channel Complex." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (26) (June 29): 18945–52. doi:10.1074/jbc.M701083200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17478420>.
- Maas, D H, B T Storey, and L Mastroianni. 1977. "Hydrogen Ion and Carbon Dioxide Content of the Oviductal Fluid of the Rhesus Monkey (*Macaca Mulatta*)." *Fertility and Sterility* 28 (9) (September): 981–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307>.
- Makler, A. 1984. "A New Version of the 10-Microns Chamber and Its Use for Semen Analysis with Inverted Microscope." *Archives of Andrology* 13 (2-3) (January): 195–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6537745>.
- Marín-Briggiler, Clara I, Fernanda Gonzalez-Echeverría, Mariano Buffone, Juan C Calamera, Jorge G Tezón, and Mónica H Vazquez-Levin. 2003. "Calcium Requirements for Human Sperm Function in Vitro." *Fertility and Sterility* 79 (6) (June): 1396–403. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798888>.
- Mata-Martínez, Esperanza, Omar José, Paulina Torres-Rodríguez, Alejandra Solís-López, Ana A Sánchez-Tusie, Yoloxochitl Sánchez-Guevara, Marcela B Treviño, and Claudia L Treviño. 2013. "Measuring Intracellular Ca²⁺ Changes in Human Sperm Using Four Techniques: Conventional

- Fluorometry, Stopped Flow Fluorometry, Flow Cytometry and Single Cell Imaging." *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (75) (January). doi:10.3791/50344. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23728309>.
- Monné, Magnus, Ling Han, and Luca Jovine. 2006. "Tracking down the ZP Domain: From the Mammalian Zona Pellucida to the Molluscan Vitelline Envelope." *Seminars in Reproductive Medicine* 24 (4) (September): 204–16. doi:10.1055/s-2006-948550. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16944418>.
- Morgan, Anthony J, and Antony Galione. 2008. "Investigating cADPR and NAADP in Intact and Broken Cell Preparations." *Methods (San Diego, Calif.)* 46 (3) (November): 194–203. doi:10.1016/j.ymeth.2008.09.013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852050>.
- Navarro, Betsy, Yuriy Kirichok, Jean-Ju Chung, and David E Clapham. 2008. "Ion Channels That Control Fertility in Mammalian Spermatozoa." *The International Journal of Developmental Biology* 52 (5-6) (January): 607–13. doi:10.1387/ijdb.072554bn. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18649274>.
- Naylor, Edmund, Abdelilah Arredouani, Sridhar R Vasudevan, Alexander M Lewis, Raman Parkesh, Akiko Mizote, Daniel Rosen, et al. 2009. "Identification of a Chemical Probe for NAADP by Virtual Screening" 5 (4). doi:10.1038/nchembio.150.
- Nixon, Brett, and R John Aitken. 2009. "The Biological Significance of Detergent-Resistant Membranes in Spermatozoa." *Journal of Reproductive Immunology* 83 (1-2) (December): 8–13. doi:10.1016/j.jri.2009.06.258. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857901>.
- O'Toole, C M, C Arnoult, A Darszon, R A Steinhardt, and H M Florman. 2000. "Ca(2+) Entry through Store-Operated Channels in Mouse Sperm Is Initiated by Egg ZP3 and Drives the Acrosome Reaction." *Molecular Biology of the Cell* 11 (5) (May): 1571–84. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=14868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ohta, Yasuhiko, Akira Kitanaka, Keichiro Mihara, Osamu Imataki, Hiroaki Ohnishi, Terukazu Tanaka, Tomohiko Taminato, and Yoshitsugu Kubota. 2011. "Expression of CD38 with Intracellular Enzymatic Activity: A Possible Explanation for the Insulin Release Induced by Intracellular cADPR." *Molecular and Cellular Biochemistry* 352 (1-2) (June): 293–9. doi:10.1007/s11010-011-0765-x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21387169>.
