
TRABAJO FIN DE GRADO

Estudio de la activación del canal de calcio CatSper en
espermatozoides ovinos

Autor:

Marcos Brú Albesa

Directoras:

Rosaura Pérez Pe

Sara Miguel Jiménez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.

Grupo de investigación: Biología, Fisiología y Tecnologías de la Reproducción
(BIOFITER)

Septiembre de 2022

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Procesos que conducen a la obtención de la capacidad fecundante del espermatozoide	4
2.2. El calcio y su papel señalizador	4
2.3. El canal CatSper y otros canales iónicos	5
2.4. La importancia de CatSper para la fecundación	6
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. Preparación de muestras para experimentación con semen humano	8
4.1.1. Obtención de las muestras espermáticas	8
4.1.2. Selección espermática mediante el método de <i>swim-up</i> /dextrano	8
4.1.3. Recuento de espermatozoides y cálculo de la concentración	9
4.1.4. Evaluación de la motilidad espermática	9
4.1.5. Evaluación de la viabilidad espermática por citometría de flujo	10
4.2 Preparación de muestras para experimentación con semen ovino	10
4.2.1. Obtención de las muestras espermáticas	10
4.2.2. Selección espermática mediante el método de <i>swim-up</i> /dextrano	11
4.3. Detección del calcio intracelular por fluorimetría	11
4.4. Medida del cambio de pH intracelular	12
4.5. Desarrollo experimental	12
4.5.1. Inyección de alta concentración de Ca^{2+}	12
4.5.2. Inhibición de CatSper con ESI-09 y H-89 e inyección de alta concentración de Ca^{2+}	13
4.5.3. Curva dosis respuesta de calmidazolium	13
4.5.4. Inhibición de CatSper con ESI-09 y H-89 e inyección de calmidazolium	13
4.5.5. Activación de CatSper por alcalinización con NH_4Cl	13
4.5.6. Activación de CatSper por cambio de voltaje con KCl en medio alcalino	14
4.5.7. Activación de CatSper por progesterona	14
4.6. Análisis estadístico	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
5.1. Comparación del efecto de la presencia de alta concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular en espermatozoides ovinos y humanos	14
5.2. Estudio del efecto de ESI-09 y H-89 en la entrada de calcio en espermatozoides ovinos y humanos	15
5.3. Evaluación de la entrada basal de calcio en espermatozoides ovinos y humanos mediante la exposición a diferentes concentraciones de calmidazolium	17

5.4. Análisis del efecto de la combinación de la inhibición de CatSper y la inhibición de la bomba PMCA4 en espermatozoides ovinos y humanos	18
5.5. Estudio del efecto de la alcalinización intracelular en la entrada de calcio en espermatozoides ovinos y humanos	20
5.6. Evaluación del efecto de la despolarización de membrana plasmática en la entrada de calcio en espermatozoides ovinos y humanos	21
5.7. Efecto de la progesterona en los niveles de calcio intracelular en espermatozoides ovinos y humanos	23
6. CONCLUSIONES	24
7. BIBLIOGRAFÍA	25
8. ANEXOS	28
ANEXO I. Curva dosis respuesta de saponina.....	28

1. RESUMEN

El calcio es un catión que actúa como agente señalizador fundamental para que los espermatozoides adquieran capacidad fecundante, dado que participa en los procesos de capacitación, hiperactivación, quimiotaxis y reacción acrosómica. El canal más importante encargado de la entrada de calcio a los espermatozoides es CatSper, un canal específico de la célula espermática localizado en la membrana de la pieza intermedia del flagelo. Para que el calcio entre al espermatozoide a través de CatSper, éste tiene que activarse. En espermatozoides humanos está descrito que CatSper se activa por: 1) despolarización de la membrana plasmática por cambios de voltaje, 2) alcalinización del medio intracelular, y 3) unión a determinados ligandos, como la progesterona.

En este trabajo se planteó la hipótesis de que existen diferencias entre los mecanismos de activación del canal CatSper en espermatozoides ovinos y humanos. El objetivo de este trabajo fue, por tanto, estudiar si las formas de activación de CatSper en espermatozoides humanos producen también la activación de CatSper en espermatozoides ovinos. Además, se estudiaron los efectos de inhibidores conocidos de CatSper en humano, como ESI-09 y H-89, en espermatozoides ovinos.

