



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**Bases moleculares de los flujos de Ca^{2+} en el acrosoma del
espermatozoide de ratón**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Doctor en Ciencias

PRESENTA

M.C. Enrique Ismael Oliver Santiago

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alberto Darszon

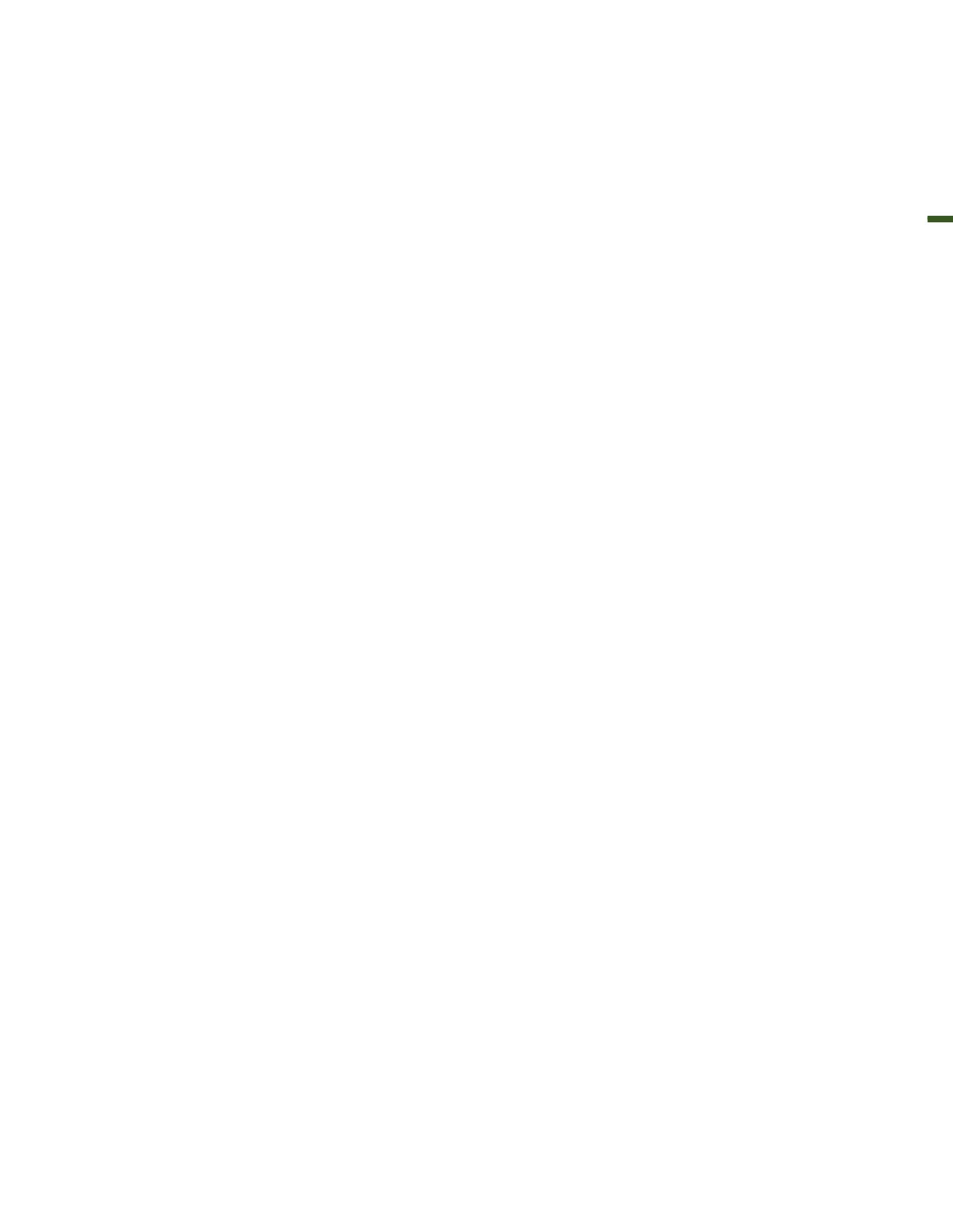
Cuernavaca, Morelos

junio 2023.

Este trabajo de investigación se realizó bajo la supervisión del Dr. Alberto Darszon Israel en el Consorcio de Fisiología del Espermatozoide (laboratorio # 16) del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular en el Instituto de Biotecnología-UNAM en la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

Durante la realización del proyecto, se contó con el apoyo de la M.V.Z. María Elena Elizabeth Mata Moreno, M.V.Z. Graciela Margarita Cabeza Pérez, Oswaldo López Gutiérrez y Sergio González Trujillo, para el cuidado de la colonia de ratones CD-1. También, se le agradece al Biol. José Luis de la Vega Beltrán, a la M.C. Yoloxochitl Sánchez Guevara y al L.I. Servando Aguirre Cruz por su apoyo técnico.

Este proyecto estuvo financiado por la DGAPA/UNAM (IN200919), el NIH (RO1 HD380882) y el CONACyT (71). Además, el M.C. Enrique Ismael Oliver Santiago contó con una beca otorgada por el CONACyT (472978) durante sus estudios de doctorado.





AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la sabiduría y el entendimiento para enfrentar los retos que se me han presentado a lo largo de mi vida.

A los investigadores que conforman el Consorcio de Fisiología del Espermatozoide (Dres. Alberto Darszon, Claudia Treviño y Takuya Nishigaki) por permitirme ser parte de su laboratorio y darme la oportunidad de trabajar en este proyecto de investigación. A la Dra. Nina Pastor, al Dr. Ignacio López y al Dr. Juan José Acevedo por sus comentarios y sugerencias que fueron muy valiosas durante el desarrollo de este trabajo.

Al Biol. José Luis, a la M.C. Yoloxochitl y la Dra. Carmen por su ayuda en la realización de los experimentos durante mi estancia en el laboratorio. En general, agradezco a todos los miembros del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide por sus consejos, bromas y molestias que hacen que el trabajo diario se vuelva más divertido.

A mi familia por el apoyo y cariño incondicional que siempre me han dado. Gracias a ellos estoy donde estoy, haciendo lo que me gusta.

A Nidia, Cinthya y Jafet por brindarme su amistad y seguir escuchándome, aunque acabáramos dedicándonos a cosas muy diferentes. A los integrantes de Titans Cuernavaca por alentarme en los momentos difíciles durante mi estadía en el equipo. A todos los camaradas que he conocido a lo largo de estos 8 años viviendo en el estado de Morelos.

Finalmente, agradezco al Dr. Alberto Darszon por aceptarme como alumno, por todo lo que me ha enseñado estos años, por su apoyo y por hacerme aficionado a los reservorios ácidos de Ca^{2+} . Muchas gracias.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La reproducción de los mamíferos	1
1.2. La reacción acrosomal	2
1.3. El acrosoma	3
1.4. Los organelos relacionados con el lisosoma (ORLs).....	4
1.5. Caracterización de los canales de Ca ²⁺ expresados en los ORLs usando imágenes de Ca ²⁺	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1. El pH _{acrosomal} (pH _a) y su papel en la RA	7
2.2. Los inhibidores del canal CatSper alteran el pH _a e inducen la RA.....	7
2.3. Los canales de Ca ²⁺ acrosomales en la RA.....	9
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPÓTESIS	11
5. OBJETIVOS	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	13
7. RESULTADOS	18
7.1. Los inhibidores de CatSper alcalinizan el pH _a de manera dependiente de la concentración	18
7.2. El Mib y el NNC inducen la liberación de Ca ²⁺ desde los reservorios intracelulares de manera dependiente de la concentración.....	19
7.3. Los inhibidores de CatSper liberan el Ca ²⁺ acrosomal.....	20
7.4. El agente lisosomotrópico, GPN alcaliniza el acrosoma del espermatozoide ratón de manera dependiente de la concentración.....	21
7.5. El GPN induce una escasa liberación del Ca ²⁺ acrosomal	22
7.6. Los inhibidores de CatSper y el GPN afectan diferencialmente la RA.....	23
7.7. La liberación del Ca ²⁺ acrosomal estimulada por los agentes lisosomotrópicos correlaciona con su capacidad para aumentar el pH _a	24

7.8. Los IP ₃ R no contribuyen en la liberación del Ca ²⁺ acrosomal estimulada por los inhibidores de CatSper.....	26
7.9. Los canales TPC1 participan en la liberación del Ca ²⁺ acrosomal estimulada por los inhibidores de CatSper.....	28
7.10. La liberación de Ca ²⁺ acrosomal mediada por los inhibidores de CatSper desencadena la SOCE.....	30
7.11. Los canales CRAC contribuyen a la SOCE desencadenada por los inhibidores de CatSper	31
7.12. El SKF aumenta la [Ca ²⁺] _i de manera dependiente de la concentración e induce la alcalinización acrosomal	35
7.13. El derivado de imidazol, SKF incrementa el [Ca ²⁺] _i intracelular sin alterar el pH _a en un medio con Ca ²⁺ 100 nM	36
8. DISCUSIÓN.....	38
8.1. El pH _a regula la liberación del Ca ²⁺ acrosomal	38
8.2. La liberación del Ca ²⁺ acrosomal dependiente del pH _a es a través de los canales TPC1 .	39
8.3. La liberación del Ca ²⁺ acrosomal dependiente del pH _a estimula la entrada de Ca ²⁺ extracelular a través de los canales CRAC	41
8.4. El SKF altera el pH _a y la [Ca ²⁺] _i por un mecanismo desconocido en el espermatozoide de ratón	42
8.5. Modelo de trabajo propuesto.....	42
9. CONCLUSIONES	43
10. BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del espermatozoide de ratón y su viaje a través del tracto reproductor femenino.....	1
Figura 2. Modelo de la reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero.....	2
Figura 3. Espermiogénesis y biogénesis del acrosoma en el espermatozoide de ratón.	3
Figura 4. Mecanismo de transporte de Ca^{2+} en los ORLs.....	4
Figura 5. Dos enfoques para monitorear el Ca^{2+} almacenado en los ORLs.....	5
Figura 6. Mecanismo de la unión y el encendido de la fluorescencia en los indicadores de Ca^{2+} sintéticos.....	5
Figura 7. Estructura y mecanismo de acción del Gly-Phe- β -naftilamida (GPN).	6
Figura 8. Estructura del canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide (CatSper).....	7
Figura 9. Mecanismo que induce el incremento de pH_a mediado por los inhibidores de CatSper... 8	
Figura 10. Diseño experimental del tratamiento con los inhibidores de canales de Ca^{2+} acrosomales y de la membrana plasmática.	16
Figura 11. Tinción de espermatozoides con azul de Coomassie.	17
Figura 12. El Mib y el NNC inducen el incremento del pH_a de manera dependiente de la concentración.	19
Figura 13. Los inhibidores de CatSper promueven la liberación del Ca^{2+} almacenado en los reservorios intracelulares de manera dependiente de la concentración.	20
Figura 14. El Mib y el NNC inducen la liberación del Ca^{2+} acrosomal.....	21
Figura 15. El agente lisosomotrópico, GPN induce la alcalinización del acrosoma de manera dependiente de la concentración.	22
Figura 16. El GPN induce una escasa liberación del Ca^{2+} acrosomal.....	23
Figura 17. Los agentes lisosomotrópicos afectan diferencialmente la RA.	24
Figura 18. Correlación lineal entre el aumento del pH_a y la liberación del Ca^{2+} acrosomal.	25
Figura 19. Los inhibidores de los IP_3R afectan diferencialmente la liberación del Ca^{2+} acrosomal estimulada por el Mib y el NNC.....	26
Figura 20. El 2-APB acidifica el acrosoma disminuyendo la capacidad del Mib para aumentar el pH_a	28
Figura 21. El Ned 19, un antagonista de los canales TPC1 disminuye significativamente la liberación del Ca^{2+} acrosomal estimulada por los inhibidores de CatSper.....	29

Figura 22. La liberación del Ca^{2+} acrosomal inducida por los inhibidores de CatSper desencadena la SOCE.....	31
Figura 23. Los tratamientos con 2-APB inhiben parcialmente la entrada de Ca^{2+} extracelular estimulada por los inhibidores de CatSper.....	32
Figura 24. Los IP_3R permanecen inactivos durante la alcalinización acrosomal inducida por los inhibidores de CatSper.....	33
Figura 25. El SKF reduce la entrada de Ca^{2+} extracelular estimulada por los inhibidores de CatSper.	34
Figura 26. El SKF aumenta los niveles Ca^{2+} intracelular de manera dependiente de la concentración y alcaliniza el pH_a en el espermatozoide de ratón.....	36
Figura 27. En un medio con bajo contenido de Ca^{2+} (100 nM), el SKF incrementa el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sin alterar el pH_a	37
Figura 28. Modelo de trabajo propuesto de las vías de señalización de Ca^{2+} durante la alcalinización acrosomal en el espermatozoide de ratón.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplo de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} sintéticos usados para monitorear el Ca^{2+} acrosomal en el espermatozoide de ratón.....	6
Tabla 2. Farmacología de los canales de Ca^{2+} acrosomales del espermatozoide de ratón.....	9
Tabla 3. Concentración de los compuestos usados en los registros.....	13

RESUMEN

El acrosoma es un reservorio ácido de Ca^{2+} localizado en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide. En los mamíferos, uno de los pasos claves que asegura una exitosa fecundación es la reacción acrosomal (RA). La RA consiste en una cascada de eventos moleculares dependientes de Ca^{2+} que resulta en la liberación del contenido acrosomal mediante su exocitosis y la exposición de una nueva membrana plasmática con capacidad fusogénica. Se ha propuesto que el canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide (CatSper) es una de las principales vías de ingreso de Ca^{2+} que regula la RA.

Recientes hallazgos muestran que los inhibidores de CatSper, Mibefradil y NNC 55-0396 son bases débiles anfipáticas capaces de incrementar el $\text{pH}_{\text{acrosomal}}$ (pH_a) en el espermatozoide de humano y ratón. La alcalinización del acrosoma estimula la liberación del Ca^{2+} almacenado en el organelo e induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) desencadenando la RA. No obstante, se desconoce el mecanismo de transporte de Ca^{2+} asociado al incremento de pH_a en el espermatozoide de mamífero. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue investigar las vías asociadas con el aumento de Ca^{2+} intracelular durante la alcalinización del acrosoma teniendo como modelo de estudio el espermatozoide de ratón.

Usando microscopia de epifluorescencia en célula única e inhibidores de CatSper, monitoreamos los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ asociados con el incremento de pH_a en la cabeza del espermatozoide. Encontramos que la alcalinización del acrosoma origina la liberación del Ca^{2+} almacenado sin comprometer la integridad del organelo. Conjuntamente, usamos el agente lisosomotrópico, Gly-Phe- β -naftilamida para evaluar la contribución del estrés osmótico en las señales de Ca^{2+} dependientes del incremento de pH_a . Nuestros resultados indican que el componente osmótico no contribuye significativamente en la liberación de Ca^{2+} acrosomal durante la alcalinización del organelo. Para establecer el mecanismo molecular que subyace en las señales de Ca^{2+} asociadas con el aumento de pH_a , usamos antagonistas de los canales permeables a Ca^{2+} expresados en el acrosoma y la membrana plasmática del espermatozoide de ratón. El tratamiento con el Ned 19, un antagonista de los canales de dos poros 1 (expresados en el acrosoma) redujo significativamente la liberación de Ca^{2+} acrosomal dependiente del incremento de pH_a . Asimismo, el tratamiento con los antagonistas (2-APB y SKF-96365) de los canales de Ca^{2+} activados por la liberación de Ca^{2+} (expresados en la membrana plasmática) redujo significativamente la entrada de Ca^{2+} extracelular estimulada por la liberación de Ca^{2+} acrosomal asociada con la alcalinización del organelo.

Nuestros hallazgos revelan un papel novedoso del pH_a en el control del eflujo de Ca^{2+} acrosomal y la entrada de Ca^{2+} extracelular durante la RA en el espermatozoide de ratón.

Palabras clave: acrosoma, reacción acrosomal, alcalinización del acrosoma, Ca^{2+} intracelular, canales dos poros 1, canales de Ca^{2+} activados por la liberación de Ca^{2+}

ABSTRACT

The acrosome is a lysosome-related vesicular organelle located in the sperm head. The acrosomal reaction (AR) is an exocytic process mediated by Ca^{2+} and essential for mammalian fertilization. It has been proposed that the flagellar-specific Ca^{2+} channel (CatSper) contributes to Ca^{2+} entry triggering the AR.

Recent findings show that CatSper inhibitors, Mibefradil (Mib), and NNC 55-0396 (NNC) are amphipathic weak bases able to alkalinize the acrosome in human and mouse sperm. Acrosomal pH (pH_a) elevation induces Ca^{2+} release from the organelle and stimulates the increase of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) triggering AR. However, the mechanisms of Ca^{2+} transport remain unknown in mammalian sperm. Here, we investigated the pathways associated with the pH_a increase-induced Ca^{2+} signals using mouse sperm as a model.

Using single-cell epifluorescence microscopy, we monitored $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes associated with pH_a increase caused by CatSper inhibitors in the sperm head. Our findings show that Mib and NNC increase pH_a and release acrosomal Ca^{2+} without compromising acrosomal membrane integrity. We also used the lysosomotropic agent, Gly-Phe- β -naphthylamide to evaluate the contribution of osmotic stress in Ca^{2+} signals during acrosomal alkalinization. Our results show that the osmotic component does not significantly contribute to acrosomal Ca^{2+} release caused by pH_a elevation. To establish the molecular mechanism underlying Ca^{2+} signals associated with pH_a increase, we used different antagonists of Ca^{2+} channels localized in the acrosome and the plasma membrane of mouse sperm. The treatment with Ned 19, an antagonist of two-pore channel 1 (expressed in the acrosome) significantly reduced the acrosomal Ca^{2+} release dependent on pH_a increase. Likewise, the treatment with antagonists (2-APB and SKF-96365) of Ca^{2+} channels activated by Ca^{2+} release (expressed on the plasma membrane) significantly reduced extracellular Ca^{2+} influx stimulated by acrosomal Ca^{2+} release associated with organelle alkalinization.

Finally, our findings contribute to understanding how pH_a controls acrosomal Ca^{2+} efflux and extracellular Ca^{2+} entry during AR in mouse sperm.

Keywords: acrosomal vesicle, acrosomal reaction, acrosomal alkalinization, Ca^{2+} signals, Two-pore channels 1, Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La reproducción de los mamíferos

La fecundación es un evento biológico altamente regulado que permite la formación de un nuevo individuo mediante la fusión de dos gametos: el óvulo y el espermatozoide (figura 1A), los cuales provienen de dos individuos de la misma especie. En los mamíferos, la fecundación consiste en el viaje del espermatozoide a través del tracto reproductor femenino hasta el ámpula, región del oviducto donde se localiza el óvulo maduro. Durante el recorrido, el espermatozoide se encuentra con varios obstáculos, por ejemplo: la respuesta del sistema inmune de la hembra, la mucosa cervical, la delgada unión útero-tubárica, el laberinto de los pliegues epiteliales del oviducto cerca del ámpula y la protección de óvulo (figura 1B). Estas barreras reducen notablemente las posibilidades de que la célula pueda alcanzar y fecundar al óvulo (Yanagimachi 2022). Por lo anterior, el espermatozoide sufre cambios bioquímicos (p. ej., la fosforilación de proteínas), fisiológicos (p. ej., el incremento de Ca^{2+} intracelular) y morfológicos (p. ej., la reacción acrosomal) durante su viaje hacia el óvulo, los cuales le permiten evadir esos obstáculos.

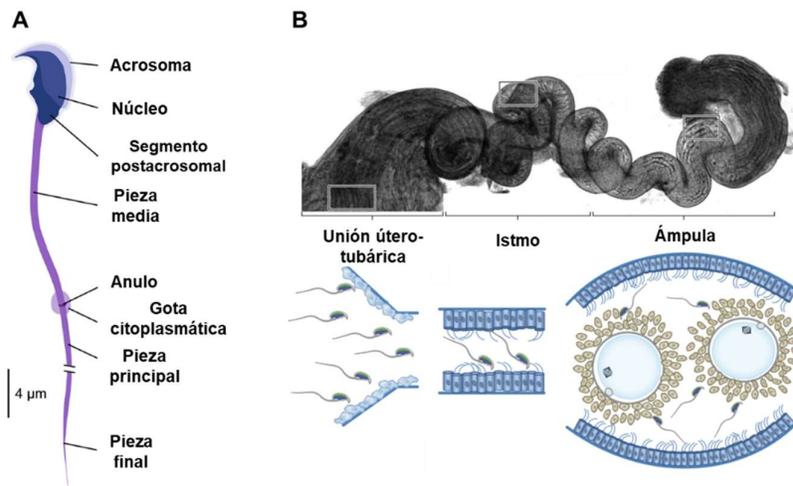


Figura 1. Morfología del espermatozoide de ratón y su viaje a través del tracto reproductor femenino.

A. Se muestra una representación esquemática de la morfología del espermatozoide de ratón. En la cabeza se localiza el núcleo y el acrosoma, ambos rodeados por una pequeña cantidad de citoplasma. El flagelo se divide en tres partes: la pieza media, la pieza principal y la pieza final. El axonema que se encuentra a lo largo de la pieza media y principal provee de movimiento a la célula. La gota citoplasmática almacena los restos de los organelos generados durante la diferenciación de la célula y se pierde durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo. **B.** Representación esquemática del viaje del espermatozoide a través del tracto genital femenino durante la fecundación. Modificado de: She et al. 2021 y Bianchi & Wright 2016.

1.2. La reacción acrosomal

Antes de ser eyaculado, el espermatozoide es incapaz de fecundar al óvulo, esta capacidad la adquiere en un proceso de maduración conocido como capacitación (Austin 1951; Chang 1951). La capacitación tiene lugar en el tracto genital femenino y comprende una serie de eventos moleculares que preparan a la célula para someterse a un evento exocítico único llamado reacción acrosomal (RA). La RA es dependiente de Ca^{2+} y crucial para que el espermatozoide pueda fusionarse con óvulo (Darszon et al., 2011). Este proceso involucra múltiples eventos de fusión entre la membrana plasmática de la célula y sitios específicos de la membrana externa de una vesícula grande llamada, acrosoma (figura 2) (Balestrini et al., 2020). La exocitosis del acrosoma es desencadenada por inductores fisiológicos del gameto femenino (p. ej., la zona pelúcida), su vecindad (p. ej., la progesterona liberada por las células de la granulosa), o por exposición a estímulos farmacológicos apropiados (p. ej., los ionóforos de Ca^{2+}). Sin importar el tipo de inductor (fisiológico o no fisiológico), todos causan un incremento del Ca^{2+} intracelular que activa la maquinaria de fusión de membranas (Beltrán et al., 2016). Se ha demostrado que los hombres o los ratones portadores de mutaciones que afectan la formación o función del acrosoma son estériles o muestran subfertilidad severa (Khawar et al., 2019).