- Okabe, Masaru. 2013. "The Cell Biology of Mammalian Fertilization." *Development (Cambridge, England)* 140 (22) (November): 4471–9. doi:10.1242/dev.090613. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24194470>.
- Okamura, N, Y Tajima, A Soejima, H Masuda, and Y Sugita. 1985. "Sodium Bicarbonate in Seminal Plasma Stimulates the Motility of Mammalian Spermatozoa through Direct Activation of Adenylate Cyclase." *The Journal of Biological Chemistry* 260 (17) (August 15): 9699–705. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2991260>.
- Ota, Kuniaki, Mukesh Kumar Jaiswal, Sivakumar Ramu, Rajasinjham Jeyendran, Joanne Kwak-Kim, Alice Gilman-Sachs, and Kenneth D Beaman. 2013. "Expression of a2 Vacuolar ATPase in Spermatozoa Is Associated with Semen Quality and Chemokine-Cytokine Profiles in Infertile Men." *PloS One* 8 (7) (January): e70470. doi:10.1371/journal.pone.0070470. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3728098&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Park, Kwang-Hyun, Byung-Ju Kim, John Kang, Tae-Sik Nam, Jung Min Lim, Hyoung Tae Kim, Jong Kwan Park, Young Gon Kim, Soo-Wan Chae, and Uh-Hyun Kim. 2011. "Ca2+ Signaling Tools Acquired

- from Protasomes Are Required for Progesterone-Induced Sperm Motility." *Science Signaling* 4 (173) (January): ra31. doi:10.1126/scisignal.2001595. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21586728>.
- Parkesh, Raman, Alexander M Lewis, Parvinder K Aley, Abdelilah Arredouani, Sara Rossi, Ricardo Tavares, Sridhar R Vasudevan, et al. 2008. "Cell-Permeant NAADP: A Novel Chemical Tool Enabling the Study of Ca²⁺ Signalling in Intact Cells." *Cell Calcium* 43 (6) (June): 531–8. doi:10.1016/j.ceca.2007.08.006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17935780>.
- Publicover, Stephen, Claire V Harper, and Christopher Barratt. 2007. "[Ca²⁺]_i Signalling in Sperm--Making the Most of What You've Got." *Nature Cell Biology* 9 (3) (March): 235–42. doi:10.1038/ncb0307-235. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17330112>.
- Ren, Dejian. 2011. "Calcium Signaling in Sperm: Help from Protasomes." *Science Signaling* 4 (173) (January): pe27. doi:10.1126/scisignal.2002102. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21586726>.
- Rutter, Guy A, and Elisa A Bellomo. 2008. "Ca²⁺ Signalling: A New Route to NAADP." *The Biochemical Journal* 411 (1) (April 1): e1–3. doi:10.1042/BJ20080282. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18333834>.
- Schmid, Frederike, Sören Bruhn, Karin Weber, Hans-Willi Mittrücker, and Andreas H Guse. 2011. "CD38: A NAADP Degrading Enzyme." *FEBS Letters* 585 (22) (November 16): 3544–8. doi:10.1016/j.febslet.2011.10.017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020217>.
- Stephoe, P C, and R G Edwards. 1978. "Birth after the Reimplantation of a Human Embryo." *Lancet* 2 (8085) (August 12): 366. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/79723>.
- Strünker, Timo, Normann Goodwin, Christoph Brenker, Nachiket D Kashikar, Ingo Weyand, Reinhard Seifert, and U Benjamin Kaupp. 2011. "The CatSper Channel Mediates Progesterone-Induced Ca²⁺ Influx in Human Sperm." *Nature* 471 (7338) (March 17): 382–6. doi:10.1038/nature09769. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412338>.
- Sun, Ting Ting, Chin Man Chung, and Hsiao Chang Chan. 2011. "Acrosome Reaction in the Cumulus Oophorus Revisited: Involvement of a Novel Sperm-Released Factor NYD-SP8." *Protein & Cell* 2 (2) (February): 92–8. doi:10.1007/s13238-011-1022-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21380641>.