Para ello, se realizaron los mismos experimentos en espermatozoides de ambas especies, previamente seleccionados por *swim-up*. Los cambios en la concentración de calcio intracelular y en el pH intracelular se evaluaron mediante fluorimetría con las sondas Fluo-4-AM y BCECF, respectivamente.

Los resultados mostraron que el H-89 no ejerce ningún efecto sobre CatSper en los espermatozoides ovinos y que, sorprendentemente, el ESI-09 favorece el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides ovinos expuestos a altas concentraciones de calcio en el medio extracelular. De los tres mecanismos de activación de CatSper ensayados en espermatozoides ovinos, solo la activación por despolarización de la membrana plasmática en un medio con alta concentración de K^+ y pH 8 produce un incremento del calcio intracelular.

ABSTRACT

Calcium is a cation that acts as a fundamental signalling agent for spermatozoa to have fertilizing capacity, since it participates in capacitation, hyperactivation, chemotaxis, and acrosome reaction processes. The most important channel responsible for the entry of calcium into the spermatozoa is CatSper, a sperm-specific channel located in the membrane of the midpiece in the flagellum. CatSper channel activation is required to allow calcium entry into the sperm cell. In human sperm, it has been described that CatSper can be activated by: 1) depolarization of the plasma membrane due to voltage changes, 2) alkalization of the intracellular medium, and 3) binding to certain ligands, such as progesterone.

In this project, the hypothesis of existing differences between the activation mechanisms for the CatSper channel in ram spermatozoa compared to the human spermatozoa was raised. The objective of this project was, therefore, to study whether the forms of activation of CatSper in human spermatozoa produce the activation of CatSper in ram spermatozoa. In addition, the effects of known human CatSper inhibitors such as ESI-09 and H-89 on ram sperm were studied.

To achieve these objectives, the same experiments were performed in sperm from both species, previously selected by *swim-up*. Changes in intracellular calcium concentration and intracellular pH were evaluated by fluorimetry with Fluo-4-AM and BCECF probes, respectively.

The results showed that H-89 does not produce any effect on CatSper of ram spermatozoa and that, surprisingly, ESI-09 produce an increase of $[Ca^{2+}]_i$ in ram spermatozoa exposed to high concentrations of calcium in the extracellular medium. Among the three CatSper activation mechanisms tested in ram spermatozoa, only the activation by depolarization of the plasmatic membrane with high K^+ and pH 8 medium produced an increase in intracellular calcium.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Procesos que conducen a la obtención de la capacidad fecundante del espermatozoide

Los espermatozoides abandonan el tracto reproductor masculino en el momento de la eyaculación junto con secreciones de las glándulas sexuales accesorias que constituyen el plasma seminal. Este plasma seminal contiene factores descapacitantes, que mantendrán a los espermatozoides en un estado de quiescencia hasta que se encuentren ya en el tracto reproductor femenino. Allí irán avanzando gracias al batido de su flagelo y, una vez en las inmediaciones del ovocito, se eliminarán los factores descapacitantes, dando comienzo el proceso de **capacitación**, imprescindible para que los espermatozoides adquieran capacidad fecundante. Sólo los espermatozoides capacitados parecen capaces de responder a un gradiente de concentración de determinadas sustancias que los guiarán hasta el ovocito mediante **quimiotaxis** (1). La capacitación espermática conduce, por un lado, a una **hiperactivación flagelar**, que dota al espermatozoide de un movimiento más amplio y vigoroso, y por otro, a la **reacción acrosómica**, que le permite, tras la liberación de enzimas del acrosoma, atravesar la zona pelúcida que rodea al ovocito posibilitando que tenga lugar la fusión de ambos gametos (2). Para que todos estos procesos tengan lugar, es necesario que se produzca un incremento del calcio intracelular (3).

2.2. El calcio y su papel señalizador

El calcio (Ca^{2+}) es un catión que regula numerosos procesos fisiológicos en las células, y es indispensable para el correcto funcionamiento celular. Se trata de un segundo mensajero que participa en la transducción de señales intracelulares. El calcio no puede ser sintetizado *de novo* ni degradado en la célula, por lo que su concentración intracelular se regula por diferentes mecanismos. Además, los cambios en la concentración de calcio intracelular pueden tener lugar en zonas localizadas de la célula, lo que le otorga una cierta versatilidad como molécula señalizadora (4).