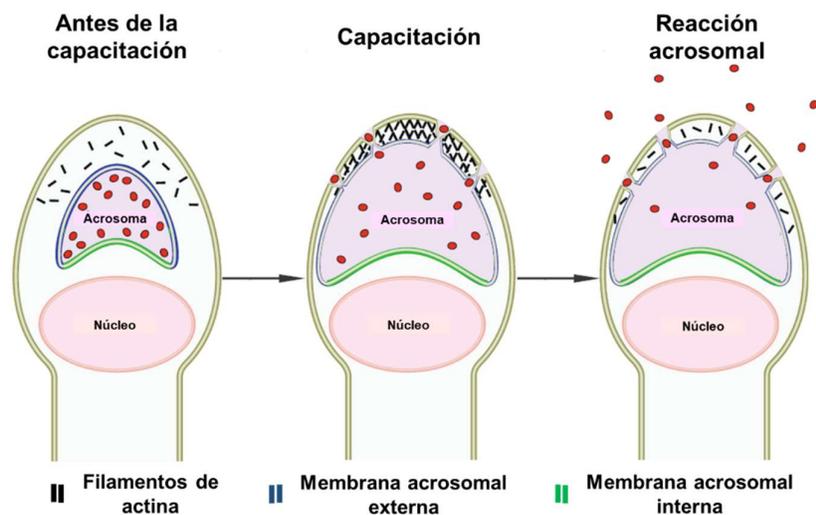


Figura 2. Modelo de la reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero.

La capacitación prepara al espermatozoide para la reacción acrosomal (RA), un proceso dependiente de Ca^{2+} y esencial para la fecundación en los mamíferos. La RA tiene múltiples similitudes con otros eventos de exocitosis, pero también tiene propiedades únicas: 1. El espermatozoide solo posee una vesícula secretora, el acrosoma; 2. Se establecen múltiples puntos de fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática; 3. La fusión de membranas da como resultado la formación y liberación de vesículas híbridas; y 4. No se lleva a cabo el reciclaje de membranas, haciendo que la RA sea irreversible. Modificado de: Mayorga et al. 2007 y Romarowski et al., 2016

1.3. El acrosoma

La vesícula acrosomal es una clase especial de organelo que se origina a partir del aparato de Golgi y el compartimento endolisosomal durante la espermiogénesis (figura 3) (Khawar et al., 2019). Tiene un pH ácido (~ 5.3) antes de la capacitación (Nakanishi et al., 2001), el cual se logra por la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar (v-ATPasa), un complejo proteico que utiliza la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) para transportar H^+ a través de la membrana del organelo (Sun-Wada et al., 2002). Además, almacena una amplia gama de enzimas hidrolíticas (p. ej., las catepsinas) que son esenciales para su exocitosis y la fecundación (Guyonnet et al., 2012; Khawar et al., 2019). En el espermatozoide de mamífero, el acrosoma también actúa como un reservorio de Ca^{2+} intracelular (Walensky & Snyder 1995; Treviño et al., 1998; O'Toole et al., 2000; Herrick et al., 2005). Con base en estos hallazgos, se le ha considerado a la vesícula acrosomal como un organelo relacionado con el lisosoma (Khawar et al., 2019).

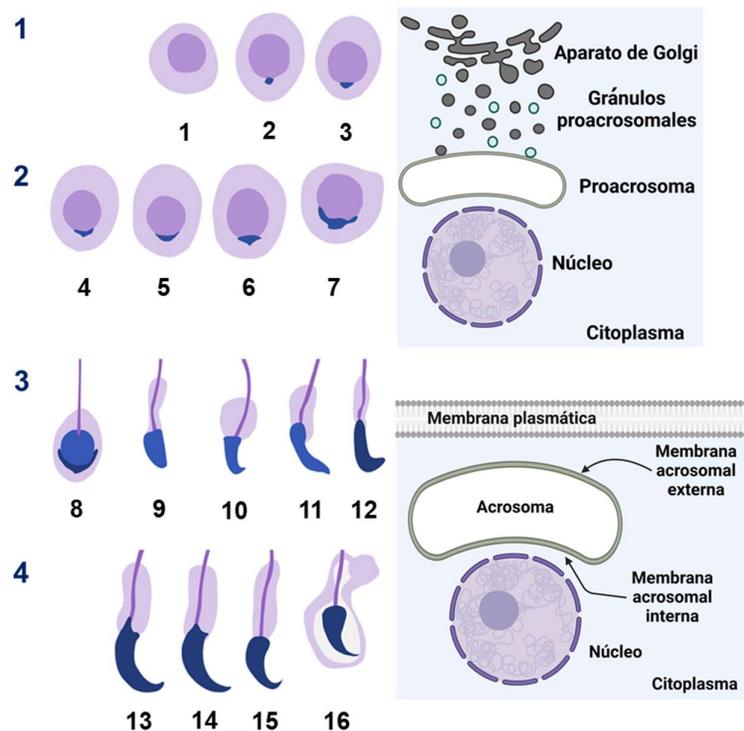


Figura 3. Espermiogénesis y biogénesis del acrosoma en el espermatozoide de ratón.

La biogénesis de la vesícula acrosomal ocurre durante la espermiogénesis, proceso a través del cual una espermátida se convierte en un espermatozoide. La biogénesis del acrosoma consta de cuatro fases: 1. La fase de Golgi (estadio 1-3), en la cual el aparato de Golgi junto con el compartimento endolisosomal forman las vesículas proacrosomales que migran a la vecindad del núcleo. 2. La fase de capa (estadio 4-7), en donde el proacrosoma formado por la fusión de las vesículas proacrosomales se alarga y cubre 1/3 de la superficie nuclear transformándose en una capa muy fina. 3. La fase de acrosoma (estadio 8-12), en la cual la vesícula acrosomal comienza a re-localizarse en la región apical de la espermátida elongada. 4. La fase de maduración (estadio 13-16), la última, la membrana acrosomal se diferencia en dos regiones: la región externa (localizada por debajo de la membrana plasmática) y la región interna (localizada por encima del núcleo). Modificado de: Khawar et al., 2019 y She et al., 2021. Creado con BioRender.com

1.4. Los organelos relacionados con el lisosoma (ORLs)

Los ORLs son reservorios ácidos de Ca^{2+} que se originan a partir de la red trans-Golgi y el compartimento endolisosomal (en particular de los endosomas tempranos, endosomas tardíos y los lisosomas); tienen una morfología, composición y fisiología única acorde con la célula donde residen (Marks et al., 2013, Delevoye et al., 2009; Khawar et al., 2019). Su $\text{pH}_{\text{luminal}}$ (4.5-6.0) es regulado por la v-ATPasa, los canales de Cl^- , los canales de K^+ (BK), el intercambiador Na^+/H^+ y las fugas de H^+ (revisado en Freeman et al., 2023 y Wahl-Schott et al., 2023). Actualmente, las rutas de captación de Ca^{2+} en estos reservorios aún no es clara. Sin embargo, resultados de varias investigaciones sugieren que el gradiente de H^+ impulsa el antiporte de Ca^{2+} hacia el organelo desde el citosol. Conjuntamente, se ha propuesto que el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ puede ser una de las entidades molecular responsable de este mecanismo (Melchionda et al., 2016; Morgan et al., 2022). En cambio, hay un mayor avance en la identificación de las entidades moleculares que permiten la liberación del Ca^{2+} almacenado. Semejante al Retículo Endo/Sarcoplásmico (RE/RS), los ORLs expresan múltiples familias de canales de Ca^{2+} (figura 4) que son activados por segundos mensajeros como el inositol trifosfato (IP_3) y la adenosina difosfato ribosa (ADPR, del inglés adenosine diphosphate ribose). Además, ligandos como el ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP, del inglés nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) o el lípido específico de endolisomas restringido a la membrana, fosfatidilinositol 3,5-bifosfato ($\text{PI}(3,5)\text{P}_2$) estimulan también la liberación de Ca^{2+} desde estos organelos ácidos (Davis et al., 2022). Hasta el momento se ha reportado la presencia de los canales de dos poros (1/2) (TPC, del inglés two-pore channels), el receptor purinérgico P2X4, los canales receptores de potencial transitorio (TRP, del inglés transient receptor potential) relacionados con la mucolipina-1 (TRPML) y la melastatina-2 (TRPM2) (revisado en Davis et al., 2022 y Wahl-Schott et al., 2023). Si bien estos resultados son muy claros bajo condiciones experimentales en células somáticas, en el espermatozoide de mamífero se requiere una investigación más profunda.

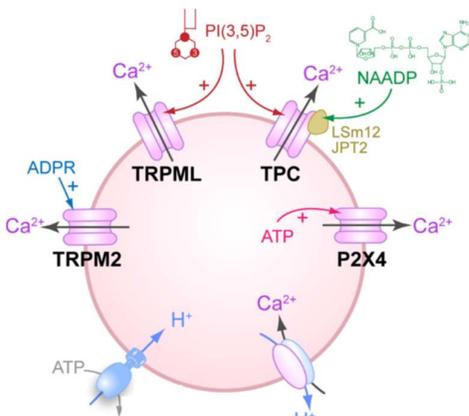


Figura 4. Mecanismo de transporte de Ca^{2+} en los ORLs.

Se muestra un esquema de los canales de Ca^{2+} reportados hasta el momento en estos reservorios ácidos de Ca^{2+} como, por ejemplo: los canales TPC (1/2) que son regulados directamente por el $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ o por la unión del NAADP a las proteínas accesorias LSm12 y JPT2. Además, estos organelos expresan a los canales TRPML y los canales TRPM2 que son estimulados directamente por el $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ y la ADPR, respectivamente. También, se ha reportado la presencia de los receptores purinérgicos (P2X4) que son regulados directamente por el $\text{ATP}_{\text{luminal}}$. En este esquema solo se muestra a la v-ATPasa como la identidad molecular que mantiene el $\text{pH}_{\text{luminal}}$ ácido para facilitar la

visibilidad de los canales de Ca^{2+} . Asimismo, se ha propuesto que el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ es el responsable de captar el Ca^{2+} en estos organelos. Modificado de: Davis et al., 2022.

1.5. Caracterización de los canales de Ca²⁺ expresados en los ORLs usando imágenes de Ca²⁺

Existen dos métodos que permiten monitorear las señales de Ca²⁺ generadas por los canales iónicos expresados en los ORLs, uno indirecto y el otro directo. En el método indirecto el indicador de Ca²⁺ se encuentra libre en el citosol o anclado en la superficie del organelo, la amplitud de la señal de Ca²⁺ resultante es cuantitativamente proporcional al contenido de Ca²⁺ en la poza ácida (figura 5A). En cambio, en el método directo, el indicador de Ca²⁺ se localiza en el lumen del organelo y reporta el valor cuantitativo de la concentración luminal de este catión (figura 5B) (Morgan et al., 2020; Zajac et al., 2022). Actualmente, se han desarrollado indicadores de Ca²⁺ codificados genéticamente y sondas fluorescentes sintéticas permeables a la célula para hacer este análisis.

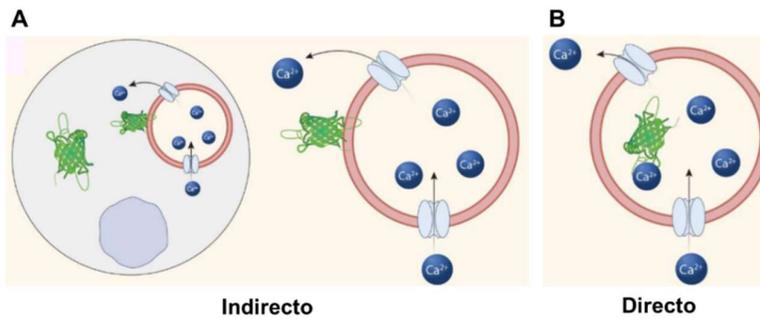
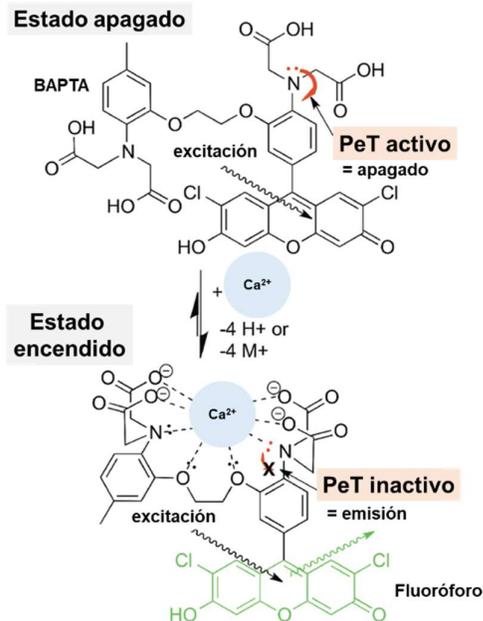


Figura 5. Dos enfoques para monitorear el Ca²⁺ almacenado en los ORLs.

A. El Ca²⁺ almacenado en la poza ácida se monitorea indirectamente con una sonda de Ca²⁺ en el citoplasma o anclada en la superficie del organelo. **B.** La cuantificación directa de Ca²⁺ necesita un indicador localizado en el lumen del organelo.

Modificado de: Zajac et al., 2022.



En particular, los indicadores fluorescentes de Ca²⁺ sintéticos consisten en un fluoróforo (p. ej., la fluoresceína) unido químicamente a un motivo quelante de Ca²⁺ (p. ej., el BAPTA, un ácido aminopolicarboxílico específico de Ca²⁺). En ausencia de Ca²⁺, la transferencia de electrones fotoinducida (PeT) del motivo quelante rico en electrones apaga la fluorescencia del fluoróforo. La unión de Ca²⁺ al motivo quelante disminuye la PeT y el fluoróforo aumenta su fluorescencia (figura 6) (Zhou et al., 2021, Zajac et al., 2022).

Figura 6. Mecanismo de la unión y el encendido de la fluorescencia en los indicadores de Ca²⁺ sintéticos.

Se muestra un ejemplo de los dos estados (apagado y encendido) del indicador fluorescente de Ca²⁺ sintético. Modificado de: Thapa et al., 2019.

En la actualidad existen varios indicadores fluorescentes de Ca^{2+} sintéticos disponibles comercialmente que tienen afinidades variables por el catión, características espectrales particulares, diferente capacidad de permeabilidad celular y capacidades radiométricas distintas (tabla 1).

Tabla 1. Ejemplo de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} sintéticos usados para monitorear el Ca^{2+} acrosomal en el espermatozoide de ratón.

	Indicador	Afinidad (rango o K_d)	Concentración de uso	Referencias
Ca^{2+} acrosomal	Fluo-5N	90 μM	4 μM	Ferreira et al., 2021 Herrick et al., 2005
	Calcium green-5N	14 μM		
Ca^{2+} intracelular	Fluo-3	0.34 μM	4 μM	Chávez et al., 2018
	Fluo-4	0.35 μM		

Otra estrategia clave para evaluar el papel de los ORLs en los procesos celulares es mediante el uso de herramientas farmacológicas capaces de alterar la integridad de la membrana de los organelos o la homeostasis iónica (Barral et al., 2022). Tradicionalmente, los agentes lisosomotrópicos permeables a la membrana se han utilizado para alterar las funciones de los LROs e incluyen dos clases distintas: los péptidos modificados (p. ej., el Gly-Phe- β -naftilamida, figura 7) y las bases débiles anfipáticas (p. ej., aminas secundarias) (Berg et al., 1994). Debido al ambiente luminal ácido, los agentes lisosomotrópicos se protonan y quedan atrapados dentro de las pozas ácidas. Al mismo tiempo, la protonación aumenta el $\text{pH}_{\text{luminal}}$ y la alta concentración de estas moléculas puede llegar a generar cambios osmóticos alterando la función de los organelos. Estos cambios estimulan la liberación del Ca^{2+} almacenado en los ORLs (Morgan et al., 2020). Por lo anterior, el uso de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} sintéticos y los agentes lisosomotrópicos son una herramienta útil para estudiar el papel de los canales de Ca^{2+} expresados en estas pozas ácidas.

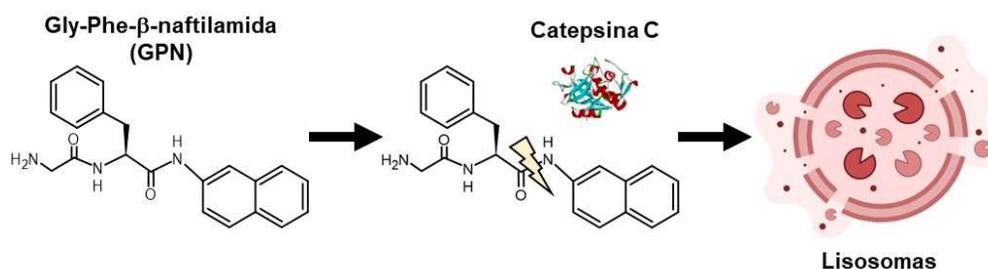


Figura 7. Estructura y mecanismo de acción del Gly-Phe- β -naftilamida (GPN).

El GPN es un sustrato artificial de la proteasa lisosomal, catepsina C. Es un agente ampliamente usado para el estudio de las señales de Ca^{2+} originadas desde los organelos ácidos. La acumulación de este agente en los reservorios ácidos de Ca^{2+} (p. ej., los ORLs) induce el incremento del $\text{pH}_{\text{luminal}}$ y su hidrólisis mediada por la catepsina C puede ocasionar cambios osmóticos que conducen a la lisis del organelo. Creado con BioRender.com y Chemscketch.

subunidades: CatSper1-4 (la subunidad 3 no se muestra para facilitar la visibilidad de las otras estructuras). Además, tiene subunidades accesorias que forman un “pabellón” similar a una tienda de campaña sobre el poro: CatSper β , γ , δ y ϵ (CatSper δ no se muestra para ayudar a la visibilidad de los demás componentes). SLCO6C1 (del inglés solute carrier organic anion transporter family, member 6c1) es una proteína asociada al complejo que transporta aniones. Otras proteínas asociadas son CatSper η y TMEM249 (del inglés transmembrane protein 249), las cuales contribuyen al ensamblaje del canal. CatSper ζ y EFCAB9 (del inglés EF-hand Ca^{2+} binding domain 9) son componentes citoplasmáticos del complejo que regulan su actividad, participando en la detección de Ca^{2+} y la dependencia al $\text{pH}_{\text{luminal}}$. Modificado de: Clapham & Hulse 2021 y Hwang & Chung 2022.

Se ha propuesto que el flujo de Ca^{2+} a través del canal CatSper contribuye en la inducción de la RA en el espermatozoide de ratón. Este canal también es importante para estimular la motilidad hiperactiva del flagelo y su ausencia origina infertilidad. Sorprendentemente, el espermatozoide capacitado carente de esta proteína puede llevar a cabo la RA y fecundar el óvulo libre de zona pelúcida en condiciones *in vitro* (Ren et al., 2001). Esto último, sugiere la existencia de otros mecanismos que proveen el Ca^{2+} en condiciones fisiológicas para estimular la RA.

Recientemente, demostramos que el Mibefradil (Mib) y el NNC 55-0396 (NNC) (figura 9A), ambos inhibidores de CatSper, son bases débiles anfipáticas capaces de acumularse y protonarse en el acrosoma del espermatozoide de humano y ratón (figura 9B). La acumulación y protonación elevan el pH_a estimulando la liberación del Ca^{2+} almacenado en el organelo y un influjo de Ca^{2+} extracelular. El incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) desencadena la RA por un mecanismo aún desconocido (Chávez et al., 2018). Con base en lo anterior, nuestro grupo ha propuesto que el aumento del pH_a es un proceso crucial para regular los flujos de Ca^{2+} que desencadenan la RA bajo condiciones fisiológicas en el espermatozoide de mamífero.

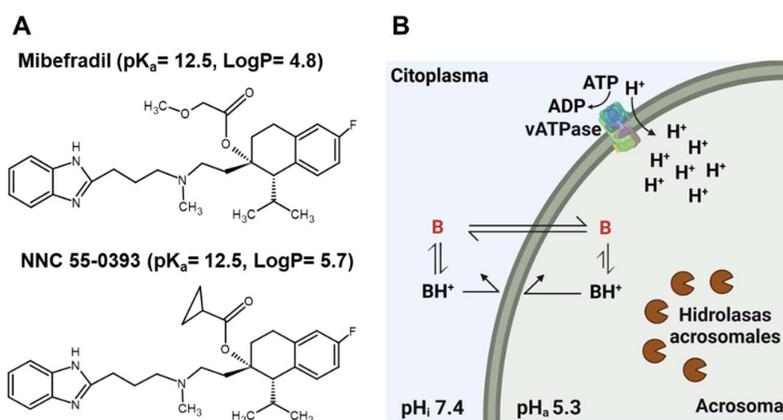


Figura 9. Mecanismo que induce el incremento de pH_a mediado por los inhibidores de CatSper.

A. Se muestra la estructura de los inhibidores de CatSper y sus propiedades fisicoquímicas, pK_a y el coeficiente de partición (LogP). Estos datos se obtuvieron con el programa ChemAxon. **B.** Las bases débiles anfipáticas (**B**) como el Mib y el NNC difunden a través de la membrana plasmática del espermatozoide desde una región con alta concentración a una con baja concentración. Dentro de la célula, estos compuestos se acumulan y protonan (BH^+) dentro del acrosoma desencadenando señales de Ca^{2+} que culminan en la inducción de la RA. Creado con BioRender.com y Chemscketch.

Adicionalmente, se ha reportado también que ambos inhibidores de CatSper inducen un aumento de la [Ca²⁺]_i en células somáticas. Este incremento se asocia con la liberación de Ca²⁺ desde el RE a través de los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R, del inglés inositol trisphosphate receptor) mediante la activación de la vía de la fosfolipasa C. El vaciamiento del RE desencadena la entrada de Ca²⁺ extracelular mediante la vía de entrada de Ca²⁺ operada por los reservorios intracelulares de Ca²⁺ (SOCE, del inglés store-operate Ca²⁺ entry) a través de los canales de la familia Orai (Eberhard et al., 1995; Huang et al. 2015; Souza-Bomfim et al., 2021; Visa et al., 2022). En el espermatozoide de ratón, se ha reportado la presencia de estos canales de Ca²⁺ y contribuyen a los flujos de Ca²⁺ que desencadenan la RA.

2.3. Los canales de Ca²⁺ acrosomales en la RA

Los canales de Ca²⁺ expresados en la vesícula acrosomal contribuyen al aumento de la [Ca²⁺]_i necesario para la RA. En el espermatozoide de ratón, la concentración del Ca²⁺ acrosomal está regulada por los IP₃R (Walensky & Snyder 1995, Treviño et al., 1998, Herrick et al., 2005), las ATPasas de Ca²⁺ de tipo ER/SR (Lawson et al., 2007), los receptores de rianodina (Treviño et al., 1998) y los canales TPC1 (Arndt et al., 2014). En la tabla 2, se muestra un resumen de la farmacología de estas entidades moleculares.

Tabla 2. Farmacología de los canales de Ca²⁺ acrosomales del espermatozoide de ratón.