- Tokuhiro, Keizo, Masahito Ikawa, Adam M Benham, and Masaru Okabe. 2012. "Protein Disulfide Isomerase Homolog PDILT Is Required for Quality Control of Sperm Membrane Protein ADAM3 and Male Fertility [corrected]." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (10) (March 6): 3850–5. doi:10.1073/pnas.1117963109. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3309714&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Treviño, C L, C M Santi, C Beltrán, A Hernández-Cruz, A Darszon, and H Lomeli. 1998. "Localisation of Inositol Trisphosphate and Ryanodine Receptors during Mouse Spermatogenesis: Possible Functional Implications." *Zygote (Cambridge, England)* 6 (2) (May): 159–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9770782>.
- Van Gestel, Renske A, Ian A Brewis, Peter R Ashton, Jos F Brouwers, and Barend M Gadella. 2007. "Multiple Proteins Present in Purified Porcine Sperm Apical Plasma Membranes Interact with the Zona Pellucida of the Oocyte." *Molecular Human Reproduction* 13 (7) (July): 445–54. doi:10.1093/molehr/gam030. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17483085>.

- Vasudevan, Sridhar R, Antony Galione, and Grant C Churchill. 2008. "Sperm Express a Ca²⁺-Regulated NAADP Synthase." *The Biochemical Journal* 411 (1) (April 1): 63–70. doi:10.1042/BJ20071616. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2518628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Vasudevan, Sridhar R, Alexander M Lewis, Jennifer W Chan, Claire L Machin, Debrosi Sinha, Antony Galione, and Grant C Churchill. 2010. "The Calcium-Mobilizing Messenger Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate Participates in Sperm Activation by Mediating the Acrosome Reaction." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (24) (June 11): 18262–9. doi:10.1074/jbc.M109.087858. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2881750&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Visconti, P E, V A Westbrook, O Chertihin, I Demarco, S Sleight, and A B Diekman. 2002. "Novel Signaling Pathways Involved in Sperm Acquisition of Fertilizing Capacity." *Journal of Reproductive Immunology* 53 (1-2) (January): 133–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11730911>.
- Walensky, L D, and S H Snyder. 1995. "Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors Selectively Localized to the Acrosomes of Mammalian Sperm." *The Journal of Cell Biology* 130 (4) (August): 857–69. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2199962&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wang, Haikun, Jin Liu, Kwang-Hyun Cho, and Dejian Ren. 2009. "A Novel, Single, Transmembrane Protein CATSPERG Is Associated with CATSPER1 Channel Protein." *Biology of Reproduction* 81 (3) (September): 539–44. doi:10.1095/biolreprod.109.077107. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2731986&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wassarman, Paul M, and Eveline S Litscher. 2009. "The Multifunctional Zona Pellucida and Mammalian Fertilization." *Journal of Reproductive Immunology* 83 (1-2) (December): 45–9. doi:10.1016/j.jri.2009.06.259. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875177>.
- Yamaguchi, Soichiro, Archana Jha, Qin Li, Abigail a Soyombo, George D Dickinson, Dev Churamani, Eugen Brailoiu, Sandip Patel, and Shmuel Muallem. 2011. "Transient Receptor Potential Mucolipin 1 (TRPML1) and Two-Pore Channels Are Functionally Independent Organellar Ion Channels." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (26) (July 1): 22934–42. doi:10.1074/jbc.M110.210930. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3123061&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yanagimachi, R. 1994. "Fertility of Mammalian Spermatozoa: Its Development and Relativity." *Zygote (Cambridge, England)* 2 (4) (November): 371–2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665172>.
- Zhang, Fan, and Pin-Lan Li. 2007. "Reconstitution and Characterization of a Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP)-Sensitive Ca²⁺ Release Channel from Liver Lysosomes of Rats." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (35) (August 31): 25259–69. doi:10.1074/jbc.M701614200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17613490>.