En el caso de los espermatozoides, el calcio es un agente señalizador fundamental para que tengan lugar procesos como la capacitación, la hiperactivación, la quimiotaxis (5) y la reacción acrosómica (6,7). Para que esta señalización mediada por calcio sea posible, es necesario que se produzca la entrada de calcio al citoplasma desde el espacio extracelular y/o desde los reservorios intracelulares (8). Esto se produce gracias a la presencia de proteínas de unión a calcio, y a los transportadores de membrana, que mantienen una baja concentración de calcio intracelular, permitiendo así un gradiente de entrada a la célula (9).

Los depósitos de calcio intracelular juegan un papel crucial en la regulación de la concentración del calcio intracelular y, por tanto, en la generación de señales a través del calcio. En los espermatozoides se han identificado depósitos de calcio en la zona anterior de la cabeza y en la zona del cuello y la pieza intermedia (8). En concreto, el acrosoma (10) por sí mismo es un reservorio de calcio en los espermatozoides, junto con la envoltura nuclear redundante (RNE) cercana al cuello (11) y las mitocondrias de la pieza intermedia del flagelo (12).

El movimiento de calcio entre el interior y el exterior celular se produce por medio de canales iónicos. En el caso de los espermatozoides, el canal de entrada de calcio más importante es el canal CatSper, (*Cation channel of sperm*), y la salida se produce principalmente por la bomba PMCA4 (*Plasma Membrane Calcium ATPase 4*) (13,14).

2.3. El canal CatSper y otros canales iónicos

El canal CatSper es específico de la célula espermática y se localiza en el flagelo, en la membrana de la pieza intermedia y es el encargado de permitir la entrada de calcio en la célula (13).

Este canal es imprescindible para la capacidad fecundante de los espermatozoides, ya que está comprobado que, en especies como el ratón, la ausencia de CatSper produce esterilidad debido a la incapacidad de los espermatozoides para moverse y, por tanto, de ascender por el tracto reproductor femenino y de atravesar la zona pelúcida y fecundar al ovocito (15).

El canal CatSper está compuesto por cuatro subunidades α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$), que forman un poro en la membrana, y seis subunidades auxiliares (β , γ , δ , ϵ , ζ y EFCAB9), por lo que se trata de un canal de gran complejidad (16) (Fig. 1). En cuanto a las subunidades principales, CatSper 1 tiene un papel fundamental en la motilidad espermática (17) y su expresión estable requiere de CatSper 2 y viceversa (18). En cambio, la expresión estable de CatSper 3 y 4 no depende de la expresión de CatSper 1 y 2 (19).

Las subunidades formadoras de poro presentan seis regiones transmembrana cada una formando dos dominios, uno de ellos actúa como sensor del voltaje y el otro permite la formación del poro. Las regiones transmembrana que funcionan como sensores de voltaje contienen varios aminoácidos cargados positivamente, como lisinas y argininas (20).

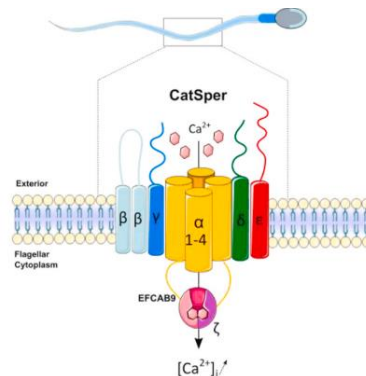


Figura 1. Estructura y localización del canal CatSper en espermatozoides de mamíferos. Se muestran en amarillo las cuatro subunidades α que forman el poro, en azul claro la subunidad beta (β), en azul más oscuro la subunidad gamma (γ), en verde la subunidad delta (δ), en rojo la subunidad épsilon (ϵ) y debajo de las subunidades α se observan las subunidades zeta (ζ) y EFCAB9. Imagen tomada de *Rahban et al.* (16)

La subunidad EFCAB9 es la que ha sido identificada más recientemente (21), y actúa como sensor de calcio y de pH. Esta subunidad se encuentra unida directamente a la subunidad ζ formando un complejo que regula la apertura y el cierre del canal CatSper dependiente de pH. En caso de ausencia de EFCAB9 y/o de la subunidad ζ , el canal CatSper pierde capacidad de respuesta a la alcalinización, haciendo al canal menos eficiente (16).