Antagonista	Blanco (IC ₅₀)	Inductor de la RA	Efecto sobre la RA	Referencia
2-APB	IP ₃ R (10 μM)	Espontanea NAADP (0.05-50 μM)	No inhibe Inhibe	Arndt et al., 2014
Rojo de rutenio	Receptor de rianodina (10 μM)	Espontanea NAADP (50 μM)	No inhibe Inhibe	
Ned 19	TPC1 (100 μM)	NAADP (0.05-50 μM) Zona pelúcida	No inhibe Inhibe	
Heparina	IP ₃ R (10 μM)	Tapsigargina (10 μM)	Inhibe	Walensky & Snyder 1995
Tapsigargina	ATPasa de Ca ²⁺ (10-20 μM)		Induce	Herrick et al., 2005

CI₅₀: La mitad de la concentración inhibitoria máxima.

Todas ellas han mostrado una pH dependencia como parte de su mecanismo de activación (Haller et al., 1996; Tsukioka et al., 1994; Li et al., 2012; Cang et al., 2014; Xiong & Zhu 2016). Sin embargo, aún se desconoce cómo el pH_a regula el aumento de la [Ca²⁺]_i en los espermatozoides de ratón. Por lo tanto, abordar cómo la alcalinización acrosomal regula los canales de Ca²⁺ en este organelo es importante para comprender mejor los mecanismos moleculares que conducen a la RA.

3. JUSTIFICACIÓN

El acrosoma es un reservorio ácido de Ca^{2+} que se localiza en la cabeza del espermatozoide. La RA es un proceso altamente regulado, dependiente de Ca^{2+} , e indispensable para la fecundación en los mamíferos. Se ha propuesto que CatSper, es una de las entidades moleculares principales encargadas de regular los flujos de Ca^{2+} que desencadenan la RA. Igualmente, diversos trabajos de investigación han demostrado que los canales de Ca^{2+} expresados en la vesícula acrosomal también participan en dicha regulación. No obstante, nuestro conocimiento sobre los transportadores que controlan los flujos del Ca^{2+} en el espermatozoide durante la RA es aún muy limitado.

Recientemente, demostramos que los fármacos inhibidores de CatSper, Mibefradil y NNC 55-0396 son bases débiles anfipáticas, capaces de alcalinizar el acrosoma del espermatozoide de humano y ratón. El incremento de pH_a desencadena la liberación del Ca^{2+} almacenado en el organelo, estimula la entrada del Ca^{2+} extracelular e induce la RA. Estos hallazgos sugieren en principio que el pH_a puede regular los flujos de Ca^{2+} que conducen a la exocitosis del organelo en el espermatozoide de mamífero. Considerando que dicha regulación es poco conocida, sería importante dilucidar: cuáles son las entidades moleculares que regulan la movilidad del Ca^{2+} acrosomal durante la alcalinización del organelo, así mismo, identificar los canales de Ca^{2+} expresados en la membrana plasmática que se regulan por la liberación del Ca^{2+} acrosomal. Los resultados obtenidos ayudarán a comprender más los mecanismos moleculares que subyacen la RA en el espermatozoide de mamífero.

4. HIPÓTESIS

Los canales de Ca^{2+} acrosomales dependientes de pH participan en la regulación de los flujos de Ca^{2+} que conducen a la exocitosis del organelo en el espermatozoide de ratón.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el mecanismo molecular por el cual el pH_a regula los flujos de Ca^{2+} en el espermatozoide de ratón.

Objetivos específicos

- Diseñar la influencia directa del pH_a sobre la liberación del Ca^{2+} acrosomal, del cambio osmótico que éste produce.
- Identificar la o las entidades moleculares permeables a Ca^{2+} en el acrosoma que se activan durante la alcalinización del organelo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El NNC 55-0396 (NNC), la Xestospongina C (Xc), el SKF-96365 (SKF), el Dimetilsulfóxido (DMSO), el Ácido Etilenglicol Tetraacético (EGTA), el Ácido Plurónico F-127 se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El Mibefradil (Mib) y la Ionomicina (Iono) de Alomone (Jerusalén, Israel). El dipéptido modificado Gly-Phe-β-naftilamida (GPN) se obtuvo de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). El 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB), el *trans*-Ned 19 (*t*Ned 19) y el *cis*-Ned 19 (*c*Ned 19) se adquirieron de Tocris Bioscience (Bristol, UK). Las sondas fluorescentes Fluo-3 AM, Fluo-5N AM y el LysoSensor Green DND-189 (LSG) se obtuvieron de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA). A excepción del LSG, los compuestos se diluyeron y almacenaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (tabla 3).

Tabla 3. Concentración de los compuestos usados en los registros.

Compuesto	Disolvente	Blanco (CI ₅₀)	Concentración usada	Referencia
NNC	H ₂ O	CatSper (10 μM) ^H	10 μM	Strünker et al., 2011
Mib	H ₂ O	CatSper (40 μM) ^H	30 μM	Chávez et al., 2018
Xc	DMSO	IP ₃ R (1 μM) ^H	2 μM	Mata-Martínez et al. 2018
2-APB	DMSO	Canales CRAC (5-10 μM) ¹ IP ₃ R (100 μM) ²	50 μM 100 μM	Zhang et al., 2020 ¹ Bakowski et al. 2021 ¹ Gambardella et al., 2021 ²
SKF	DMSO	Canales CRAC (10-20 μM)	10 μM	Treviño et al., 2006
<i>t</i> Ned 19	DMSO	TPC1/2 (100 μM)	100 μM	Arndt et al., 2014 ²
<i>c</i> Ned 19				Sánchez-Tusie et al., 2014
Agente lisosomotrópico				
GPN	DMSO	Organelos ácidos (50 μM) ^H	100 μM	Sánchez-Tusie et al., 2014
Quelante de Ca²⁺				
EGTA	H ₂ O	---	---	---
Ionóforo de Ca²⁺				
Iono	DMSO	---	10 μM	---
Sondas fluorescentes				
LSG	DMSO	---	500 nM	---
Fluo-3	DMSO	---	2 μM	
Fluo-5N	DMSO	---	1 μM	

Nota: Los datos presentados son los reportados en espermatozoides de humano (H). La concentración del 2-APB para los canales CRAC se tomó de los reportes en células somática. CI₅₀: La mitad de la concentración inhibitoria máxima.

Medio de registro

A menos que se indique lo contrario, todos los experimentos se realizaron en medio TYH (medio de registro) con Ca^{2+} 100 nM en condiciones no capacitantes. Para ajustar el medio de registro con Ca^{2+} 100 nM se usó el programa Maxchelator (Stanford University) y como agente quelante EGTA. El medio TYH contiene (en mM): NaCl 119.5, KCl 4.7, CaCl_2 1.71, KH_2PO_4 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2, HEPES 20, glucosa 5.56 y piruvato de sodio 0.51, pH = 7.4 a 37°C.

Colecta de la muestra biológica

El Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México aprobó los protocolos experimentales. Los espermatozoides motiles se obtuvieron de los epidídimos (región de la cauda) posterior al sacrificio de ratones CD-1 (3 meses de edad) mediante dislocación cervical. Brevemente, a cada epidídimo se le hicieron pequeños cortes y se depositaron cuidadosamente en el fondo de un tubo Eppendorf (1.5 mL). A continuación, se adicionó medio de registro (700 μL) y se incubaron durante 5 min a 37°C. Durante este tiempo solo aquellas células con mejor motilidad migran a la parte superior de medio. Al finalizar la incubación, se tomaron 500 μL ($\sim 1\text{-}3 \times 10^6$ células) del sobrenadante para realizar los distintos ensayos.

Evaluación de los cambios en el Ca^{2+} intracelular y acrosomal

El aumento del Ca^{2+} intracelular y la liberación del Ca^{2+} acrosomal se determinó usando las sondas fluorescentes Fluo-3 y Fluo-5N, respectivamente. Brevemente, las células colectadas se incubaron con Fluo-3 AM o Fluo-5N AM más ácido plurónico F-127 (0.05%) durante 40 min a 37°C en oscuridad. Para recuperar las células cargadas, la suspensión se centrifugó durante 5 min a 2 000 rpm, el sobrenadante se descartó cuidadosamente y la pastilla obtenida se resuspendió en un volumen apropiado con medio de registro (100 μL). Los espermatozoides se mantuvieron a 37°C en oscuridad hasta el término de los experimentos. Las células cargadas con Fluo-3 o Fluo-5N se excitaron usando un LED azul ($\lambda = 380\text{--}475$ nm, 3.15 A, Luminus Devices, Woburn, MA), un filtro de excitación (HQ480/40x), un espejo dicróico (Q505lp) y un filtro de emisión (HQ535/50m) (Chroma Technology, Bellown Falls, VT).

Estimación de los cambios en el $\text{pH}_{\text{acrosomal}}$ (pH_a)

El pH_a se evaluó usando la sonda fluorescente LSG. Brevemente, los espermatozoides (1 mL; $\sim 1\text{-}3 \times 10^6$ células) se incubaron con LSG durante 10 min a 37°C en oscuridad. Posteriormente, las células cargadas se recuperaron siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior. Los espermatozoides cargados con LSG se excitaron usando un LED Azul Real ($\lambda = 450\text{--}455$ nm, 3.15 A, Luminus Devices), un filtro de excitación (D440/20x), un espejo dicróico (T455lp) y un filtro de emisión (ET510/80m) (Chroma Technology).

Adquisición de imágenes de fluorescencia

Una vez cargadas las células se adhirieron a cubreobjetos recubiertos con concanavalina A (Sigma-Aldrich) (1 mg/mL) y se montaron en una cámara de registro. Los espermatozoides no adheridos se eliminaron mediante lavados suaves y la cámara se llenó con medio de registro (200 μL). Durante los registros, las muestras se mantuvieron a 37°C usando un controlador de temperatura PDMI-2 (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Las señales de fluorescencia se adquirieron de acuerdo con lo descrito por Nishigaki y sus colaboradores (Nishigaki et al. 2006). El sistema de adquisición de imágenes está conformado por un microscopio invertido Olympus iX71 equipado con un objetivo Plan Apo 60X/1.42 de inmersión en aceite, un sistema de excitación por pulsos de luz basado en LED y una cámara EMCCD iXon⁺ DU-888e (1024 x 1024 px) (Andor Technology, Belfast, Northern Ireland). Para coleccionar las imágenes se usó un *binning* 2x2 y el programa Andor iQ. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron cada 500 ms con un tiempo de exposición/iluminación de 2 ms por un periodo de 7 min.

Procesamiento y análisis de imágenes de fluorescencia

Los cambios de fluorescencia se analizaron seleccionando regiones de interés (ROI, del inglés: *Region Of Interest*) en las cabezas de espermatozoides individuales y en el fondo de cada imagen utilizando el programa Fiji (Rueden *et al.*, 2017). Con esta herramienta se obtuvieron los valores crudos de la fluorescencia promedio en cada ROI para cada una de las imágenes adquiridas, los cuales se analizaron utilizando Microsoft Excel. Brevemente: a cada ROI se le resta el valor del fondo obtenido en cada imagen, los valores resultantes se normalizan usando la ecuación $(F-F_0)/F_0$; donde F es la medida de fluorescencia en un momento dado y F_0 el promedio de la fluorescencia basal (30 s previos a la adición de los compuestos). El incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se determinó utilizando la ecuación $[(F-F_0)/F_0]/F_{\text{lono}}$; donde F_{lono} es el valor de la fluorescencia obtenido en respuesta a lono 10 μM (control de la repuesta máxima de Ca^{2+} en la célula). El cambio en el pH_a se estimó usando la ecuación $(F/F_0)-1$.

Farmacología

Las curvas concentración-efecto para el Mib, el NNC y el GPN se construyeron tratando a los espermatozoides con distintas concentraciones de los compuestos en un rango de 1 μM a 200 μM durante 5 min. La participación de los IP_3R se evaluó pretratando a las células con los inhibidores permeables a la membrana, Xc (inhibidor selectivo) o 2-APB (inhibidor no selectivo) (Gambardella et al., 2021) durante 5 min antes de la adición de Mib 30 μM o NNC 10 μM (figura 10A). La contribución de los canales TPC1 se determinó pretratando a los espermatozoides con el inhibidor selectivo permeable a la membrana, $\text{Ned} 19$ o con su estereoisómero reversible $\text{Ned} 19$ (Arndt et al., 2014) durante 5 min (figura 10B). Para explorar la participación de los canales de Ca^{2+} regulados por el vaciamiento de reservorios intracelulares, las células se pretrataron con 2-APB (Zhang et al.,

2020) o SKF (Treviño et al., 2006; Bakowski et al., 2021) durante 5 min en medio de registro con Ca^{2+} 1.7 mM, ambos fármacos son inhibidores no selectivos de estos canales (figura 10C).

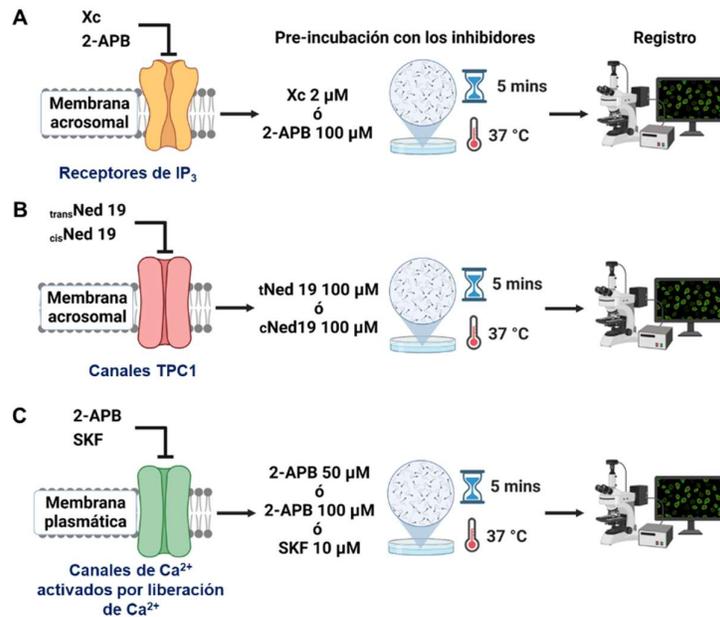


Figura 10. Diseño experimental del tratamiento con los inhibidores de canales de Ca^{2+} acrosomales y de la membrana plasmática.

A y B. Evaluación de la contribución de los canales de Ca^{2+} acrosomales. Los espermatozoides cargados con Fluo-3 se pre-incubaron con antagonistas de los IP_3R y de los canales TPC1 durante 5 minutos a 37 °C antes de la adición de 30 μM Mib o 10 μM NNC. Todos los experimentos se realizaron en un medio de registro con Ca^{2+} 100 nM. **C.** Evaluación de la contribución de los canales de Ca^{2+} regulados por el vaciamiento de pozas intracelulares. Los espermatozoides cargados con Fluo-3 se pre-incubaron con antagonistas de los canales de Ca^{2+} activados por la liberación de Ca^{2+} durante 5 minutos a 37°C antes de la adición de 30 μM Mib o NNC 10 μM NNC. Todos los experimentos se realizaron en un medio de registro con Ca^{2+} 1.7 mM. Creado con BioRender.com

Evaluación de la RA usando la tinción con azul de Coomassie

Para inducir la RA, los espermatozoides se incubaron con los fármacos a evaluar durante 60 min a 37°C. Las células incubadas en el diluyente (medio de registro o medio de registro más DMSO) o con Iono 10 μM se usaron como control negativo o positivo, respectivamente. Al finalizar, los espermatozoides se incubaron con una solución fijadora (formaldehído al 10 % en buffer fosfato salino en una relación 1:1 (v/v)) durante 5 min a temperatura ambiente. Después, se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm, el sobrenadante se descartó cuidadosamente y las células se resuspendieron en buffer fosfato salino 1X (50 μL). Una alícuota de 20 μL se colocó en un portaobjeto y se dejó secar a temperatura ambiente. Las muestras se tiñen con azul de Coomassie G-250 (0.22 %) en etanol (50 %) y ácido acético glacial (10 %) durante 5 min. El exceso de colorante se eliminó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Para terminar, se adicionó glicerol 50 % (v/v) y se examinó la integridad del acrosoma usando microscopía de contraste de

fases con el objetivo 100X de inmersión en aceite (figura 11). El % de RA se calculó analizando al menos 100 células por cada tratamiento.

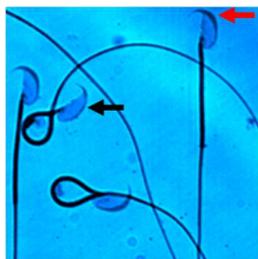


Figura 11. Tinción de espermatozoides con azul de Coomassie.

La tinción con azul de Coomassie es un método eficaz para evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de mamíferos (Larson & Miller 1999). Éste compuesto se une mediante interacciones electrostáticas entre los grupos sulfónicos presentes en la molécula y los grupos cargados positivamente de las proteínas. Así, el espermatozoide con el acrosoma intacto muestra una tinción azul brillante en la región apical de la cabeza (flecha roja). Por otra parte, la célula que se ha sometido a la RA no tiene tinción o muestra una tinción irregular, indicando que el contenido de la vesícula secretora se ha perdido (flecha negra).

Análisis estadístico y presentación de los datos

Para el análisis matemático, el análisis estadístico y la construcción de las gráficas se utilizó el programa GraphPad Prism 8 Software, Inc. (La Jolla, California, USA). Los tratamientos se realizaron por duplicado en al menos 3 ratones distintos (aproximadamente se analizaron 20 células por cada tratamiento). Las gráficas de líneas expresan el trazo representativo de los resultados obtenidos en cada experimento. Las gráficas de barras denotan la amplitud de la respuesta obtenida en cada tratamiento, es decir, la diferencia de la intensidad de fluorescencia obtenida después de la adición de un compuesto y la intensidad de la fluorescencia segundos antes de la adición de éste. Los datos se expresan como el valor promedio de cada tratamiento \pm el error estándar. La mitad de la concentración efectiva máxima (CE_{50}) se calculó usando la ecuación: $Y=100*X/(\text{CE}_{50}+X)$. El valor de la constante de tiempo (τ) se calculó usando la ecuación de asociación de una fase: $Y=Y_0+(\text{meseta}-Y_0)*(1-e^{-K*X})$. Ambos parámetros se determinaron con el software GraphPad Prism 8. Para la predicción y el cálculo de las propiedades de los fármacos se usó Calculator Plugins, Marvin 17.21.0, ChemAxon, (<http://www.chemaxon.com>). Para examinar si los valores se ajustan a una distribución Gaussiana, se empleó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre la Δ de intensidad de fluorescencia y el porcentaje de células sometidas a la RA se analizaron con la prueba ANOVA de una vía. Posteriormente, se aplicaron las pruebas de Dunnett y Tukey para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. En algunos casos los datos se analizaron con la prueba t-Student. El límite de significancia se estableció en: $^{\text{ns}}p \geq 0.05$ $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$. ns. Estadísticamente no significativo.

7. RESULTADOS

Previamente, reportamos que los fármacos inhibidores de CatSper como el Mib y el NNC son bases débiles anfipáticas capaces de incrementar el pH_a en el espermatozoide de mamífero. La alcalinización del pH_a induce la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios ácidos como el acrosoma, el influjo de Ca^{2+} extracelular y la RA, un proceso exocitótico dependiente de Ca^{2+} importante para la fecundación (Chávez et al., 2017). En principio, estos resultados sugieren una relación entre la alcalinización del acrosoma y la liberación del Ca^{2+} almacenado en el organelo. Con el objetivo de determinar si éste era realmente el caso, establecimos la dosis-dependencia de los inhibidores de CatSper para incrementar el pH_a y liberar el Ca^{2+} desde el organelo. Para medir únicamente el eflujo de Ca^{2+} desde el acrosoma, realizamos los experimentos ajustando el Ca^{2+} externo a 100 nM. Al usar un medio de registro con Ca^{2+} 100 nM se está igualando con la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i = 100\text{-}200$ nM), descartando el influjo de Ca^{2+} extracelular que podría producirse por un gradiente electroquímico (Clapham 2007).

7.1. Los inhibidores de CatSper alcalinizan el pH_a de manera dependiente de la concentración

Iniciamos nuestro estudio determinando la dosis-dependencia del Mib y el NNC para incrementar el pH_a usando espermatozoides cargados con LSG. El LSG es una sonda fluorescente que se acumula en los organelos ácidos y muestra un incremento en su fluorescencia tras la acidificación del ambiente donde se encuentra. Como previamente reportamos (Chávez et al., 2018), el tratamiento con los inhibidores de CatSper indujo la alcalinización de la vesícula acrosomal (figura 12A y 12D). Éste incremento de pH_a se observó como una pérdida uniforme de la fluorescencia del LSG, la cual fue dependiente de la concentración (figura 12B y 12E). El Mib estimuló el incremento de pH_a cuando se usó por encima de 10 μM , con un máximo aumento de pH_a a 60 μM y una CE_{50} igual a 11.1 ± 3.3 μM (figura 12C). En cambio, el NNC indujo la alcalinización del acrosoma cuando se usó por encima de 5 μM , con un máximo incremento de pH_a a 30 μM . Además, la curva concentración-efecto del NNC mostró dos componentes: el primero con una $\text{CE}_{50(1)}$ de 2.6 ± 1.0 μM y el segundo con una $\text{CE}_{50(2)}$ de 7.7 ± 1.5 μM (figura 12F). Anteriormente, reportamos que éste compuesto también parecía mostrar dos componentes con respecto a su capacidad para inducir la RA (Chávez et al., 2018).

Nuestros resultados muestran que el Mib y el NNC incrementan el pH_a de manera dependiente de la concentración.

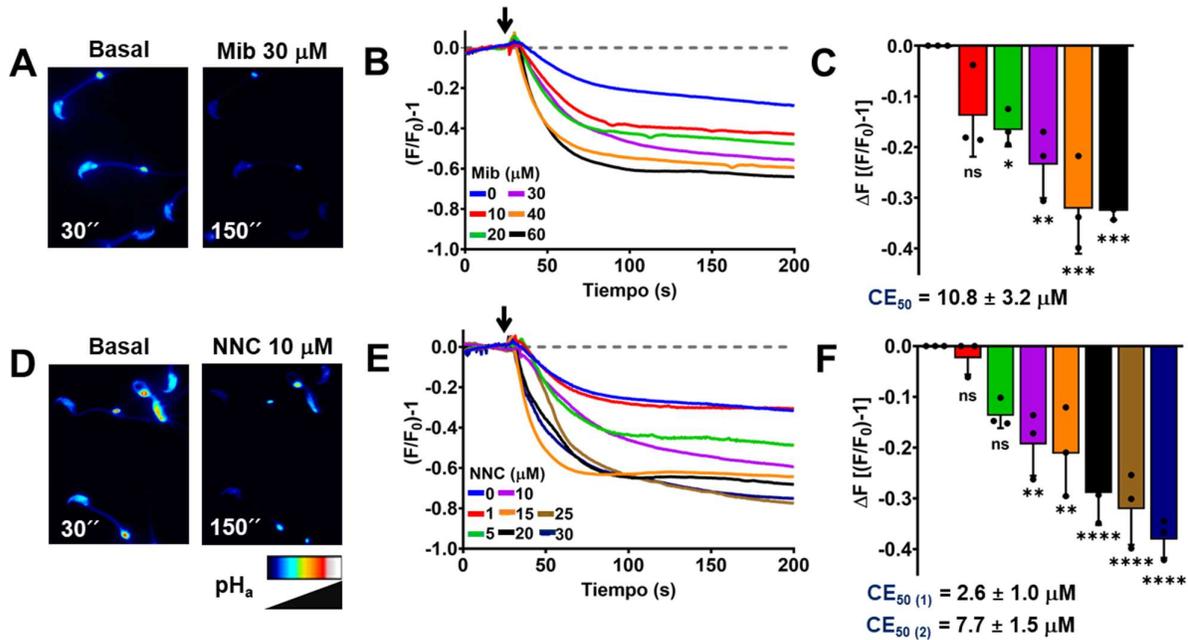


Figura 12. El Mib y el NNC inducen el incremento del pH_a de manera dependiente de la concentración.

Los espermatozoides cargados con LSG fueron tratados con concentraciones crecientes de los inhibidores de CatSper usando medio de registro con Ca^{2+} 100 nM. **A y D.** Muestran imágenes de epifluorescencia representativas en donde se observa que el Mib (30 μ M) y el NNC (30 μ M) indujeron la alcalinización del acrosoma. **B y E.** Trazos representativos que muestran la disminución de la fluorescencia del LSG indicando que tanto el Mib (0-60 μ M) como el NNC (0-30 μ M) produjeron un incremento del pH_a, respectivamente. **C y F.** Muestran las curvas de concentración-efecto para el Mib y el NNC, respectivamente. Notar que la respuesta es dependiente de la concentración. El Δ de fluorescencia (ΔF) se obtuvo a los 150 s en cada uno de los trazos. Para cada tratamiento, el cambio en el ΔF causado por la dilución de LSG al agregar el control (0 μ M) se restó. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Dunnett. ^{ns} $p \geq 0.05$ * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. n=3 ratones independientes. ns, no significativo. En **B y E**, las flechas indican la adición del compuesto en cada uno de los experimentos.

7.2. El Mib y el NNC inducen la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares de manera dependiente de la concentración

A continuación, exploramos la dependencia de la concentración de los inhibidores de CatSper para aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ usando células cargadas con Fluo-3. En la figura 13 se muestra cómo el tratamiento con el Mib (A) y el NNC (D) indujo el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide de ratón. El incremento de Ca^{2+} intracelular se observó como un aumento en la fluorescencia del Fluo-3, el cual fue dependiente de la concentración (figura 13B y 13E). El Mib estimuló el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ cuando se usó por encima de 10 μ M, con un máximo incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ a 30 μ M y una CE_{50} igual a $4.9 \pm 1.8 \mu$ M (figura 13C). En contraste, el NNC indujo el incremento de Ca^{2+} intracelular cuando se usó por encima de 9 μ M, con un máximo incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ a 11 μ M. De manera similar al incremento de pH_a, la curva concentración-efecto del NNC exhibió dos componentes: el primero con un valor de $CE_{50(1)}$ igual a $1.7 \pm 0.5 \mu$ M y el segundo con un valor de $CE_{50(2)}$ igual a $3.8 \pm 1.3 \mu$ M (figura 13F).

Nuestros hallazgos muestran que los inhibidores de CatSper son capaces de estimular la liberación de Ca²⁺ desde los reservorios intracelulares de manera dependiente de la concentración. Con base en nuestros resultados, decidimos usar 30 μM Mib y 10 μM NNC para los experimentos posteriores.

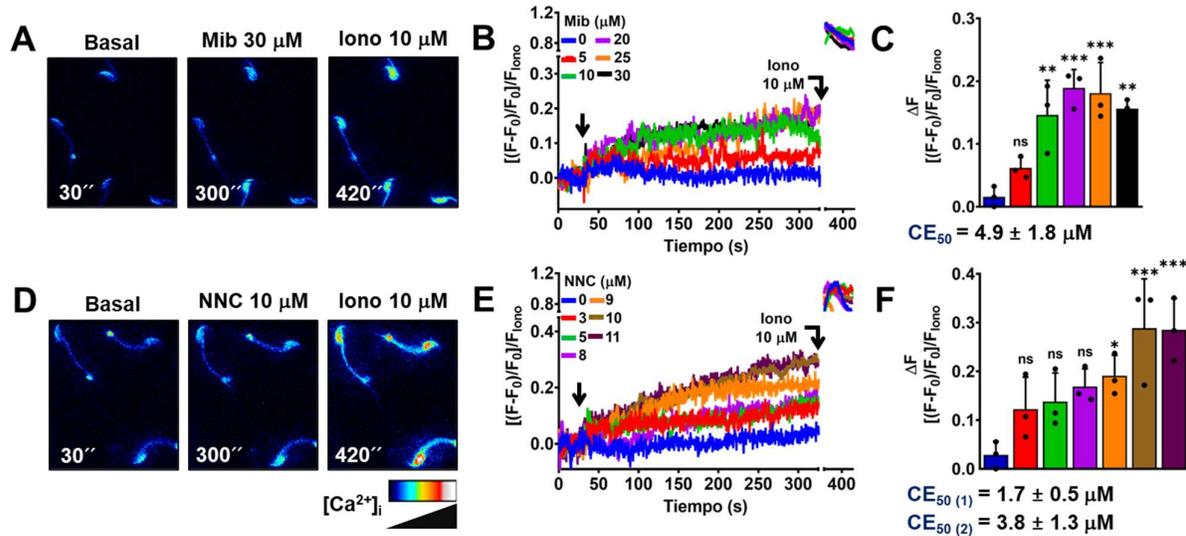


Figura 13. Los inhibidores de CatSper promueven la liberación del Ca²⁺ almacenado en los reservorios intracelulares de manera dependiente de la concentración.

Los espermatozoides cargados con Fluo-3 fueron tratados con concentraciones crecientes de los inhibidores de CatSper usando medio de registro con Ca²⁺ 100 nM. **A y D.** Muestran imágenes de epifluorescencia representativas en donde se observa que el Mib (30 μM) y el NNC (30 μM) indujeron el incremento de la [Ca²⁺]_i. **B y E.** Trazos representativos que muestran el incremento de la fluorescencia del Fluo-3 indicando que tanto el Mib (0-30 μM) como el NNC (0-11 μM) produjeron un incremento del Ca²⁺ intracelular, respectivamente. **C y F.** Muestran las curvas de concentración-efecto para el Mib y el NNC, respectivamente. Notar que la respuesta es dependiente de la concentración. El Δ de fluorescencia (ΔF) se obtuvo a los 300 s en cada uno de los trazos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Dunnett. ^{ns}p≥0.05 *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. n=3 ratones independientes. ns = no significativo. En **B y E**, las flechas indican la adición del compuesto en cada uno de los experimentos.

7.3. Los inhibidores de CatSper liberan el Ca²⁺ acrosomal

Posteriormente, corroboramos la liberación del Ca²⁺ acrosomal estimulada por el Mib y el NNC usando células cargadas con Fluo-5N. Debido a su baja afinidad para el Ca²⁺ (K_d= 90 μM), el Fluo-5N emite fluorescencia principalmente en regiones donde la concentración de este catión es significativamente mayor que en el citoplasma ([Ca²⁺]_i= 100-200 nM). Por lo tanto, al determinar la intensidad de la fluorescencia solo en el área acrosomal ([Ca²⁺]_{acrosomal}= 0.6-1 mM; Herrick et al., 2005), se puede detectar la liberación de Ca²⁺ desde este reservorio. Como se esperaba, el tratamiento con los inhibidores de CatSper indujo la liberación del Ca²⁺ acrosomal, el cual se observó como una pérdida en la fluorescencia del Fluo-5N (figura 14). La figura 14B muestra los trazos representativos donde se observan dos diferentes patrones de la liberación del Ca²⁺ acrosomal; uno

lento (liberación gradual del Ca^{2+} acrosomal; I) y otro rápido (liberación sostenida del Ca^{2+} acrosomal; II). La mayoría de los espermatozoides exhibieron el patrón I (~80 %) en respuesta a los inhibidores de CatSper.

Este resultado demuestra que el Mib y el NNC inducen la liberación del Ca^{2+} acrosomal, lo cual es consistente con una posible correlación con el incremento de pH_a .

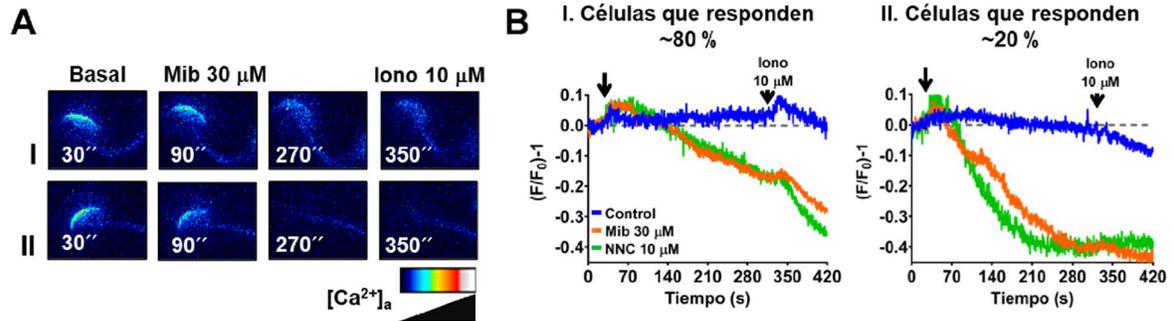


Figura 14. El Mib y el NNC inducen la liberación del Ca^{2+} acrosomal.

Los espermatozoides cargados con Fluo-5N fueron tratados con Mib 30 μM o NNC 10 μM usando un medio de registro con Ca^{2+} 100 nM. **A.** Muestra imágenes de epifluorescencia representativas en donde el Mib (30 μM) induce la liberación del Ca^{2+} acrosomal. **B.** Los trazos representativos de los patrones de la liberación del Ca^{2+} acrosomal desencadenada por los inhibidores de CatSper; uno lento (liberación gradual del Ca^{2+} acrosomal; I) y otro rápido (liberación sostenida del Ca^{2+} acrosoma; II); $n=4$ ratones independientes. En **B**, las flechas indican la adición del compuesto en cada uno de los experimentos.

7.4. El agente lisosomotrópico, GPN alcaliniza el acrosoma del espermatozoide ratón de manera dependiente de la concentración

En los reservorios ácidos de Ca^{2+} , la acumulación de las bases débiles anfipáticas puede inducir cambios osmóticos causando la liberación del Ca^{2+} almacenado a través de la activación de canales mecanosensibles (Barral et al., 2022; Hu et al., 2022). Hasta el momento no hay evidencia de que el Mib o el NNC estimulen estrés osmótico o activen canales mecanosensibles. Para determinar la contribución del componente osmótico en la liberación de Ca^{2+} acrosomal inducida por los inhibidores de CatSper usamos el agente lisosomotrópico, GPN. Éste compuesto es hidrolizado por la proteasa lisosomal cathepsina C, lo que resulta en la alcalinización del organelo, la liberación del Ca^{2+} almacenado o la ruptura del organelo por estrés osmótico (Berg et al., 1994; Morgan et al., 2020). Se ha demostrado mediante estudios de proteómica que las cathepsinas D y H, isoformas de la cathepsina C, están presentes en el acrosoma del espermatozoide de ratón (Moreno & Alvarado 2006).

Primero, determinamos la dosis dependencia del GPN para incrementar el pH_a usando espermatozoide cargados con LSG. Al igual que en el espermatozoide de humano (Sánchez-Tusie et al., 2014), el tratamiento con GPN indujo la alcalinización de la vesícula acrosomal en el espermatozoide de ratón (figura 15A). Similar a los inhibidores de CatSper, el incremento de pH_a fue dependiente de la concentración (figura 15B). El GPN estimuló el incremento de pH_a cuando se

usó por encima de $50 \mu\text{M}$, con un máximo aumento de pH_a a $200 \mu\text{M}$ y una CE_{50} igual a $40.3 \pm 10.9 \mu\text{M}$ (figura 15C).

Nuestros hallazgos muestran que el GPN es capaz de alcalinizar el acrosoma del espermatozoide de ratón como sucede en otros organelos ácidos. Asimismo, el incremento de pH_a inducido por este compuesto es de manera dependiente de la concentración.

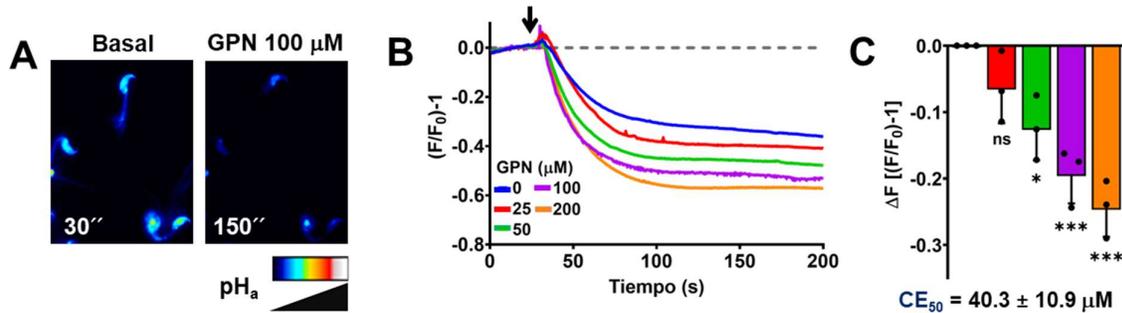


Figura 15. El agente lisosomotrópico, GPN induce la alcalinización del acrosoma de manera dependiente de la concentración.

Los espermatozoides cargados con LSG fueron tratados con concentraciones crecientes de los inhibidores de CatSper usando medio de registro con Ca^{2+} 100 nM . **A.** Muestra una imagen de epifluorescencia representativas en donde se observa que el GPN ($100 \mu\text{M}$) indujo la alcalinización del acrosoma. **B.** Los trazos representativos que muestran la disminución de la fluorescencia del LSG indicando que el GPN ($0\text{-}200 \mu\text{M}$) produce un incremento del pH_a . **C.** Muestra la curva de concentración-efecto para el GPN. Notar que la respuesta es dependiente de la concentración. El Δ de fluorescencia (ΔF) se obtuvo a los 150 s en cada uno de los trazos. Para cada tratamiento, el cambio en el ΔF causado por la dilución de LSG al agregar el control ($0 \mu\text{M}$) se restó. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Dunnett. $^{ns}p \geq 0.05$; $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; $^{****}p < 0.0001$. $n=3$ ratones independientes. ns, no significativo. En **B**, la flecha indica la adición del compuesto en cada uno de los experimentos.

7.5. El GPN induce una escasa liberación del Ca^{2+} acrosomal

Conjuntamente, exploramos la dependencia de la concentración del GPN para liberar el Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares usando células cargadas con Fluo-3. En la figura 16A, se muestra cómo el tratamiento con GPN ($100 \mu\text{M}$) indujo el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espermatozoide de ratón. Semejante al efecto sobre el pH_a , el aumento del Ca^{2+} intracelular fue de manera dependiente de la concentración (figura 16B). El GPN estimuló el incremento del Ca^{2+} intracelular cuando se usó por encima de $25 \mu\text{M}$, con un máximo incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a $100 \mu\text{M}$ y una CE_{50} igual a $15.0 \pm 4.3 \mu\text{M}$ (figura 16C). Los resultados indican que este compuesto promueve la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares de manera dependiente de la concentración. Así mismo, evaluamos si el agente lisosomotrópico es capaz de liberar el Ca^{2+} acrosomal usando espermatozoides cargados con Fluo-5N. Sorpresivamente, el compuesto no fue capaz de inducir cambios en la fluorescencia del colorante (figura 16D y 16E). Teniendo en cuenta la baja sensibilidad de la sonda fluorescente para el Ca^{2+} , este resultado sugiere que la liberación de Ca^{2+} acrosomal originada por el GPN es insignificante y no puede ser detectada por el Fluo-5N.

En resumen, nuestros resultados muestran que el GPN induce el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y de pH_a de manera dependiente de la concentración. Sin embargo, el agente lisosomotrópico induce débilmente la liberación del Ca^{2+} acrosomal.

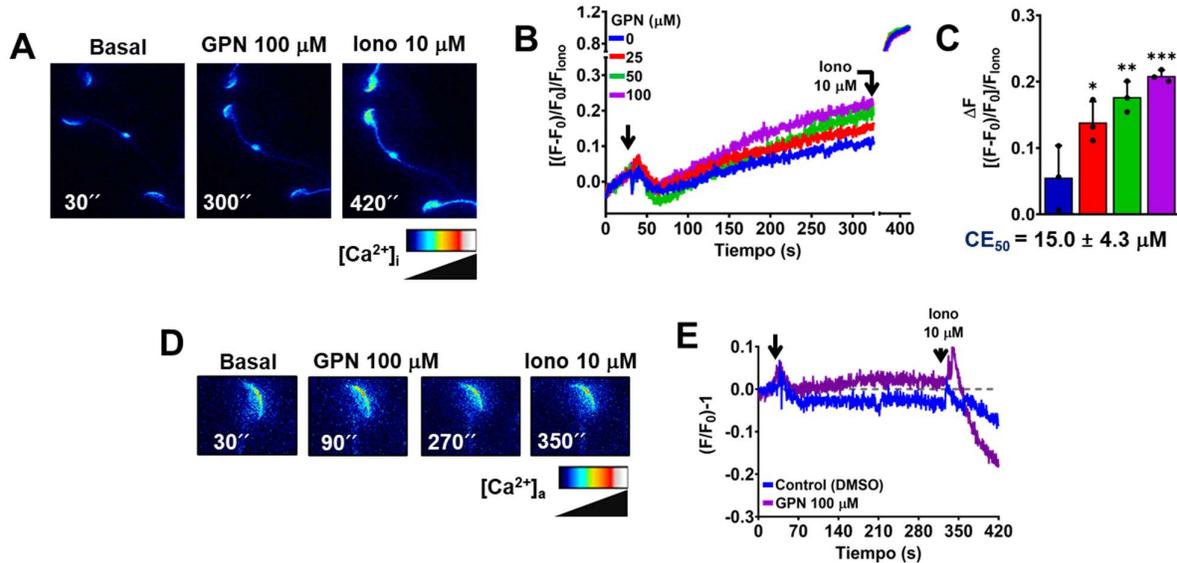


Figura 16. El GPN induce una escasa liberación del Ca^{2+} acrosomal.

Los espermatozoides cargados con Fluo-3 o Fluo-5N fueron tratados con el GPN usando un medio de registro con Ca^{2+} 100 nM. **A.** Muestra imágenes de epifluorescencia representativas en donde se observa que el GPN (100 μ M) indujo el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. **B.** Trazos representativos que muestran el incremento de la fluorescencia del Fluo-3 indicando que el GPN (0-100 μ M) produce un incremento del Ca^{2+} intracelular. **C.** La curva concentración-efecto del GPN. El Δ de fluorescencia (ΔF) se obtuvo a los 300 s en cada uno de los trazos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Dunnett. $^{ns}p \geq 0.05$ $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; $^{****}p < 0.0001$. $n=3$ ratones independientes, ns, no significativo. Los espermatozoides cargados con Fluo-5N fueron tratados con GPN 100 μ M. **D.** Imagen de epifluorescencia representativa de un espermatozoide de ratón tratado con el agente lisosomotrópico. **E.** El trazo representativo de la liberación del Ca^{2+} acrosomal inducido por el GPN; $n=3$ ratones independientes. En **B** y **E**, la flecha indica la adición del compuesto en cada uno de los experimentos.

7.6. Los inhibidores de CatSper y el GPN afectan diferencialmente la RA

El Mib y el NNC pueden inducir la RA incluso en un medio con baja concentración de Ca^{2+} (Chávez et al., 2018). A continuación, evaluamos la capacidad del GPN para estimular la exocitosis del acrosoma usando la tinción con azul de Coomassie, la cual permite evaluar la integridad del organelo. Para estimular la RA, los espermatozoides se incubaron con Mib (30 μ M), NNC (10 μ M) o GPN (100 μ M) durante 60 min a 37°C en medio de registro con Ca^{2+} 100 nM. La cinética de la RA se evaluó tomando muestras cada 10 min durante la incubación. Como se demostró anteriormente (Chávez et al., 2018), los inhibidores de CatSper estimularon la exocitosis del acrosoma. En contraste, el GPN mostró una capacidad baja para desencadenar la RA, ya que se requiere 3 veces más la concentración de este compuesto para producir los efectos del Mib. Al determinar la constante de tiempo (τ) de la cinética de la RA se obtuvo un valor de 17.21 min para el Mib, 12.13

min para el NNC y 17.03 min para el GPN. La inducción máxima de RA se obtuvo a los 30 min de la incubación con los fármacos (figura 17A). El porcentaje de espermatozoides que experimentaron la RA a los 30 min del tratamiento con el Mib, el NNC y el GPN fue de $31.7 \pm 9.0 \%$, $47.7 \pm 7.4 \%$ y $26.3 \pm 9.0 \%$ respectivamente. La Iono ($10 \mu\text{M}$) desencadenó una cantidad muy pequeña de RA ($9.7 \pm 5.5 \%$) (figura 17B).

Nuestros resultados muestran que los bloqueadores de CatSper son más eficientes que el GPN para inducir la RA. Por otra parte, estos hallazgos, junto con los obtenidos usando la sonda Fluo-5N, muestran que los agentes lisosomotrónicos no alteran la integridad de la membrana acrosomal dentro de los primeros 5 min de la incubación, tiempo en el que se llevan a cabo nuestros registros. Finalmente, si un componente osmótico estuviera contribuyendo a la liberación de Ca^{2+} acrosomal, el GPN debería ser más potente que el Mib y el NNC, lo que no fue el caso. Esto sugiere que el aumento de pH_a es el principal desencadenante de la liberación de Ca^{2+} acrosomal.

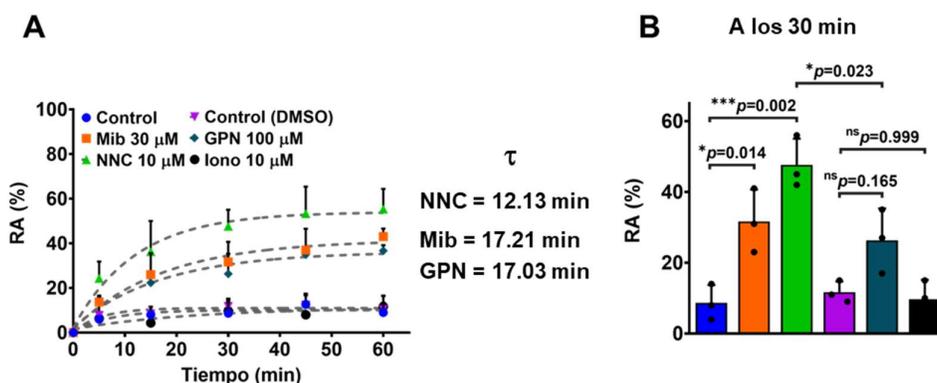


Figura 17. Los agentes lisosomotrónicos afectan diferencialmente la RA.