La homología de las subunidades formadoras de CatSper entre la especie humana y la ovina están en un rango entre el 53% y el 83%, lo cual puede implicar diferencias, entre otras cosas, en los mecanismos de activación de CatSper entre especies.

Para que se produzca la entrada de calcio al espermatozoide por el canal CatSper, éste se tiene que activar, lo que se consigue, al menos en los espermatozoides humanos, gracias a la acción concomitante de tres mecanismos (16): **1) despolarización de la membrana plasmática** por cambios de voltaje (22), **2) alcalinización del medio intracelular** (23), y **3) unión a determinados ligandos**, como la progesterona (24). No obstante, estos modos de activación podrían variar entre las distintas especies de mamíferos.

En cuanto a la activación del canal CatSper por medio de la progesterona, se produce a través de la proteína 2 que contiene un dominio α/β hidrolasa (ABHD2) que, al unirse a la progesterona, degrada el 2-araquidonilglicerol que inhibe CatSper, permitiendo la entrada de calcio (25). Solo está demostrado que la progesterona active CatSper en espermatozoides de humano y macaco, mientras que en otras especies como el ratón no produce ningún incremento en el calcio intracelular (24,26,27).

Para el correcto mantenimiento de la homeostasis iónica en los espermatozoides intervienen numerosos canales iónicos (Fig. 2). Entre éstos se encuentran el **canal de intercambio de Na^+/H^+ (NHEs)** (28), que importa sodio a través de la membrana plasmática y exporta H^+ , y el **canal de H^+ HV1** (29), que extrae protones del citosol para regular el pH intracelular (30). Por otro lado, cuando hay un aumento intracelular de calcio en la célula, es necesario restablecer los niveles de este ion, y para que esto ocurra, participan otros canales transportadores de calcio, además de CatSper. En la membrana plasmática se encuentra la **bomba PMCA4 (Plasma Membrane Calcium ATPase 4)**, que es la principal vía de salida de calcio (14); el **canal de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$** , que ayuda a mantener el balance de calcio al exportarlo para introducir tres Na^+ (31) y los **canales de calcio dependientes de depósito (SOCCs)** (32). En la membrana plasmática de los espermatozoides también hay canales de K^+ , como **SLO3**, que permiten regular el potencial de membrana de los espermatozoides (33).

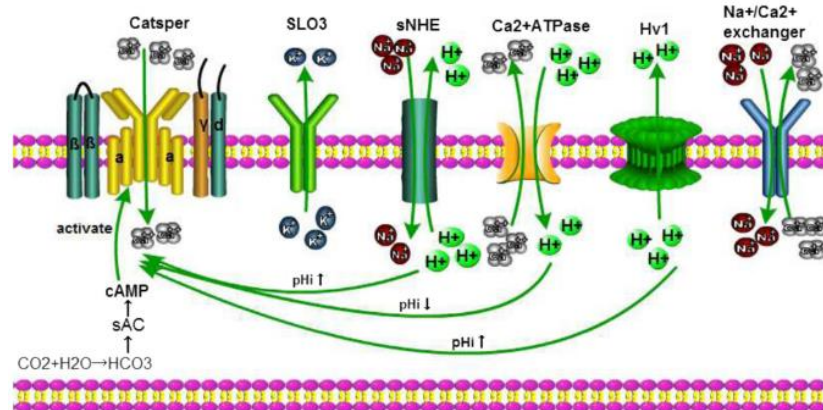


Figura 2. Esquema de los distintos canales que regulan la homeostasis celular del espermatozoide. En la membrana plasmática se localizan múltiples canales involucrados en la homeostasis iónica. En el esquema, de izquierda a derecha: el **canal CatSper**, que permite la entrada de calcio a la célula; el **canal SLO3**, capaz de expulsar iones K^+ regulando el potencial de membrana; el **canal sNHE**, caracterizado por el transporte de iones de Na^+ al interior y de protones al exterior celular; la **bomba Ca^{2+} ATPasa (PMCA4)**, principal vía de salida de calcio del espermatozoide, a cambio de la introducción de protones; el **canal Hv1**, encargado de la salida de protones del espermatozoide y el **intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$** , que posibilita la entrada de iones Na^+ , a cambio de la salida de iones Ca^{2+} . Esquema tomado de Sun Xiang-hong et al. (18).