Los espermatozoides se incubaron con Mib ($30 \mu\text{M}$), NNC ($10 \mu\text{M}$) o GPN ($100 \mu\text{M}$) durante 60 min a 37°C usando un medio de registro con 100 nM Ca^{2+} para estimular la RA. El estatus del acrosoma se evaluó mediante la tinción con azul de Coomassie tomando muestras cada 10 min durante la incubación. **A.** La cinética de la RA y la constante de tiempo (τ). **B.** El porcentaje de la RA a los 30 min; $n=3$ ratones independientes. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey. Los valores p exactos se muestran en la gráfica. ns= no significativo.

7.7. La liberación del Ca^{2+} acrosomal estimulada por los agentes lisosomotrónicos correlaciona con su capacidad para aumentar el pH_a

Habiendo establecido la dosis-dependencia de los agentes lisosomotrónicos para incrementar el pH_a y liberar el Ca^{2+} acrosomal, determinamos la correlación entre estos dos parámetros. Primero estimamos si existe la correlación lineal entre los valores de CE_{50} (pH_a y $[\text{Ca}^{2+}]_i$) con el producto de dos propiedades fisicoquímicas de los compuestos ($\text{pK}_a \cdot \text{LogP}$). Estos parámetros muestran la capacidad del agente para acumularse (LogP) y protonarse (pK_a) dentro de los organelos ácidos. El ajuste dio como resultado una notable correlación entre el $\text{pH}_a \text{ CE}_{50}$ ($R^2 = 0.96$) (figura 18A) y la $[\text{Ca}^{2+}]_i \text{ CE}_{50}$ ($R^2 = 0.96$) (figura 18B) con el producto $\text{pK}_a \cdot \text{LogP}$. Posteriormente,

estimamos si existe la correlación lineal entre el pH_a CE_{50} y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ CE_{50} . El ajuste dio como resultado una clara correlación lineal ($R^2 = 0.99$) entre ambos valores de CE_{50} (figura 18C).

Nuestros resultados muestran que la liberación del Ca^{2+} acrosomal se correlaciona con el aumento del pH_a estimulado por los agentes lisosomotrópicos. Estos hallazgos, junto con nuestro informe anterior (Chávez et al., 2018), demuestran que la capacidad de los agentes lisosomotrópicos para aumentar el pH_a y liberar el Ca^{2+} acrosomal está relacionada con su capacidad para inducir la RA.

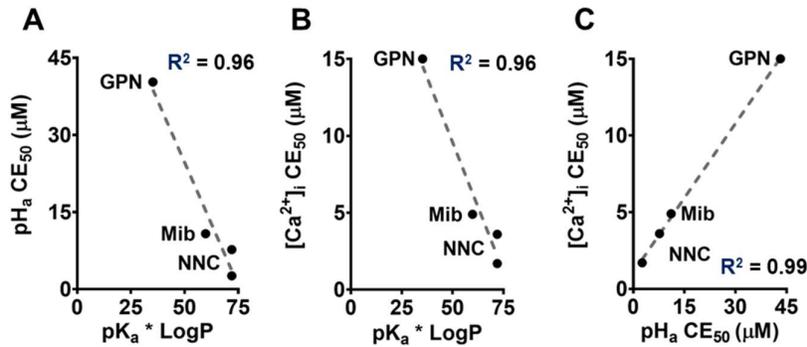


Figura 18. Correlación lineal entre el aumento del pH_a y la liberación del Ca^{2+} acrosomal.

Evaluamos si existe una correlación entre los valores de CE_{50} y las propiedades fisicoquímicas de los agentes lisosomotrópicos (pK_a y LogP). pK_a y LogP indican la capacidad del compuesto para penetrar, acumular y protonarse dentro de los organelos ácidos. **A.** Se muestra la correlación lineal de los valores de pH_a CE_{50} (μM) vs. los productos de pK_a y LogP para cada agente lisosomotrópico. **B.** La relación entre los valores de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ CE_{50} (μM) frente al producto de pK_a y LogP para cada base débil anfipática. **C.** La correlación entre los valores de pH_a CE_{50} frente a los valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ CE_{50} . La R^2 de cada correlación lineal se indica en cada gráfico.

Identificación de los canales de Ca^{2+} implicados en la liberación del Ca^{2+} acrosomal dependiente del pH_a

En las células somáticas, el Mib y el NNC inducen el incremento de Ca^{2+} intracelular a través de los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R) mediante la activación de la fosfolipasa C, la cual produce diacilglicerol e IP_3 , este último un ligando endógeno de estos canales (Souza-Bomfim et al., 2021; Visa et al., 2022). Los IP_3R se localizan en el retículo endo/sarcoplásmico, el mayor reservorio de Ca^{2+} en la célula somática (Gambardella et al., 2021). En el espermatozoide de ratón, los IP_3R se expresan principalmente en el acrosoma y contribuyen a la liberación del Ca^{2+} almacenado en el organelo durante la RA inducida por la zona pelúcida y la tapsigargina (Walensky & Snyder 1995; Treviño et al., 1998; Herrick et al., 2005).

Con el fin de identificar los canales de Ca^{2+} involucrados en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependiente del pH_a , evaluamos si los IP_3R contribuyen en las señales de Ca^{2+} estimuladas por los inhibidores de CatSper. El GPN no se consideró en estos experimentos ya que induce una liberación insignificante de Ca^{2+} acrosomal.

7.8. Los IP_3R no contribuyen en la liberación del Ca^{2+} acrosomal estimulada por los inhibidores de CatSper

Para determinar la contribución de los IP_3R , las células cargadas con Fluo-3 se pre-incubaron (5 min; 37°C) con los antagonistas permeables a la membrana, Xc ($2\ \mu\text{M}$) o 2-APB ($100\ \mu\text{M}$) antes de la adición de los inhibidores de CatSper. El pretratamiento con Xc y su continua presencia en el medio de registro no modificó la liberación de Ca^{2+} acrosomal inducida por el Mib (figura 19A) y el NNC (figura 19B). En contraste, el tratamiento con 2-APB redujo significativamente el incremento del Ca^{2+} intracelular inducido por el Mib ($71.9 \pm 10.3\%$ de inhibición; figura 19C), mientras que la liberación de Ca^{2+} acrosomal estimulada por el NNC no se vio afectada (figura 19D).

Estos resultados sugieren que los IP_3R no participan en la liberación del Ca^{2+} acrosomal inducida por los inhibidores de CatSper.

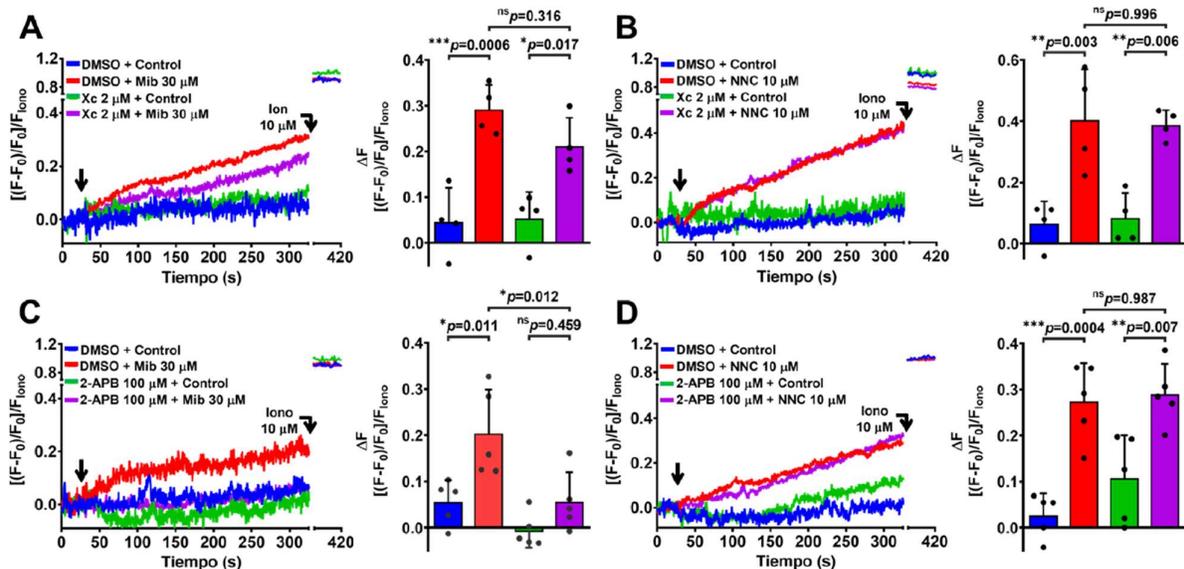


Figura 19. Los inhibidores de los IP_3R afectan diferencialmente la liberación del Ca^{2+} acrosomal estimulada por el Mib y el NNC.

Los espermatozoides cargados con Fluo-3 se pre-incubaron con dos antagonistas de los IP_3R , Xc $2\ \mu\text{M}$ o 2-APB $100\ \mu\text{M}$ durante 5 min a 37°C antes de la adición de Mib $30\ \mu\text{M}$ o NNC $10\ \mu\text{M}$. **A y B.** El tratamiento con Xc no afectó las señales de Ca^{2+} inducidas por los inhibidores de CatSper; $n=4$ ratones independientes. **C.** El 2-APB redujo significativamente el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulada por el Mib; $n=5$ ratones independientes. **D.** Las señales de Ca^{2+} inducidas por el NNC son insensibles al 2-APB; $n=5$ ratones independientes. Los gráficos de barras expresan el Δ de fluorescencia (ΔF) a los 300 s en cada uno de los trazos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey. Los valores p exactos se muestran en los gráficos; ns= no significativo. La flecha indica la adición del compuesto (control o los inhibidores de CatSper) en cada uno de los experimentos.

El 2-APB ($\text{LogP} = 3.7$; $\text{pK}_a = 9.4$) puede acumularse en la vesícula acrosomal ocasionando la alteración del pH_a . Debido a que fue contrastante que el 2-APB inhibiera solo las señales de Ca^{2+} estimuladas por el Mib, exploramos si el 2-APB ($100 \mu\text{M}$) altera el pH_a en espermatozoides cargadas con LSG. Además, evaluamos al $\text{Ned} 19$ ($100 \mu\text{M}$) ($\text{LogP} = 3.9$; $\text{pK}_a = 9.2$), un antagonista de los canales de dos poros 1 (TPC1) usado en experimentos posteriores. Como era de esperarse, los inhibidores de CatSper (usados como control positivo) alcalinizan el acrosoma. Por el contrario, el 2-APB aumentó la fluorescencia de LSG con respecto al control (DMSO), mientras que el $\text{Ned} 19$ no alteró el pH_a (figura 20A). Este resultado muestra que el 2-APB acidifica el acrosoma del espermatozoide de ratón. En un experimento paralelo, evaluamos la capacidad del 2-APB y del $\text{Ned} 19$ para aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células cargadas con Fluo-3. En contraste con los inhibidores de CatSper (usados como control positivo), ambos fármacos no aumentaron significativamente los niveles del Ca^{2+} intracelular en el espermatozoide de ratón (figura 20B).

Como el Mib tiene menor capacidad que el NNC para elevar el pH_a y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, nuestros hallazgos sugieren que el pretratamiento con el 2-APB dificulta la acumulación del Mib en el lumen acrosomal, disminuyendo su capacidad para alcalinizar el organelo. Para evaluar esta hipótesis, los espermatozoides cargados con LSG se pre-incubaron con 2-APB $100 \mu\text{M}$ (5 min; 37°C) antes de la adición de Mib $30 \mu\text{M}$. Como era de esperarse, el tratamiento con el 2-APB disminuyó la capacidad del Mib para aumentar el pH_a (figura 20C). Este resultado muestra que la acidificación acrosomal estimulada por el 2-APB reduce la acumulación del Mib en el lumen del organelo.

En resumen, nuestros hallazgos revelan que los IP_3R no contribuyen significativamente en el mecanismo de liberación del Ca^{2+} acrosomal estimulado por los inhibidores de CatSper.

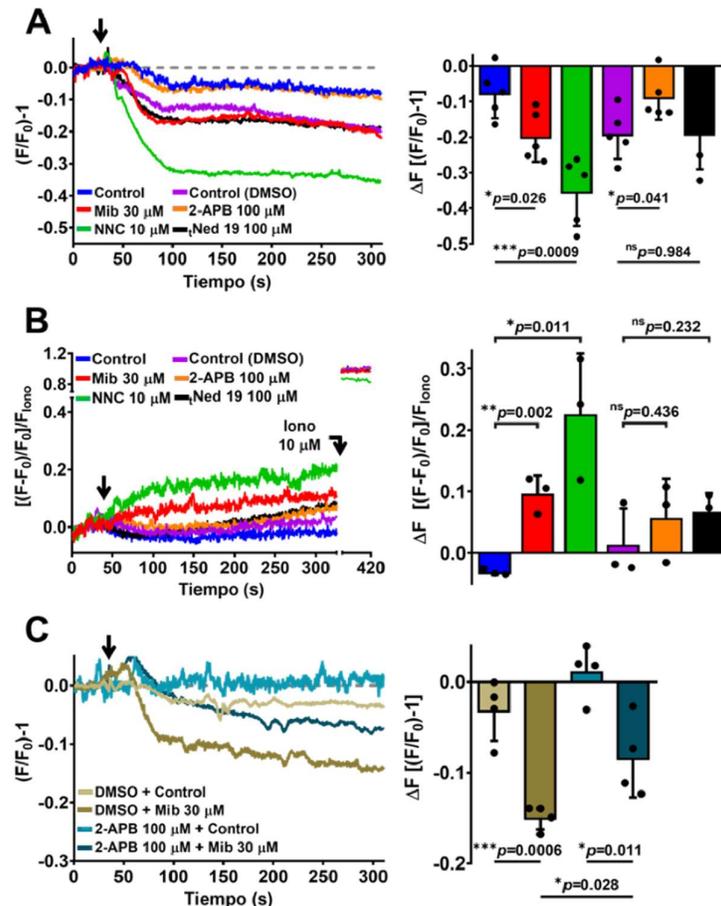


Figura 20. El 2-APB acidifica el acrosoma disminuyendo la capacidad del Mib para aumentar el pH_a.

Los espermatozoides cargados con LSG o Fluo-3, se trataron con 2-APB 100 μM o iNed 19 100 μM en un medio de registro con Ca^{2+} 100 nM. Los inhibidores de CatSper se usaron como control positivo. **A.** El 2-APB acidifica el acrosoma del espermatozoide de ratón; $n=5$ ratones independientes. **B.** El 2-APB y el iNed 19 no alteran los niveles del Ca^{2+} intracelular; $n=3$ ratones independientes. Los espermatozoides cargados con LSG se pre-incubaron con 2-APB 100 μM durante 5 min a 37 °C antes de la adición del Mib 30 μM . **C.** El tratamiento con 2-APB dificulta la acumulación del Mib en el acrosoma del espermatozoide de ratón; $n=3$ ratones independientes. Los gráficos de barras expresan el Δ de fluorescencia (ΔF) a los 300 s en cada uno de los trazos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significación estadística se determinó mediante la prueba t-Student. Los valores p exactos se muestran en los gráficos. ns, no significativo. Las flechas indican la adición del compuesto en cada uno de los trazos.

7.9. Los canales TPC1 participan en la liberación del Ca^{2+} acrosomal estimulada por los inhibidores de CatSper

Los canales TPC1 pertenecen a una familia de canales permeables a Ca^{2+} que se expresan principalmente en las vesículas ácidas. En particular, este canal se expresa en los endosomas de reciclaje y endosomas tempranos cuyo $\text{pH}_{\text{luminal}}$ es 5.7-6.9 (Morgan et al., 2022). El TPC1 es regulado por el Ca^{2+} citosólico, el fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato (unión directa con el canal), el ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP; unión a una proteína accesoria del canal), el voltaje de membrana y el $\text{pH}_{\text{luminal}}$ del organelo (Cang et al., 2014; Morgan et al., 2022).

En el espermatozoide de ratón, se ha reportado que las señales de Ca^{2+} estimuladas por el NAADP, a través de los canales TPC1 localizados en el acrosoma regulan la RA (Arndt et al., 2014). A continuación, determinamos la contribución de estos canales en la liberación del Ca^{2+} acrosomal inducida por los inhibidores de CatSper. Las células cargadas con Fluo-3 se pre-incubaron (5 min; 37 °C) con los antagonistas no competitivos permeables a la membrana, $\mu\text{Ned 19}$ (100 μM) y su estereoisómero $\epsilon\text{Ned 19}$ (100 μM) antes de la adición del Mib y el NNC. El pretratamiento con $\mu\text{Ned 19}$ y su continua presencia en el medio de registro redujo significativamente las señales de Ca^{2+} inducidas por el Mib (75.9 ± 6.7 % de inhibición; figura 21A) y el NNC (38.7 ± 7.6 % de inhibición; figura 21B). Asimismo, el tratamiento con $\epsilon\text{Ned 19}$ disminuyó el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulada por el Mib (66.0 ± 13.1 % de inhibición; figura 21C) y el NNC (53.7 ± 14 % inhibición; figura 21D).

Nuestros resultados muestran que los canales TPC1 contribuyen a la liberación de Ca^{2+} acrosomal inducida por los inhibidores de CatSper.

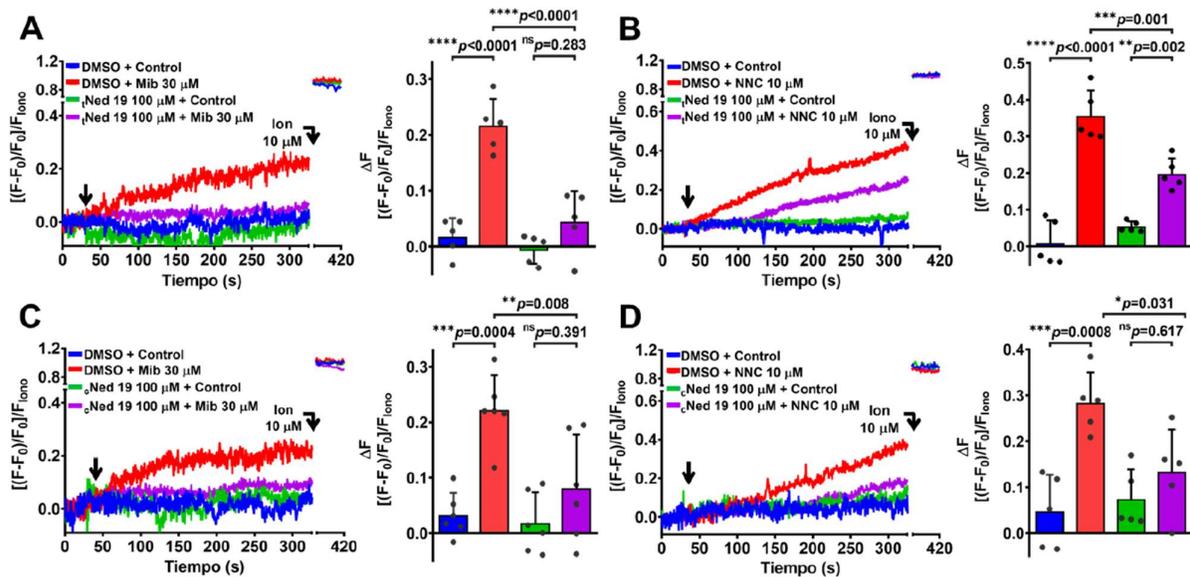


Figura 21. El Ned 19, un antagonista de los canales TPC1 disminuye significativamente la liberación del Ca^{2+} acrosomal estimulada por los inhibidores de CatSper.

Los espermatozoides cargados con Fluo-3 se pre-incubaron con dos antagonistas de los canales TPC1, $\mu\text{Ned 19}$ 100 μM o su estereoisómero $\epsilon\text{Ned 19}$ 100 μM durante 5 minutos a 37°C antes de la adición del 30 μM Mib o 10 μM NNC. **A y B.** El tratamiento con $\mu\text{Ned 19}$ disminuye las señales de Ca^{2+} inducidas por los inhibidores de CatSper; $n=5$ ratones independientes. **C y D.** El $\epsilon\text{Ned 19}$ inhibió parcialmente la elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulada por las bases débiles anfipáticas; para el Mib: $n=5$ ratones independientes y para el NNC: $n=6$ ratones independientes. Los gráficos de barras expresan el Δ de fluorescencia (ΔF) a los 300 s en cada uno de los trazos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey. Los valores p exactos se muestran en los gráficos. ns, no significativo. Las flechas indican la adición del compuesto (control o los inhibidores de CatSper) en cada uno de los trazos.

Identificación de los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática regulados por el Ca^{2+} acrosomal

La entrada de Ca^{2+} operada por el vaciamiento de reservorios intracelulares (SOCE, del inglés store-operated Ca^{2+} entry) es una de las vías principales de ingreso de Ca^{2+} extracelular en las células de los mamíferos. En el espermatozoide de ratón, se ha reportado que la liberación del Ca^{2+} acrosomal desencadena por la zona pelúcida y las bases débiles anfipáticas estimula la SOCE (O'Toole et al., 2000; Chávez et al., 2018). A continuación, determinamos la contribución de la SOCE en el incremento del Ca^{2+} intracelular inducido por los inhibidores de CatSper e iniciamos la identificación de los posibles canales de Ca^{2+} involucrados en dicha respuesta. Para ello, utilizamos antagonistas de los canales de Ca^{2+} regulados por el vaciamiento de pozas de Ca^{2+} expresados en la membrana plasmática del espermatozoide de ratón y un medio de registro con Ca^{2+} 1.7 mM. Asimismo, consideramos que los flujos de Ca^{2+} a través de los canales CatSper no contribuyen al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por el Mib y el NNC, ya que ambos fármacos inhiben al canal.

7.10. La liberación de Ca^{2+} acrosomal mediada por los inhibidores de CatSper desencadena la SOCE

Dado que los canales TPC1 participan en el incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por los inhibidores de CatSper, determinamos su contribución en la entrada de Ca^{2+} extracelular. Para ello, los espermatozoides cargados con Fluo-3 se pre-incubaron (5 min; 37 °C) con $\text{Ned} 19$ o $\text{Ned} 19$ antes de la adición del Mib y el NNC. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el Mib disminuyó en presencia del $\text{Ned} 19$ (70.3 ± 18.8 % de inhibición; figura 22A) y el $\text{Ned} 19$ (78.9 ± 10.1 % inhibición; figura 22C). En contraste, ambos antagonistas no afectaron la respuesta de Ca^{2+} estimulada por el NNC (figura 22B y 22D). En la figura 13, mostramos que el incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por el NNC muestra 2 componentes, por lo tanto, este resultado sugiere que el componente que no proviene de los canales TPC1 es suficiente para inducir aun la SOCE.

Nuestros hallazgos muestran que la liberación del Ca^{2+} acrosomal estimulada por los inhibidores de CatSper desencadena la SOCE en el espermatozoide de ratón.

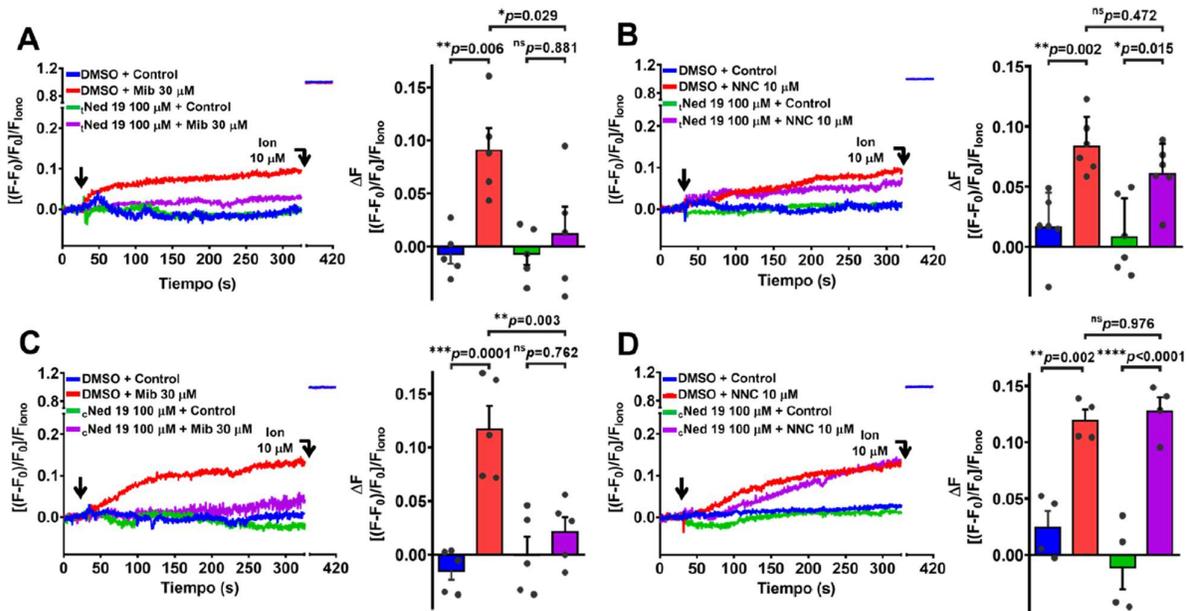


Figura 22. La liberación del Ca^{2+} acrosomal inducida por los inhibidores de CatSper desencadena la SOCE.

Los espermatozoides cargados con Fluo-3 se pre-incubaron con dos antagonistas de los canales TPC1, Δ Ned 19 100 μM o su estereoisómero Δ Ned 19 100 μM durante 5 minutos a 37°C antes de la adición de Mib 30 μM o NNC 10 μM . **A y C.** Los antagonistas de los canales TPC1 reducen significativamente el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulada por el Mib; $n=5$ ratones independientes. **B y D.** Las señales de Ca^{2+} inducidas por el NNC no se vieron afectadas por el Δ Ned 19 y el Δ Ned 19; para el Δ Ned 19: $n=6$ ratones independientes y para el Δ Ned 19: $n=4$ ratones independientes (ver discusión para una explicación de esta aparente inconsistencia). Los gráficos de barras expresan el Δ de fluorescencia (ΔF) a los 300 s en cada uno de los trazos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey. Los valores p exactos se muestran en los gráficos; ns=no significativo. Las flechas indican la adición del compuesto (control o los inhibidores de CatSper) en cada uno de los trazos.

7.11. Los canales CRAC contribuyen a la SOCE desencadenada por los inhibidores de CatSper

En las células eucariotas, los canales de Ca^{2+} activados por la liberación de Ca^{2+} (CRAC) se consideran una ruta importante para el influjo de Ca^{2+} extracelular (Bakowski et al., 2021). Estos canales están compuestos por las proteínas de la familia ORAI (1-3) (proteínas formadoras de poros) y las moléculas de interacción estromal (1/2) (STIM, del inglés stromal interaction molecules; proteínas detectoras de Ca^{2+}) (Bakowski et al., 2021). Previamente, reportamos que las proteínas ORAI (1-3) y STIM (1/2) se expresan en el espermatozoide de ratón y se localizan en la cabeza y el flagelo de estas células (Darszon et al., 2012). En células somáticas, el Mib induce la captación de Ca^{2+} extracelular mediante la activación de los canales ORAI, o el complejo STIM-ORAI (Bomfim et al., 2021; Kádár et al., 2021). Por lo tanto, los canales CRAC podrían contribuir a la SOCE estimulada por la liberación de Ca^{2+} acrosomal inducida por los inhibidores de CatSper.

Aunque el 2-APB tiene varios canales de Ca^{2+} como blanco, los canales CRAC se encuentran entre ellos (Zhang et al., 2020; Bakowski et al., 2021). Para determinar la contribución de estas entidades moleculares, los espermatozoides cargados con Fluo-3 se pre-incubaron (5 min; 37 °C) con 2-APB (50 μM o 100 μM) antes de la adición de inhibidores de CatSper en un medio de registro con Ca^{2+} 1.7 mM. La concentración más baja de 2-APB inhibió el 66.6 ± 16.6 % de la respuesta del Mib (figura 23A) y el 42.8 ± 14.2 % la respuesta del NNC (figura 23B). A mayor concentración de 2-APB se disminuyó aún más la amplitud de las señales de Ca^{2+} desencadenadas por el Mib (77.4 ± 15.2 % de inhibición; figura 23C) y el NNC (55.2 ± 12.7 % de inhibición; figura 18D).

Nuestros resultados sugieren que los canales CRAC contribuyen a la SOCE estimulada por los inhibidores de CatSper.

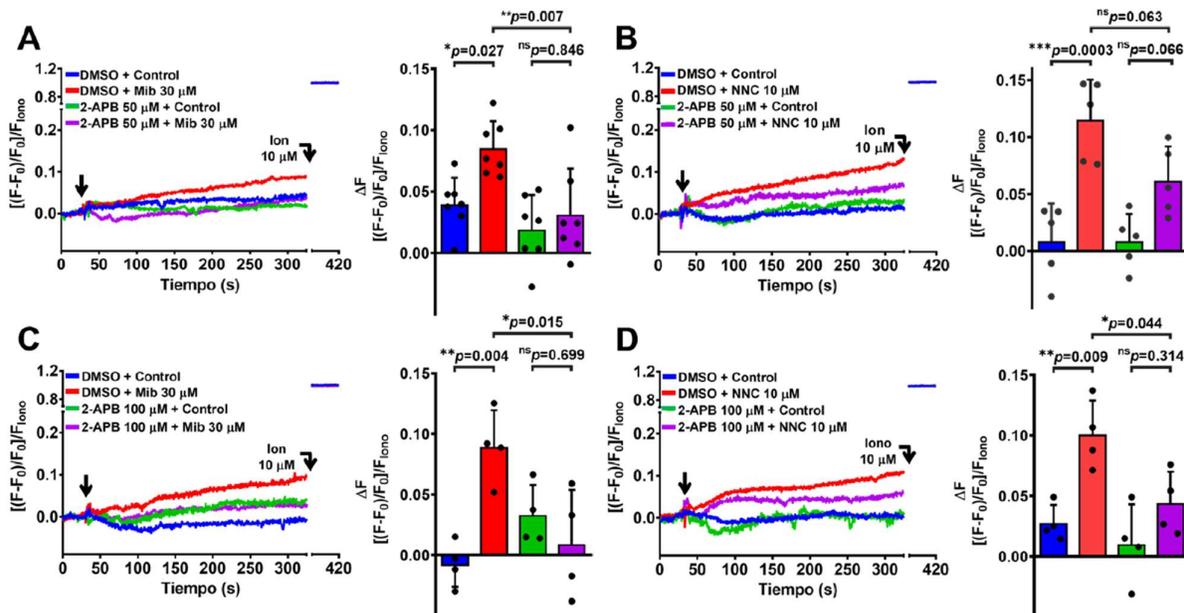


Figura 23. Los tratamientos con 2-APB inhiben parcialmente la entrada de Ca^{2+} extracelular estimulada por los inhibidores de CatSper.

Los espermatozoides cargados con Fluo-3 se pre-incubaron con dos concentraciones de 2-APB, 50 μM o 100 μM durante 5 minutos a 37°C antes de la adición de Mib 30 μM o NNC 10 μM . **A y B.** A 50 μM de 2-APB se redujo parcialmente la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulada por los bloqueadores CatSper; para el Mib: n=6 ratones independientes y para el NNC: n=5 ratones independientes. **C y D.** Las señales de Ca^{2+} inducidas por los bloqueadores de CatSper se inhibieron aún más con 2-APB 100 μM ; n=4 ratones independientes. Los gráficos de barras expresan el Δ de fluorescencia (ΔF) a los 300 s en cada uno de los trazos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey. Los valores p exactos se muestran en los gráficos. ns, no significativo. Las flechas indican la adición del compuesto (control o los inhibidores de CatSper) en cada uno de los trazos.

Para corroborar que los IP_3R no se activan durante la alcalinización del acrosoma, espermatozoides cargados con Fluo-3 se pre-incubaron (5 min; 37 °C) con Xc 2 μ M antes de la adición de los inhibidores de CatSper en un medio de registro con Ca^{2+} 1.7 mM. El pretratamiento con Xc y su continua presencia en el medio de registro no afectó las señales de Ca^{2+} inducidas por el Mib (figura 24A) y el NNC (figura 24B).

Estos hallazgos, junto con las observaciones en la Figura 19, indican que los IP_3R no se activan tras la alcalinización de acrosoma inducida por los inhibidores de CatSper.

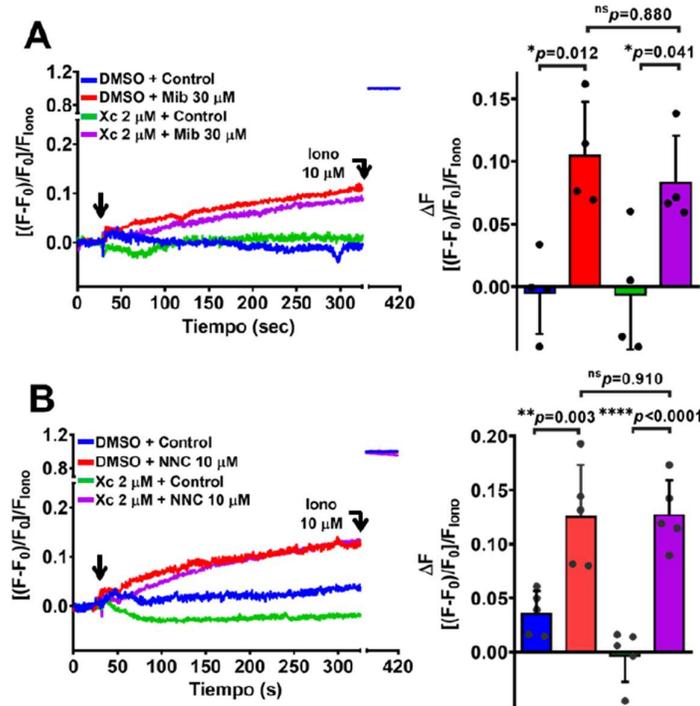


Figura 24. Los IP_3R permanecen inactivos durante la alcalinización acrosomal inducida por los inhibidores de CatSper.

Los espermatozoides cargados con Fluo-3 se pre-incubaron con Xc 2 μ M durante 5 minutos a 37°C antes de la adición de Mib 30 μ M o NNC 10 μ M en un medio de registro con Ca^{2+} 1.7 mM. **A y B.** El tratamiento con Xc no alteró significativamente la respuesta de Mib; n=4 ratones independientes o la respuesta de NNC: n=5 ratones independientes. Los gráficos de barras expresan el Δ de fluorescencia (ΔF) a los 300 s en cada uno de los trazos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey. Los valores p exactos se muestran en los gráficos. ns, no significativo. Las flechas indican la adición del compuesto (control o los inhibidores de CatSper) en cada uno de los trazos.

Previamente, reportamos que el SKF, un bloqueador no selectivo de los canales CRAC (Bakowski et al., 2021), disminuye el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por la Maitotoxina, un potente activador de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales catiónicos no selectivos en células espermatogénicas de ratón y en espermatozoides de ratón capacitados (Treviño et al. 2006). Para corroborar la participación de los canales CRAC, las células cargadas con Fluo-3 se pre-incubaron (5 min; 37 °C) con SKF 10 μM antes de la adición de los inhibidores de CatSper en un medio normal de registro con Ca^{2+} 1.7 mM. Para nuestra sorpresa, la incubación con SKF produjo el aumento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (trazo gris y barra, figura 25A). A pesar de esto, nuestros resultados muestran que las señales de Ca^{2+} inducidas por los inhibidores de CatSper se redujeron en los espermatozoides tratados con SKF; ya que no se observó un efecto aditivo al cuantificar la magnitud de la respuesta del SKF más el incremento generado por las bases débiles anfipáticas (figura 25A y 25B).

En resumen, nuestros resultados muestran que la liberación del Ca^{2+} acrosomal inducida por los inhibidores de CatSper estimula la entrada de Ca^{2+} extracelular en parte a través de los canales CRAC.

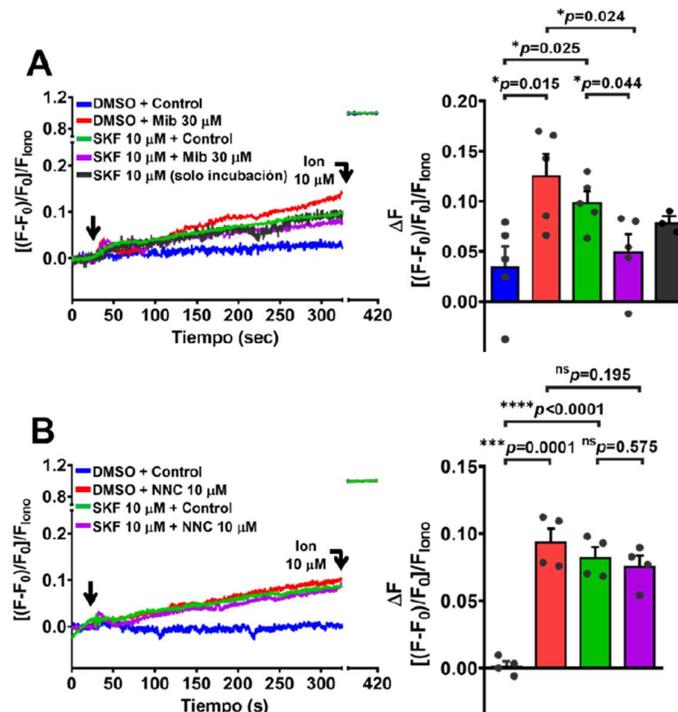


Figura 25. El SKF reduce la entrada de Ca^{2+} extracelular estimulada por los inhibidores de CatSper.

Los espermatozoides cargados con Fluo-3 se pre-incubaron con SKF 10 μM durante 5 minutos a 37 °C antes de adicionar Mib 30 μM o NNC 10 μM . **A.** El tratamiento con SKF reduce significativamente el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el Mib; $n=5$ ratones independientes. El trazo y la barra de color gris muestra el aumento de Ca^{2+} intracelular estimulado durante la incubación con SKF. **B.** Las señales de Ca^{2+} inducidos por NNC se reducen en presencia del SKF, pero no de manera significativa; $n=4$ ratones independientes. Los gráficos de barras expresan el Δ de fluorescencia (ΔF) a los 300 s en cada uno de los trazos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significación estadística se determinó mediante la prueba t-Student. Los valores p exactos se muestran en los gráficos. ns, no significativo. Las flechas indican la adición del compuesto (control o los inhibidores de CatSper) en cada uno de los trazos.

Caracterización de los efectos del SKF en el espermatozoide de ratón

El SKF ($\text{pK}_a = 6.5$; $\text{LogP} = 3.9$) es un derivado del imidazol que inhibe la entrada de Ca^{2+} extracelular bloqueando directamente los canales de Ca^{2+} o afectando las reservas intracelulares de Ca^{2+} en las células no excitables (Bakowski et al., 2021). Al realizar los controles de la incubación con SKF (figura 25, trazo gris y barra), nos sorprendió observar un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Por lo tanto, caracterizamos el efecto de SKF sobre el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y pH_a en el espermatozoide de ratón.

7.12. El SKF aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de manera dependiente de la concentración e induce la alcalinización acrosomal

Primero, exploramos la dependencia de la concentración del SKF para aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células cargadas con Fluo-3. En la figura 26A se muestra cómo el tratamiento con SKF $10 \mu\text{M}$ eleva el Ca^{2+} intracelular en el espermatozoide de ratón. El incremento de Ca^{2+} intracelular se observó como un aumento en la fluorescencia del Fluo-3, el cual fue dependiente de la concentración (figura 26B). El SKF estimuló el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuando se usó por encima de $2 \mu\text{M}$, con un máximo incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a $20 \mu\text{M}$ y una CE_{50} igual a $1.0 \pm 0.7 \mu\text{M}$ (figura 26C). Debido a estas observaciones, evaluamos la capacidad del SKF para elevar el pH_a usando espermatozoides cargados con LSG. Con base en nuestros resultados, decidimos usar SKF $10 \mu\text{M}$ y NNC $10 \mu\text{M}$ como control positivo para aumentar el pH_a . El SKF alcalinizó el acrosoma de los espermatozoides de ratón, aunque con una cinética significativamente más lenta que el NNC (figura 26D). Si el SKF opera con un mecanismo similar al del NNC, la diferencia entre este compuesto y el inhibidor de CatSper para alcalinizar el acrosoma debería reflejarse en su capacidad para aumentar el $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Sin embargo, el SKF aumentó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ más rápido y con una mayor amplitud que el NNC (figura 26E), lo que indica que hay diferentes mecanismos involucrados.

Nuestros hallazgos muestran que el SKF puede aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de manera dependiente de la concentración y alcalinizar el acrosoma del espermatozoide de ratón a través de un mecanismo distinto al de las bases débiles anfipáticas.

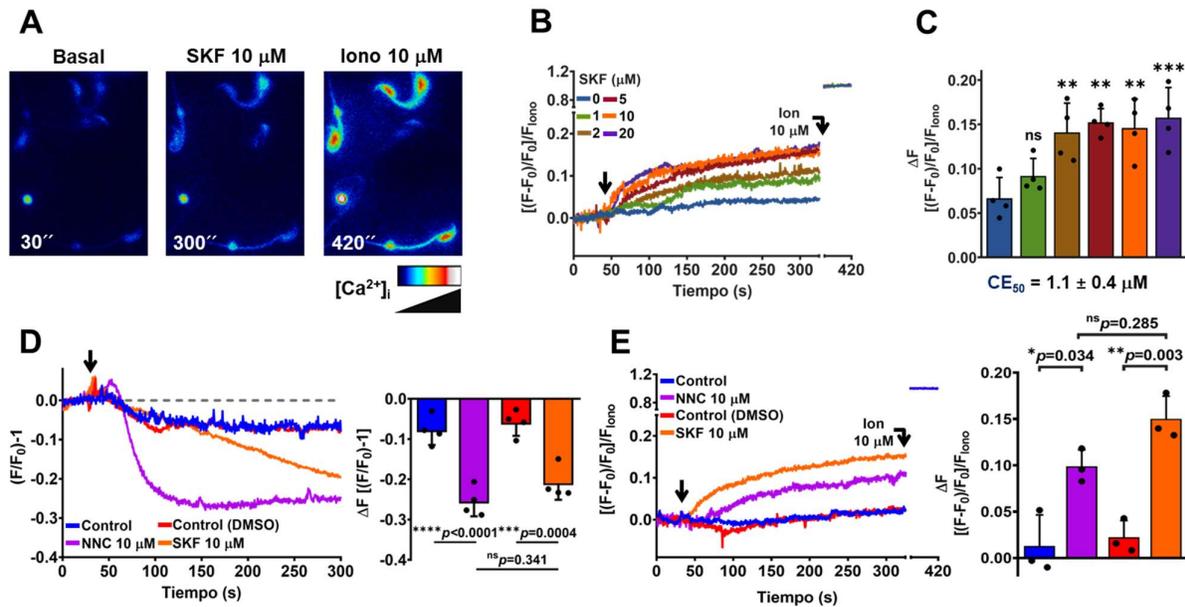


Figura 26. El SKF aumenta los niveles Ca^{2+} intracelular de manera dependiente de la concentración y alcaliniza el pH_a en el espermatozoide de ratón.

Los espermatozoides cargados con Fluo-3 se trataron con el SKF a diferentes concentraciones utilizando un medio de registro con Ca^{2+} 1.7 mM. **A.** Muestra imágenes de epifluorescencia representativas en donde se observa que el SKF (10 μ M) indujo el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. **B.** Trazos representativos que muestran el incremento de la fluorescencia del Fluo-3 indicando que el SKF (0-20 μ M) produce un incremento del Ca^{2+} intracelular. **C.** La curva concentración-efecto del SKF; n=4 ratones independientes. **D.** En células cargadas con LSG, SKF 10 μ M induce la alcalinización del acrosoma; n=4 ratones independientes. **E.** Los espermatozoides cargados con Fluo-3 respondieron más rápido a SKF 10 μ M y con una mayor amplitud de la señal de Ca^{2+} en comparación con el NNC; n=3 ratones independientes. Los gráficos de barras expresan el Δ de fluorescencia (ΔF) a los 300 s en cada uno de los trazos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significación estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Dunnett o Tukey. Para panel **C** (prueba post-hoc de Dunnett): $^{ns}p \geq 0.05$ $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; $^{****}p < 0.0001$. Para los paneles **D** y **E** (prueba post-hoc de Tukey): los valores de p exactos se muestran en los gráficos. ns, no significativo. Las flechas indican la adición del compuesto (control o los inhibidores de CatSper) en cada uno de los trazos.

7.13. El derivado de imidazol, SKF incrementa el $[Ca^{2+}]_i$ intracelular sin alterar el pH_a en un medio con Ca^{2+} 100 nM

Para determinar la fuente de las señales de Ca^{2+} inducidas por el SKF, evaluamos el efecto de este compuesto en un medio de registro con Ca^{2+} 100 nM. Primero, evaluamos la capacidad de aumentar el pH_a en espermatozoides cargados con LSG en esta condición. El NNC se utilizó como control positivo. Como se esperaba, el NNC induce la alcalinización del acrosoma. Sin embargo, el pH_a se vio solo ligeramente afectado por el SKF (figura 27A). Este resultado sugiere que el mecanismo del aumento del pH_a estimulado por este compuesto implica la entrada de Ca^{2+} extracelular. Finalmente, evaluamos la capacidad del SKF para movilizar el Ca^{2+} de las reservas intracelulares en células cargadas con Fluo-3. Una vez más, el bloqueador CatSper, NNC se utilizó como control positivo. El NNC induce el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ como ya se ha demostrado.