2.4. La importancia de CatSper para la fecundación

Como se ha mencionado anteriormente, para que los espermatozoides adquieran capacidad fecundante tienen que sufrir, dentro del tracto reproductor femenino, un proceso denominado **capacitación**.

La capacitación espermática implica un conjunto de cambios físicos y bioquímicos, entre los que se incluyen modificaciones a nivel de membrana plasmática, como la salida de colesterol, un aumento en

la concentración de iones intracelulares, especialmente el calcio y el bicarbonato y el aumento en la fosforilación de proteínas y actividad protein quinasa, que inducirá los procesos de hiperactivación flagelar y reacción acrosómica (3,34,35) ya mencionados en el apartado 2.1.

Para que tenga lugar la capacitación es imprescindible un aumento del calcio intracelular, que podría estar mediado por el canal CatSper (36). En especies como el ratón se ha observado que CatSper juega un papel crucial en la entrada de calcio inducida por la unión a glicoproteínas de la zona pelúcida (18).

Además de ser esencial para la capacitación, el canal CatSper también es fundamental para que tenga lugar la **reacción acrosómica**, que es el último evento con el que culmina la capacitación espermática, ya que este proceso es también dependiente del incremento en el calcio intracelular (37). La reacción acrosómica es un proceso de exocitosis controlada en el que la membrana acrosomal externa del espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática que lo rodea, provocando la liberación de enzimas hidrolíticas que permiten al espermatozoide atravesar la zona pelúcida y en última instancia interactuar con la membrana plasmática del ovocito para que tenga lugar la fusión de ambos gametos (3). En la especie humana las células del *cúmulus* que rodean al ovocito liberan progesterona, la cual induce la entrada de calcio al espermatozoide a través del canal CatSper (24). Este aumento de calcio tiene muchos efectos, no solo la inducción de la reacción acrosómica.

Otro fenómeno importante para que tenga lugar la fecundación es la **hiperactivación de la motilidad**, la cual es inducida por un aumento de calcio en el flagelo (38), por lo que la participación del canal CatSper es esencial. La hiperactivación espermática se caracteriza por un aumento de la velocidad curvilínea y de la amplitud del movimiento lateral de la cabeza del espermatozoide, pasando así de un patrón de movimiento rectilíneo a un movimiento en forma de "8", que le permite localizar al ovocito cuando se encuentra en sus proximidades. En espermatozoides bovinos, el aumento de pH intracelular promueve la hiperactivación, principalmente induciendo la entrada de calcio, pero también por otros mecanismos que se desconocen (38). Además, en ratones carentes de los genes CatSper1 o CatSper 2 se ha observado esterilidad, debido a que sus espermatozoides no consiguen hiperactivarse durante la capacitación, y ni siquiera experimentan un aumento de calcio intracelular al ser sometidos a un tratamiento con medio con alto K^+ y alto pH (38). Para que se produzca la hiperactivación flagelar también tienen un papel importante otros canales de calcio localizados en los depósitos de calcio intracelulares (16).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El canal CatSper es la principal vía de entrada de calcio en espermatozoides y, por tanto, está implicado en procesos fundamentales para que el espermatozoide adquiera capacidad fecundante y que dependen de este segundo mensajero, como son: la capacitación, la hiperactivación, la reacción acrosómica y la quimiotaxis (18).

Para que se produzca la entrada de calcio al espacio intracelular a través del canal CatSper, se tiene que producir su activación, la cual puede llevarse a cabo por diversos estímulos. En espermatozoides humanos se ha visto que CatSper se activa por alcalinización intracelular, por despolarización de la membrana plasmática (voltaje) y por unión a determinados ligandos, como la progesterona (39). Sin embargo, las distintas subunidades de CatSper, presentan porcentajes de homología menores de lo que cabría esperar entre diferentes especies. Concretamente, entre la especie ovina, objeto de estudio en este trabajo, y la especie humana, hay unos valores de homología entre las subunidades de CatSper de entre el 53% y el 83%.