Sorprendentemente, la señal de Ca^{2+} inducida por SKF fue significativamente mayor que la del NNC y mostró dos componentes, un aumento rápido durante los primeros segundos seguido de uno más lento (figura 27B).

En resumen, nuestros hallazgos sugieren que el Ca^{2+} de los reservorios intracelulares tiene una contribución más importante que el Ca^{2+} que provienen del medio extracelular en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulado por el SKF en el espermatozoide de ratón.

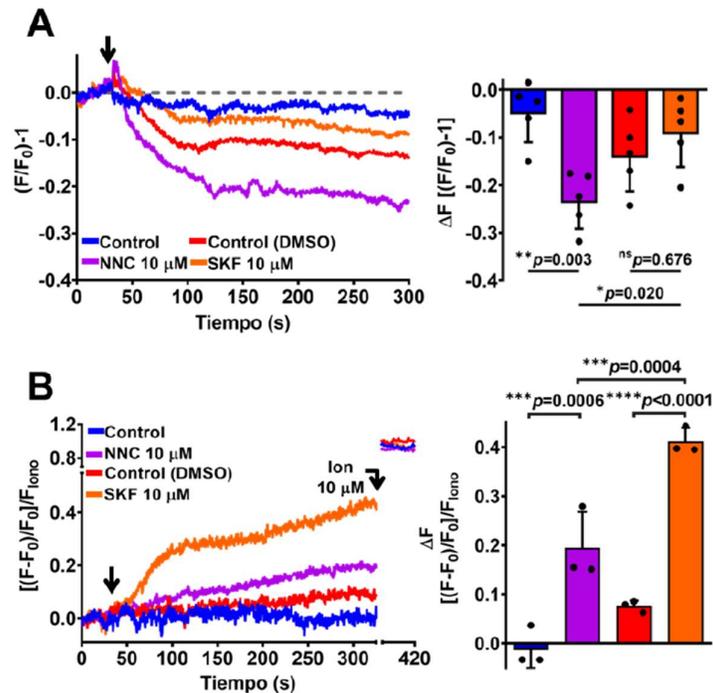


Figura 27. En un medio con bajo contenido de Ca^{2+} (100 nM), el SKF incrementa el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sin alterar el pH_a .

A. En experimentos realizados en un medio con Ca^{2+} 100 nM, SKF 10 μM incremento débilmente el pH_a de las células cargadas con LSG, mientras que NNC 10 μM mostró el típico cambio considerable de pH_a ; n=5 ratones independientes.

B. Los espermatozoides cargados con Fluo-3 tratados con SKF 10 μM mostraron un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ más rápido y significativamente mayor que el NNC; n=3 ratones independientes. Los gráficos de barras expresan el Δ de fluorescencia (ΔF) a los 300 s en cada uno de los trazos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey. Los valores p exactos se muestran en los gráficos; ns= no significativo. Las flechas indican la adición del compuesto (control o los inhibidores de CatSper) en cada uno de los trazos.

8. DISCUSIÓN

El Ca^{2+} intracelular es un segundo mensajero universal que regula diversas respuestas biológicas desde la fecundación hasta la muerte celular (Clapham 2007; Luan & wang 2021). Para una exitosa fecundación, los espermatozoides deben de llevar a cabo la RA, un proceso excitotico dependiente de Ca^{2+} (Yanagimachi 2022). En los mamíferos, un requisito previo para la RA es la alcalinización del pH_a durante la capacitación (Nakanishi et al., 2001; Carrasquel-Martínez et al., 2022). El incremento fisiológico o artificial del pH_a induce la liberación del Ca^{2+} acrosomal y estimula la entrada de Ca^{2+} extracelular desencadenando la RA (O'Toole et al., 2000; Nakanishi et al., 2001; Chávez et al., 2018). No obstante, desconocemos cómo un aumento del pH_a origina las señales de Ca^{2+} que promueven la RA. En este estudio, nuestro objetivo fue establecer la relación entre la alcalinización del acrosoma y la liberación del Ca^{2+} almacenado, e identificar los canales de Ca^{2+} involucrados utilizando bases débiles anfipáticas y espermatozoides de ratón no capacitados como modelo.

8.1. El pH_a regula la liberación del Ca^{2+} acrosomal

Para establecer la correlación entre el aumento del pH_a y la liberación de Ca^{2+} almacenado en el acrosoma, primero determinamos la dependencia de la concentración de los inhibidores de CatSper para alcalinizar este organelo utilizando la sonda fluorescente acidotrópica LysoSensor Green (LSG). Nuestros resultados muestran que el Mib y el NNC aumentan el pH_a de manera dosis-dependiente. Además, la curva dosis-respuesta del NNC mostró dos componentes para elevar el pH_a (Figura 7). Esta observación es consistente con los resultados previos de la RA inducida por este compuesto en espermatozoides de ratón (Chávez et al., 2018). En el espermatozoide de humano, los inhibidores de CatSper incrementan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de manera dosis-dependiente (Strünker et al., 2011). A continuación, determinamos la dependencia de la concentración de estos compuestos para liberar el Ca^{2+} de los reservorios intracelulares utilizando la sonda fluorescente sensible a Ca^{2+} , Fluo-3. Nuestros hallazgos muestran que los inhibidores de CatSper aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de manera dosis-dependiente en el rango de concentraciones reportado previamente en las células de humano. Como se observó en los experimentos de pH_a , las señales de Ca^{2+} inducidas por el NNC también mostraron dos componentes. Estos resultados demuestran que los inhibidores de CatSper inducen la alcalinización del acrosoma, el aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la RA de manera dosis-dependiente, lo que sugiere una relación entre estos parámetros.

En el espermatozoide de ratón, la vesícula acrosomal es el principal almacén de Ca^{2+} intracelular y su liberación puede desencadenar significativamente la RA (Walensky & Snyder 1995; Treviño et al., 1998; O'Toole et al., 2000; Herrick et al., 2005). Por lo tanto, corroboramos la liberación del Ca^{2+} acrosomal inducida por los inhibidores de CatSper usando la sonda fluorescente Fluo-5N, un reportero de baja afinidad por el Ca^{2+} . Nuestros resultados muestran que el Mib y el NNC inducen la liberación del Ca^{2+} acrosomal mostrando dos cinéticas, una lenta (80 % de las

células que responden) y otra rápida (20 % de las células que responden). Estos experimentos también indicaron que la integridad de la membrana acrosomal no se ve afectada por estos compuestos dentro de los primeros 5 min del registro.

Las bases débiles anfipáticas pueden inducir cambios osmóticos que podrían estimular la liberación del Ca^{2+} almacenado en los reservorios ácidos de Ca^{2+} (Barral et al., 2022; Hu et al., 2022). Sin embargo, hasta el momento no hay evidencia de que los inhibidores de CatSper puedan inducir estrés osmótico en el acrosoma del espermatozoide de ratón o activar canales mecanosensibles acrosomales. Para determinar la contribución del componente osmótico en la liberación del Ca^{2+} acrosomal, caracterizamos los efectos del GPN sobre el acrosoma del espermatozoide de ratón. El GPN, es un agente lisosomotrópico que difunde libremente en los organelos ácidos donde las proteasas lisosomales lo hidrolizan, lo que da como resultado un aumento drástico de la osmolaridad luminal (Berg et al., 1994; Hu et al., 2022). En el espermatozoide de humano, este compuesto induce la alcalinización acrosomal a 100 μM (Sánchez-Tusie et al., 2014). Nuestros resultados muestran que el GPN induce el aumento del pH_a y de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de manera dosis-dependiente, como se ha reportado en otros tipos de células (Morgan et al., 2019). Sin embargo, este compuesto mostró una baja capacidad para inducir la liberación del Ca^{2+} acrosomal y desencadenar la RA, probablemente este resultado se debe a sus propiedades fisicoquímicas. No obstante, los tres agentes lisosomotrópicos (Mib, NNC y GPN) aumentan el pH_a y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de manera dosis-dependiente, lo que sugiere que estas variables están correlacionadas.

Anteriormente, demostramos que la RA inducida por una base débil anfipática depende de su capacidad para permear la membrana (determinada por LogP) y su capacidad de aumentar el pH_a (determinado por pKa) (Chávez et al., 2018). A continuación, establecimos la correlación entre la capacidad de estos compuestos para aumentar el pH_a y liberar el Ca^{2+} acrosomal con sus propiedades fisicoquímicas. Nuestro análisis mostró que estas variables están linealmente correlacionadas. A pesar de que el GPN tiene un componente osmótico adicional, se ajustó a la correlación lineal entre el pH_a CE_{50} y el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ CE_{50} de los inhibidores de CatSper. Por lo tanto, proponemos que el efecto osmótico no contribuye significativamente a la regulación de los flujos de Ca^{2+} en el acrosoma del espermatozoide de ratón, demostrando que el pH_a puede regular la salida los canales de Ca^{2+} expresados en este organelo ácido.

8.2. La liberación del Ca^{2+} acrosomal dependiente del pH_a es a través de los canales TPC1

Los IP_3R están altamente expresados en el acrosoma de los espermatozoides de ratón y se ha sugerido que regulan la liberación del Ca^{2+} acrosomal durante la RA (Walensky & Snyder 1995; Treviño et al., 1998; O'Toole et al., 2000; Herrick et al., 2005). Además, hallazgos recientes muestran que tanto el Mib como el NNC liberan el Ca^{2+} de los reservorios intracelulares a través de los IP_3R en diferentes tipos de células (Souza-Bomfim et al., 2021; Visa et al., 2022). Primero determinamos la contribución de estos canales de Ca^{2+} utilizando dos antagonistas, la Xc y el 2-

APB. El tratamiento con la Xc no afectó la liberación del Ca^{2+} acrosomal estimulada por el Mib y el NNC. Este resultado es consistente con observaciones previas en el espermatozoide de humano, donde las señales de Ca^{2+} inducidas por el NNC no están asociadas con la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3R (Morris 2014). Sin embargo, la pre-incubación con el 2-APB inhibió significativamente solo el eflujo de Ca^{2+} acrosomal estimulado por Mib. Esta aparente contradicción se deriva del hecho de que el 2-APB es capaz de acidificar el acrosoma de los espermatozoides de ratón sin alterar los niveles del $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este último resultado es consistente con previos reportes en el espermatozoide de humano (Lefièvre et al., 2012). Como el NNC es significativamente más potente para elevar el pH_a que Mib, la acidificación de la vesícula acrosomal causada por el 2-APB no afecta su capacidad para elevar el pH_a , pero si disminuye la de Mib, lo que reduce su capacidad para liberar Ca^{2+} acrosomal. Por lo tanto, nuestras observaciones con los antagonistas de los IP_3R son consistentes con la escasa participación de estos canales de Ca^{2+} en el eflujo del Ca^{2+} acrosomal regulado por aumento de pH_a .

La familia de los canales TPC abarca tres miembros, pero solo dos (proteína 1 y 2) están presentes en primates y roedores, donde están confinados a la membrana de los organelos ácidos (Freeman et al., 2023). TPC1 es un canal catiónico no selectivo regulado por el $\text{pH}_{\text{luminal}}$ (Rybalchenko et al., 2012; Cang et al., 2014). Estas proteínas y su activador, el segundo mensajero NAADP (ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato), están involucrados en la movilización de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares y la RA en los espermatozoides de humanos y de ratón (Sánchez-Tusie et al., 2014; Arndt et al., 2014). Por lo tanto, evaluamos la contribución de TPC1 usando su antagonista, el $\text{Ned} 19$ y su estereoisómero $\text{Ned} 19$. En nuestras condiciones, $\text{Ned} 19$ no alteró el pH_a ni la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El tratamiento con los bloqueadores de los canales TPC disminuyó significativamente las señales de Ca^{2+} inducidas por el Mib y el NNC, aunque esta última con menos fuerza. Este resultado es nuevamente consistente con la posibilidad de que las señales de Ca^{2+} estimuladas por el NNC involucran un segundo componente que se estudiará en el futuro. Así, nuestras observaciones muestran que los canales TPC1 contribuyen a la liberación de Ca^{2+} acrosomal inducida por la elevación del pH_a .

Nuestros hallazgos en general sugieren que, además de los canales TPC1, existe al menos otra entidad molecular que responde al aumento de pH_a . La familia de los Receptores de Potencial Transitorio Mucolipinas comprende tres canales catiónicos no selectivos, todos expresados en los organelos ácidos (TRPML 1-3) (Freeman et al., 2023). Se ha reportado que los canales TRPML3 se activan a valores de pH más alcalinos, lo que resulta en una elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Krogsaeter et al., 2022). Anteriormente, propusimos que los canales TRP participan en la fisiología del espermatozoide (revisado en Darszon et al., 2012). En este contexto, son necesarios más estudios para evaluar la contribución de estos canales en la movilidad del Ca^{2+} acrosomal.

8.3. La liberación del Ca^{2+} acrosomal dependiente del pH_a estimula la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales CRAC

En las células eucariotas, la vía SOCE es un mecanismo común para la entrada de Ca^{2+} desencadenada por el vaciamiento de los reservorios de Ca^{2+} intracelulares. Los canales CRAC se consideran la ruta principal para la entrada de Ca^{2+} en este tipo de respuesta.

Primero, corroboramos que la liberación del Ca^{2+} acrosomal a través de los canales TPC1 desencadena la SOCE. Los fármacos antagonistas de los canales TPC redujeron significativamente las señales de Ca^{2+} inducidas por el Mib. Sin embargo, el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el NNC no se afectó por los tratamientos. La liberación de Ca^{2+} acrosomal inducida por el NNC tiene al menos dos componentes, los canales TPC1 y otro componente. Este último, es capaz de activar la SOCE posiblemente a través de un mecanismo distinto en las células. No obstante, nuestros hallazgos muestran que la liberación del Ca^{2+} acrosomal dependiente del pH_a estimula la SOCE en el espermatozoide de ratón.

Para corroborar la contribución de los canales CRAC en la SOCE estimulada por la liberación del Ca^{2+} acrosomal dependiente de pH_a , evaluamos dos antagonistas de los canales CRAC, el 2-APB y el SKF. Vale la pena señalar que el 2-APB tiene muchos blancos en la membrana plasmática, incluido el complejo STIM-ORAI, el propio canal ORAI y la familia de canales de TRP (Tian et al., 2016; Zhang et al., 2020; Shower et al., 2021). Si bien el 2-APB disminuyó las señales de Ca^{2+} inducidas por los inhibidores de CatSper, este compuesto inhibió la respuesta del Mib de manera más eficiente que la del NNC (Figura 18). Como mencionamos, el segundo componente de la liberación de Ca^{2+} acrosomal inducido por el NNC puede desencadenar la SOCE por una vía no sensible a 2-APB. En el espermatozoide de humano, el 2-APB induce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en un medio con una concentración normal de Ca^{2+} (Lefièvre et al., 2012). Aquí, mostramos que este inhibidor no eleva la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por sí mismo en el espermatozoide de ratón. En experimentos paralelos, también corroboramos que los IP_3R no se activan durante la alcalinización del acrosoma. Nuestros resultados demuestran que estos canales de Ca^{2+} no participan en la liberación del Ca^{2+} acrosomal dependiente del pH_a . Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren la participación de los canales CRAC en la entrada de Ca^{2+} desencadenada por la liberación de Ca^{2+} acrosomal.

El SKF es un bloqueador no selectivo de los canales CRAC (Bakowski et al., 2021). A pesar de esto, en el espermatozoide de humano, este compuesto aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y libera el Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Morris 2014). Aquí, mostramos que el SKF aumentó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ independientemente del hecho de que bloquea a los canales. Debido a que no observamos un efecto aditivo de las señales de Ca^{2+} inducidas por los inhibidores de CatSper en presencia del SKF, nuestros resultados son consistentes con el efecto antagonista del SKF sobre los canales CRAC, como previamente reportamos (Treviño et al. 2006). Por lo tanto, la liberación del Ca^{2+} acrosomal dependiente del pH_a induce la entrada de Ca^{2+} extracelular por la vía SOCE en parte a través de los canales CRAC.

8.4. El SKF altera el pH_a y la $[Ca^{2+}]_i$ por un mecanismo desconocido en el espermatozoide de ratón

Habiendo encontrado que el SKF aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide suspendido en un medio con concentraciones normales de Ca^{2+} , determinamos la dependencia de la dosis para alterar los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ y su capacidad para incrementar el pH_a . En ambas condiciones de Ca^{2+} extracelular (1.7 mM y 100 nM), las señales de Ca^{2+} inducidas por SKF fueron significativamente mayores que las desencadenadas por NNC. Este compuesto aumentó el pH_a en un medio de registro con 1.7 mM de Ca^{2+} , pero no significativamente a una baja concentración externa de Ca^{2+} . Por lo anterior, se necesitan más estudios para saber cómo el SKF eleva la $[Ca^{2+}]_i$ y pH_a en el espermatozoide de mamífero.

8.5. Modelo de trabajo propuesto

En resumen, nuestros hallazgos subrayan la importancia de la regulación del pH_a para la salida del Ca^{2+} acrosomal y la entrada del Ca^{2+} extracelular durante la RA en el espermatozoide de ratón (figura 28).

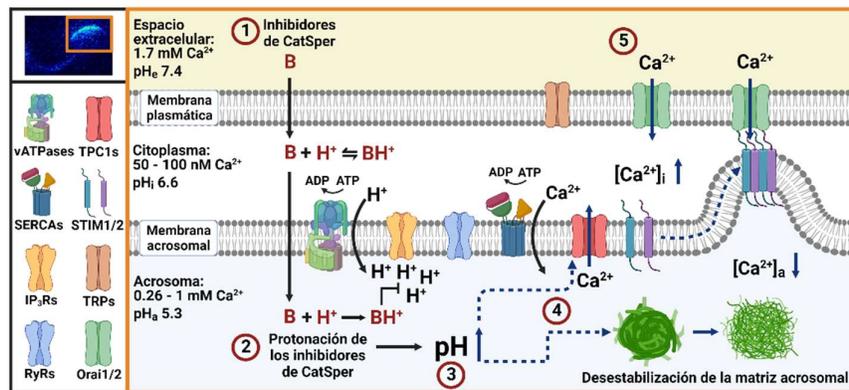


Figura 28. Modelo de trabajo propuesto de las vías de señalización de Ca^{2+} durante la alcalinización acrosomal en el espermatozoide de ratón.

Las bases débiles anfipáticas como los inhibidores de CatSper (**B**) difunden a través de la membrana plasmática del espermatozoide desde una región de alta concentración a una de baja concentración (1). Estos compuestos se acumulan y protonan (**BH⁺**) en el lumen del acrosoma (2), causando la alcalinización del pH_a (3). El incremento del pH_a desestabiliza la matriz acrosomal y desencadena la liberación del Ca^{2+} acrosomal a través de los canales TPC1 (4). A su vez, el vaciamiento del acrosoma estimula la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales de Ca^{2+} activados por la liberación de Ca^{2+} (5). En condiciones fisiológicas, este mecanismo puede contribuir a los aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ necesarios para la RA.

Abreviatura: pH extracelular (pH_e), pH intracelular (pH_i), pH acrosomal (pH_a), concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), concentración de Ca^{2+} acrosomal ($[Ca^{2+}]_a$), H^+ -ATPasas de tipo vacuolar (v-ATPasas), Ca^{2+} -ATPasas Sarco/Reticulo endoplásmico (SERCA), Receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R), Receptores de rianodina (RyR), Canales de dos poros 1 (TPC1), Proteínas de Moléculas de Interacción Estromal (STIM1/2), Canales de Potencial Receptor Transitorio (TRP), Proteínas de la familia Orai (Orai1/2).

9. CONCLUSIONES

Nuestro trabajo muestra que el aumento del pH_a originado por las bases débiles anfipáticas, como los inhibidores de CatSper usados aquí, induce la liberación del Ca^{2+} acrosomal sin comprometer la integridad de la membrana acrosomal dentro de los primeros 5 min de incubación. Usando el conocido agente lisosomotrópico GPN, encontramos que el componente osmótico que presenta, además del aumento de pH_a que provoca, no contribuye significativamente a la liberación del Ca^{2+} acrosomal. Además, determinamos que existe una relación entre el aumento de pH_a y la liberación de Ca^{2+} almacenado. Con estos resultados demostramos que el pH_a regula los flujos de Ca^{2+} en este organelo.

Nuestras exploraciones con los fármacos antagonistas muestran que los canales TPC1 se activan durante la alcalinización del acrosoma. También, encontramos que la liberación del Ca^{2+} acrosomal asociada con el aumento del pH_a estimula la vía SOCE en parte a través de los canales CRAC. Para nuestra sorpresa, aunque el SKF bloquea los canales CRAC, este compuesto es capaz de incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el pH_a en un medio con una concentración normal de Ca^{2+} (1.7 mM). Además, documentamos que este compuesto libera el Ca^{2+} de los reservorios intracelulares con mayor potencia que el NNC sin alterar el pH_a en un medio con bajo Ca^{2+} . Desentrañar el mecanismo de SKF involucrado en la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espermatozoide de ratón requiere más trabajo.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Arndt, L., Castonguay, J., Arlt, E., Meyer, D., Hassan, S., Borth, H., Zierler, S., Wennemuth, G., Breit, A., Biel, M., Wahl-Schott, C., Gudermann, T., Klugbauer, N., & Boekhoff, I. (2014). NAADP and the two-pore channel protein 1 participate in the acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Molecular biology of the cell*, 25(6), 948–964. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0523>
- AUSTIN C. R. (1951). Activation and the correlation between male and female elements in fertilization. *Nature*, 168(4274), 558–559. <https://doi.org/10.1038/168558c0>
- Bakowski, D., Murray, F., & Parekh, A. B. (2021). Store-Operated Ca²⁺ Channels: Mechanism, Function, Pharmacology, and Therapeutic Targets. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 61, 629–654. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-031620-105135>
- Balestrini, P. A., Jabłoński, M., Schiavi-Ehrenhaus, L. J., Marín-Briggiler, C. I., Sánchez-Cárdenas, C., Darszon, A., Krapf, D., & Buffone, M. G. (2020). Seeing is believing: Current methods to observe sperm acrosomal exocytosis in real time. *Molecular reproduction and development*, 87(12), 1188–1198. <https://doi.org/10.1002/mrd.23431>
- Barral, D. C., Staiano, L., Guimas Almeida, C., Cutler, D. F., Eden, E. R., Futter, C. E., Galione, A., Marques, A., Medina, D. L., Napolitano, G., Settembre, C., Vieira, O. V., Aerts, J., Atakpa-Adaji, P., Bruno, G., Capuozzo, A., De Leonibus, E., Di Malta, C., Escrevente, C., Esposito, A., ... Seabra, M. C. (2022). Current methods to analyze lysosome morphology, positioning, motility and function. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 23(5), 238–269. <https://doi.org/10.1111/tra.12839>
- Beltrán, C., Treviño, C. L., Mata-Martínez, E., Chávez, J. C., Sánchez-Cárdenas, C., Baker, M., & Darszon, A. (2016). Role of Ion Channels in the Sperm Acrosome Reaction. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 220, 35–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7_3
- Berg, T. O., Strømhaug, E., Løvdaal, T., Seglen, O., & Berg, T. (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)(Pt 1), 229–236. <https://doi.org/10.1042/bj3000229>
- Bianchi, E., & Wright, G. J. (2016). Sperm Meets Egg: The Genetics of Mammalian Fertilization. *Annual review of genetics*, 50, 93–111. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-121415-121834>
- Cang, C., Bekele, B., & Ren, D. (2014). The voltage-gated sodium channel TPC1 confers endolysosomal excitability. *Nature chemical biology*, 10(6), 463–469. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1522>

- Carrasquel Martínez, G., Aldana, A., Carneiro, J., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2022). Acrosomal alkalization occurs during human sperm capacitation. *Molecular human reproduction*, 28(3), gaac005. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaac005>
- CHANG M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168(4277), 697–698. <https://doi.org/10.1038/168697b0>
- Chávez, J. C., De la Vega-Beltrán, J. L., José, O., Torres, P., Nishigaki, T., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2018). Acrosomal alkalization triggers Ca²⁺ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Journal of cellular physiology*, 233(6), 4735–4747. <https://doi.org/10.1002/jcp.26262>
- Chávez, J. C., Darszon, A., Treviño, C. L., & Nishigaki, T. (2020). Quantitative Intracellular pH Determinations in Single Live Mammalian Spermatozoa Using the Ratiometric Dye SNARF-5F. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 366. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00366>
- Clapham D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Clapham, David E. & Hulse Raymond E. (2021). Sperm ion channel swims into sharper focus. *Nature*, 595, 654-655. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01945-5>
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological reviews*, 91(4), 1305–1355. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2010>
- Darszon, A., Sánchez-Cárdenas, C., Orta, G., Sánchez-Tusie, A. A., Beltrán, C., López-González, I., Granados-González, G., & Treviño, C. L. (2012). Are TRP channels involved in sperm development and function?. *Cell and tissue research*, 349(3), 749–764. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1397-5>
- Davis, L. C., Morgan, A. J., & Galione, A. (2022). Acidic Ca²⁺ stores and immune-cell function. *Cell calcium*, 101, 102516. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102516>
- Delevoye, C., Hurbain, I., Tenza, D., Sibarita, J. B., Uzan-Gafsou, S., Ohno, H., Geerts, W. J., Verkleij, A. J., Salamero, J., Marks, M. S., & Raposo, G. (2009). AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *The Journal of cell biology*, 187(2), 247–264. <https://doi.org/10.1083/jcb.200907122>
- Eberhard, M., Miyagawa, K., Hermsmeyer, K., & Erne, P. (1995). Effects of mibefradil on intracellular Ca²⁺ release in cultured rat cardiac fibroblasts and human platelets. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 353(1), 94–101. <https://doi.org/10.1007/BF00168921>

- Ferreira, J. J., Cassina, A., Irigoyen, P., Ford, M., Pietroroia, S., Peramsetty, N., Radi, R., Santi, C. M., & Sapiro, R. (2021). Increased mitochondrial activity upon CatSper channel activation is required for mouse sperm capacitation. *Redox biology*, *48*, 102176. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102176>
- Freeman, S. A., Grinstein, S., & Orłowski, J. (2023). Determinants, maintenance, and function of organellar pH. *Physiological reviews*, *103*(1), 515–606. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2022>
- Gambardella, J., Morelli, M. B., Wang, X., Castellanos, V., Mone, P., & Santulli, G. (2021). The discovery and development of IP3 receptor modulators: an update. *Expert opinion on drug discovery*, *16*(6), 709–718. <https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1858792>
- Guyonnet, B., Egge, N., & Cornwall, G. A. (2014). Functional amyloids in the mouse sperm acrosome. *Molecular and cellular biology*, *34*(14), 2624–2634. <https://doi.org/10.1128/MCB.00073-14>
- Haller, T., Dietl, P., Deetjen, P., & Völkl, H. (1996). The lysosomal compartment as intracellular calcium store in MDCK cells: a possible involvement in InsP3-mediated Ca²⁺ release. *Cell calcium*, *19*(2), 157–165. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(96\)90084-6](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(96)90084-6)
- Hasuwa, H., Muro, Y., Ikawa, M., Kato, N., Tsujimoto, Y., & Okabe, M. (2010). Transgenic mouse sperm that have green acrosome and red mitochondria allow visualization of sperm and their acrosome reaction in vivo. *Experimental animals*, *59*(1), 105–107. <https://doi.org/10.1538/expanim.59.105>
- Herrick, S. B., Schweissinger, D. L., Kim, S. W., Bayan, K. R., Mann, S., & Cardullo, R. A. (2005). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *Journal of cellular physiology*, *202*(3), 663–671. <https://doi.org/10.1002/jcp.20172>
- Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes* (Sinauer, Sunderland, MA).
- Hu, M., Zhou, N., Cai, W., & Xu, H. (2022). Lysosomal solute and water transport. *The Journal of cell biology*, *221*(11), e202109133. <https://doi.org/10.1083/jcb.202109133>
- Huang, L., Keyser, B. M., Tagmose, T. M., Hansen, J. B., Taylor, J. T., Zhuang, H., Zhang, M., Ragsdale, D. S., & Li, M. (2004). NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *309*(1), 193–199. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.060814>
- Huang, W., Lu, C., Wu, Y., Ouyang, S., & Chen, Y. (2015). T-type calcium channel antagonists, mibefradil and NNC-55-0396 inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis in leukemia cell lines. *Journal of experimental & clinical cancer research*, *34*(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0171-4>

- Hwang, J. Y., & Chung, J. J. (2022). CATSPER Calcium Channels: twenty years on. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 10.1152/physiol.00028.2022. Advance online publication. <https://doi.org/10.1152/physiol.00028.2022>
- Hwang, J. Y., & Chung, J. J. (2023). CatSper Calcium Channels: 20 Years On. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 38(3), 0. <https://doi.org/10.1152/physiol.00028.2022>
- Khawar, M. B., Gao, H., & Li, W. (2019). Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 195. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00195>
- Krogsaeter, E., Rosato, A. S., & Grimm, C. (2022). TRPMLs and TPCs: Targets for lysosomal storage and neurodegenerative disease therapy?. *Cell calcium*, 103, 102553. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102553>
- La Spina, F. A., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Vitale, A. M., Falzone, T. L., Krapf, D., Hirohashi, N., & Buffone, M. G. (2016). Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Developmental biology*, 411(2), 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.02.006>
- Larson, J. L., & Miller, D. J. (1999). Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Molecular reproduction and development*, 52(4), 445–449. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199904\)52:4<445::AID-MRD14>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199904)52:4<445::AID-MRD14>3.0.CO;2-6)
- Lawson, C., Dorval, V., Goupil, S., & Leclerc, P. (2007). Identification and localisation of SERCA 2 isoforms in mammalian sperm. *Molecular human reproduction*, 13(5), 307–316. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam012>
- Lefièvre, L., Nash, K., Mansell, S., Costello, S., Punt, E., Correia, J., Morris, J., Kirkman-Brown, J., Wilson, S. M., Barratt, C. L., & Publicover, S. (2012). 2-APB-potentiated channels amplify CatSper-induced Ca(2+) signals in human sperm. *The Biochemical journal*, 448(2), 189–200. <https://doi.org/10.1042/BJ20120339>
- Li, S., Hao, B., Lu, Y., Yu, P., Lee, H. C., & Yue, J. (2012). Intracellular alkalization induces cytosolic Ca²⁺ increases by inhibiting sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA). *PloS one*, 7(2), e31905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031905>
- Luan, S., & Wang, C. (2021). Calcium Signaling Mechanisms Across Kingdoms. *Annual review of cell and developmental biology*, 37, 311–340. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219-035210>
- Mata-Martínez, E., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2018). pH-dependent Ca²⁺ oscillations prevent untimely acrosome reaction in human sperm. *Biochemical and biophysical research communications*, 497(1), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.042>

- Mata-Martínez, E., Sánchez-Tusie, A. A., Darszon, A., Mayorga, L. S., Treviño, C. L., & De Blas, G. A. (2021). Epac activation induces an extracellular Ca²⁺ -independent Ca²⁺ wave that triggers acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrology*, 9(4), 1227–1241. <https://doi.org/10.1111/andr.12989>
- Marks, M. S., Heijnen, H. F., & Raposo, G. (2013). Lysosome-related organelles: unusual compartments become mainstream. *Current opinion in cell biology*, 25(4), 495–505. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.04.008>
- Mayorga, L. S., Tomes, C. N., & Belmonte, S. A. (2007). Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB life*, 59(4-5), 286–292. <https://doi.org/10.1080/15216540701222872>
- Melchionda, M., Pittman, J. K., Mayor, R., & Patel, S. (2016). Ca²⁺/H⁺ exchange by acidic organelles regulates cell migration in vivo. *The Journal of cell biology*, 212(7), 803–813. <https://doi.org/10.1083/jcb.201510019>
- Moreno, R. D., & Alvarado, C. P. (2006). The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Molecular reproduction and development*, 73(11), 1430–1434. <https://doi.org/10.1002/mrd.20581>
- Morgan, A. J., Davis, L. C., & Galione, A. (2015). Imaging approaches to measuring lysosomal calcium. *Methods in cell biology*, 126, 159–195. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.10.031>
- Morgan, A. J., Yuan, Y., Patel, S., & Galione, A. (2020). Does lysosomal rupture evoke Ca²⁺ release? A question of pores and stores. *Cell calcium*, 86, 102139. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102139>
- Morgan, A. J., Martucci, L. L., Davis, L. C., & Galione, A. (2022). Two-pore channels: going with the flows. *Biochemical Society transactions*, 50(4), 1143–1155. <https://doi.org/10.1042/BST20220229>
- Morris, J. T. (2014). The role of calcium stores in calcium signalling in human sperm. The University of Birmingham.
- Muro, Y., Buffone, M. G., Okabe, M., & Gerton, G. L. (2012). Function of the acrosomal matrix: zona pellucida 3 receptor (ZP3R/sp56) is not essential for mouse fertilization. *Biology of reproduction*, 86(1), 1–6. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095877>
- Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Toshimori, K., & Okabe, M. (2001). Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation. *Developmental biology*, 237(1), 222–231. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0353>

- Naylor, E., Arredouani, A., Vasudevan, S. R., Lewis, A. M., Parkesh, R., Mizote, A., Rosen, D., Thomas, J. M., Izumi, M., Ganesan, A., Galione, A., & Churchill, G. C. (2009). Identification of a chemical probe for NAADP by virtual screening. *Nature chemical biology*, 5(4), 220–226. <https://doi.org/10.1038/nchembio.150>
- Nishigaki, T., Wood, C. D., Shiba, K., Baba, S. A., & Darszon, A. (2006). Stroboscopic illumination using light-emitting diodes reduces phototoxicity in fluorescence cell imaging. *BioTechniques*, 41(2), 191–197. <https://doi.org/10.2144/000112220>
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A. L., Romero, F., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and biophysical research communications*, 450(3), 1149–1158. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.100>
- Osterrieder, W., & Holck, M. (1989). In vitro pharmacologic profile of Ro 40-5967, a novel Ca²⁺ channel blocker with potent vasodilator but weak inotropic action. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 13(5), 754–759.
- O'Toole, C. M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R. A., & Florman, H. M. (2000). Ca²⁺ 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), 1571–1584. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.5.1571>
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L., & Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603–609. <https://doi.org/10.1038/35098027>
- Romarowski, A., Luque, G. M., La Spina, F. A., Krapf, D., & Buffone, M. G. (2016). Role of Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 220, 129–144. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7_7
- Rybalchenko, V., Ahuja, M., Coblenz, J., Churamani, D., Patel, S., Kiselyov, K., & Muallem, S. (2012). Membrane potential regulates nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) dependence of the pH- and Ca²⁺-sensitive organellar two-pore channel TPC1. *The Journal of biological chemistry*, 287(24), 20407–20416. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359612>
- Sánchez-Tusie, A. A., Vasudevan, S. R., Churchill, G. C., Nishigaki, T., & Treviño, C. L. (2014). Characterization of NAADP-mediated calcium signaling in human spermatozoa. *Biochemical and biophysical research communications*, 443(2), 531–536. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.011>
- She, Z. Y., Yu, K. W., Wei, Y. L., Zhong, N., & Lin, Y. (2021). Kinesin-7 CENP-E regulates the formation and structural maintenance of the acrosome. *Cell and tissue research*, 383(3), 1167–1182. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03341-3>

- Souza Bomfim, G. H., Mitaishvili, E., Aguiar, T. F., & Lacruz, R. S. (2021). Mibefradil alters intracellular calcium concentration by activation of phospholipase C and IP₃ receptor function. *Molecular biomedicine*, 2(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s43556-021-00037-0>
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., & Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature*, 471(7338), 382–386. <https://doi.org/10.1038/nature09769>
- Sun-Wada, G. H., Imai-Senga, Y., Yamamoto, A., Murata, Y., Hirata, T., Wada, Y., & Futai, M. (2002). A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. *The Journal of biological chemistry*, 277(20), 18098–18105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111567200>
- Thapa, P., Arnquist, I., Byrnes, N., Denisenko, A. A., Foss, F. W., Jr, Jones, B. J. P., McDonald, A. D., Nygren, D. R., & Woodruff, K. (2019). Barium Chemosensors with Dry-Phase Fluorescence for Neutrinoless Double Beta Decay. *Scientific reports*, 9(1), 15097. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49283-x>
- Tian, C., Du, L., Zhou, Y., & Li, M. (2016). Store-operated CRAC channel inhibitors: opportunities and challenges. *Future medicinal chemistry*, 8(7), 817–832. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0024>
- Treviño, C. L., Santi, C. M., Beltrán, C., Hernández-Cruz, A., Darszon, A., & Lomeli, H. (1998). Localisation of inositol trisphosphate and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: possible functional implications. *Zygote (Cambridge, England)*, 6(2), 159–172. <https://doi.org/10.1017/s0967199498000094>
- Treviño, C. L., De la Vega-Beltrán, J. L., Nishigaki, T., Felix, R., & Darszon, A. (2006). Maitotoxin potently promotes Ca²⁺ influx in mouse spermatogenic cells and sperm, and induces the acrosome reaction. *Journal of cellular physiology*, 206(2), 449–456. <https://doi.org/10.1002/jcp.20487>
- Tsukioka, M., Iino, M., & Endo, M. (1994). pH dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release in permeabilized smooth muscle cells of the guinea-pig. *The Journal of physiology*, 475(3), 369–375. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020078>
- Visa, A., Alza, L., Cantí, C., & Herreros, J. (2022). Tetralol derivative NNC-55-0396 induces glioblastoma cell death by activating IRE1α, JNK1 and calcium signaling. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 149, 112881. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112881>
- Wahl-Schott, C., Freichel, M., Hennis, K., Philippaert, K., Ottenheijm, R., Tsvilovskyy, V., & Varbanov, H. (2023). Characterization of Endo-Lysosomal Cation Channels Using Calcium Imaging. *Handbook of experimental pharmacology*, 278, 277–304. https://doi.org/10.1007/164_2023_637

- Walensky, L. D., & Snyder, S. H. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *The Journal of cell biology*, 130(4), 857–869. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.4.857>
- Xiong, J., & Zhu, M. X. (2016). Regulation of lysosomal ion homeostasis by channels and transporters. *Science China. Life sciences*, 59(8), 777–791. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5090-x>
- Yanagimachi R. (2022). Mysteries and unsolved problems of mammalian fertilization and related topics. *Biology of reproduction*, 106(4), 644–675. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac037>
- Zajac, M., Modi, S., & Krishnan, Y. (2022). The evolution of organellar calcium mapping technologies. *Cell calcium*, 108, 102658. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102658>
- Zanetti, N., & Mayorga, L. S. (2009). Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biology of reproduction*, 81(2), 396–405. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076166>
- Zhang, X., Xin, P., Yoast, R. E., Emrich, S. M., Johnson, M. T., Pathak, T., Benson, J. C., Azimi, I., Gill, D. L., Monteith, G. R., & Trebak, M. (2020). Distinct pharmacological profiles of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 channels. *Cell calcium*, 91, 102281. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102281>
- Zhou, X., Belavek, K. J., & Miller, E. W. (2021). Origins of Ca²⁺ Imaging with Fluorescent Indicators. *Biochemistry*, 60(46), 3547–3554. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00350>



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias

**DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: Bases moleculares de los flujos de Ca²⁺ en el acrosoma del espermatozoide de ratón, que presenta el alumno Enrique Ismael Oliver Santiago (10010100) para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Luis Enrique Alberto Cañedo y Dorantes FM – UAEM	APROBADO	
Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla CIDC – UAEM	APROBADO	
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC – UAEM	APROBADO	
Dr. Ignacio López González IBT – UNAM	APROBADO	
Dr. Alberto Darszon Israel IBT – UNAM	APROBADO	
Dr. Juan José Acevedo Fernández FM – UAEM	APROBADO	
Dra. Gabriela Castañeda Corral FM – UAEM	APROBADO	

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 6011 posgradoenciencias@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2023-05-17 11:47:47 | Firmante
 sDoa1jUR6a4T+Lor7E/6bs6T7THgRSWCySE1P/EyAX2QVd176D5VaLYHcIkDThWL2dgbBzXnrnos/olvvxy43U0RoKTF4rq/R/UCy4a+9IQlxLipm0C1QGANdvKcRSLAXs+CY
 jWpBqhXaFoA4M5X39ap+ud4U7UJteLJ+1w6NIMRdQdUBVmxIU7R7ZKDGMLZL31oeIZCCChG9sh9a6ouqRkMrpUn9Blm0K/C7r25pn6MFJihO65KavL7JsnbVKN2Grc6HN/
 AyVq9BNVYze9Tdg0P69D+mx7d6XaeKZsxXa2uB0xrSfQWlxVefGcMG6T/n+P1/132nA==

IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ | Fecha:2023-05-17 11:57:24 | Firmante
 QAOtQs32yMOFa9ZukWCvtdfwoGxPkSvW1UbQLcla+Q3zkuEdYIBUpZbmHJ9oT9zqQ0xcEvl2NhSN+rNkkZHO/340ml9hQPPoyjqRyu44rfowTPg6afg8pOjPRQGUmdy7GboomIH
 SSECVlyfV/EcmI9d+xDSYrRdu1qWbEh2P0EeHR5nrXivp5SuVXMFkW0kLyDbOQzIOMzblZK7UYongvIKy7J119pzw9fjmn1JcyPnW6x02bqJ1C4EpaFMQu2Kz6TkWw/7DWGo5
 2S4Dz+gIuybxQE3ZJb4vbFnRxF5yJZSvP11666JwqVlrvzTE3fz53B/zYlal0hZkK7/pgOTA==

ALBERTO DARSZON ISRAEL | Fecha:2023-05-17 12:31:50 | Firmante
 doJMdChmQleviCT9Vgpyveede5uAIL5E+reiVQ38ZHOXAc/ekypA5CluHNrWngcAami/ay6ZL01RK5r8sf2QhBgAKo5oGT+vw8fkSOQbdqW/nSl9CHlal10La+E+mB8zaRPCrdCP
 IKDZGL+AsPjWEh8RbrWPD9kISqeYdBGaeJ/cOk5RPwGbtOUW/9H1rcOuoons96Mlx6Jel96tW95f8EhJ/hO2XsUItZ1hpY8Fj3K20a2Pz0v9jzBmTKb/CuRwzNjs71qlmoiv
 RPmpAYhEpUIMiz+VhcPfriPO+ijTR/mMzpr+xfUWspY6Umf2OMv0MTWzAnPT0w==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2023-05-17 15:43:52 | Firmante
 dDIvReOLkKwfpUqXCx7UnqD6h/CzeR5YBpVa52pCpto52noMwzbf3MAi+lhah7iVzXc7HayW0LIn0X/NB19T+PkBJWwJLO8h54i7+I3f9PliN+oO9lrqTEntXfCMBRH6VUYqkiGIC
 1Md1ytf4+Kn1jhu3QT3+EVZPVKWKv7nI3FvLQeKxh7TbB9cHUrZyvgKLIpREU3Cnj1Blbwko7MdsYiIn9FzW5Xvth9hb2z1IGR93+UTIMWwuaegasuokubUqmCmM4gZ8bBBtAK5t
 /CVF9tuaz3xNz3a0EwyVvOXa2Rm53L2j0C8wTjhg+QW6ZiWwIzaBqfHisRxAhDg==

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2023-05-18 14:42:20 | Firmante
 NvKjpWq/2yfkYdFi3N8G2ZYJ6SvIcJUHACgguwQYxlyQriUodwYwQ/d79q5C+WbNqbbt16DnsjeqGdkDw6FwM3B5Mivpzo3oC1j+cMlp2DD7bpReMT1h9DQxHNmtdeddfi0mcOT
 IRvksv2IvoikOR7zR/6A3CQI5GHob+8JNldyS09ED4OePosRkS YGmEjrh2LAH1zzeVpLcrFzWGoelMIWkk8ppjKcAcfyQ0DJEUyEOLR2r10YmieFJCzGSHGBc0Mq884oF/kjW6lz
 on1wS3WBdMdKpccZsnfc06iV9foFpP48s+McY7mD/qIHnkQqWr9ia6Z9xZSktuw==

LUIS ENRIQUE ALBERTO CAÑEDO Y DORANTES | Fecha:2023-05-24 12:25:12 | Firmante
 Fmccoc07ie3iL9X2R99iFKMidPZ1QmbYIEQb1DmcLmYwOS8kaiVqbHh39T5ZvU2fzNDIT43RBI0qasyZ+UAHinM/Cki/s7112J4wnFBgYaRqJGoeEILAWOzqKQMqRSdQcF5YvcS
 MSSOTpGf+mA2LEIYCuRhE7MZIp8LhUJecWx2Ve60Y0rBHxbNfIP5ZWB2RYkEntfAMAJ0aVCSgGtPpOdpURr5fjdmAOCudeK7GsjXikb/mZnPpEAtkdhPEOBj53okysDX16ue
 pk+ZjofN9kxk0Tny5jATdigncd7ldwo8e7JBTAbu7ve8iBkK972dAh6NsO58qxHuqUL/sNw==

GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL | Fecha:2023-06-02 14:48:53 | Firmante
 SZaHbdadeAl/gR1AkullbUv3TJaaNtwE0lp4z+4bwtxrBfhlv17h3A8yGYEVDmokeMadSwbd/xU3i0KeTkRPeexXijye6n/8hhE2s751NiGnfpH8MAZqHT4ntmdzTFxq6E4+T66mOCp
 Wurrb7cCHS9QkYL85WH6SQI5V0O72QDV7B6KL04Hph6kGvUhfedBICIjBjGJX/MSJNZVEM0z73UBRVSDhyM6CCQF5DN956ME50jIYQYsu7+fnH11U1UuzJe+gr08S2KxLS
 5VixnYwm9ayLjORXOTciSEnE5Jj7mb6zWw0FRDsNnjTcfQMf704ukMj2ZiikIAOhYyw==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
 escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

NdZuZ00FY

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/g1nYRMd2jNUZvsi1wbTtYO8sanrWgha>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
 2017-2023