Por este motivo, se plantea la **hipótesis** de que existen diferencias en las formas de activación del canal CatSper en los espermatozoides de la especie ovina respecto a la especie humana.

De esta manera, el **objetivo principal** del presente trabajo consistió en estudiar la activación del canal de calcio CatSper en espermatozoides ovinos en comparación con los espermatozoides humanos.

Para cumplir este objetivo se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Comparar el aumento de calcio intracelular en espermatozoides de humano y de morueco en condiciones de alta concentración extracelular de calcio.
2. Evaluar el efecto de inhibidores conocidos de CatSper en espermatozoides humanos, como ESI-09 y H-89, en espermatozoides ovinos, comparando su acción sobre entrada de calcio en espermatozoides de ambas especies.
3. Analizar el acúmulo de calcio en espermatozoides humanos y en espermatozoides ovinos mediante la inhibición de la bomba PMCA4, la principal vía de salida de calcio en espermatozoides.
4. Comparar el efecto en la entrada de calcio en espermatozoides humanos y ovinos tras exposición a diferentes condiciones de activación de CatSper en humano: pH alcalino, despolarización y presencia de progesterona.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Preparación de muestras para experimentación con semen humano

4.1.1. Obtención de las muestras espermáticas

Las muestras de semen procedentes de donantes se obtuvieron mediante masturbación y eyaculación en un recipiente de plástico. Los individuos mantuvieron un periodo de abstinencia de tres días previamente a la toma de la muestra. Las muestras se dejaron licuefactar entre 30 y 60 minutos a 37 °C.

4.1.2. Selección espermática mediante el método de *swim-up*/dextrano

El método de *swim-up*/dextrano se llevó a cabo con el objetivo de eliminar el plasma seminal de la muestra y seleccionar los espermatozoides más viables y con una mejor motilidad. Este paso permite obtener mejores resultados debido, por un lado, a que el contacto prolongado del plasma seminal con los espermatozoides tiene un efecto perjudicial sobre los mismos (40) y, por otro lado, a la eliminación de los espermatozoides que presentan la membrana dañada y/o con peor motilidad.

En el caso de muestras espermáticas humanas el medio utilizado fue el HTF (*Human Tubular Fluid*), compuesto por: NaCl 93,8 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 0,2 mM, KH₂PO₄ 0,369 mM, CaCl₂ 2,04 mM, HEPES 20,98 mM, glucosa 2,78 mM, lactato sódico 21,4 mM, piruvato sódico 0,33 mM y NaHCO₃ 4 mM, pH 7,35.

Para llevar a cabo el proceso se utilizaron varios tubos de 50 ml inclinados 45° en una gradilla. En estos tubos se añadió en primer lugar un volumen de 4 ml de medio HTF y a continuación se depositó en la parte inferior del tubo 1 ml de semen. Seguidamente, se incubaron los tubos durante 60-90 minutos a

37 °C con una concentración de CO₂ del 5%. Pasado este tiempo, se recogieron 3-3,5 ml de la fase superior de los tubos en un tubo de 15 ml. Una vez obtenidos los espermatozoides seleccionados mediante el swim-up, se completó el volumen del tubo con HTF y se centrifugó a 700 xg y temperatura ambiente durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se descartó el sobrenadante, teniendo precaución de no arrastrar el pellet y se resuspendió en 500 µl de HTF para proceder al recuento de espermatozoides.

4.1.3. Recuento de espermatozoides y cálculo de la concentración

Se realizó el conteo de espermatozoides haciendo uso de una cámara de Neubauer, un microscopio y un contador manual. Para ello se preparó previamente una alícuota de semen resultante del swim-up diluido 20 veces en agua.

La fórmula que se utilizó para calcular la concentración fue la siguiente:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{céls}}{\text{ml}} \right) = \frac{n^{\circ} \text{ células contadas} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}}{n^{\circ} \text{ cuadrantes contados}}$$

En cambio, en espermatozoides ovinos se tomó una alícuota de la muestra *swim-up* y se diluyó 100 veces en agua para proceder al recuento y al cálculo de la concentración.

4.1.4. Evaluación de la motilidad espermática

El estudio de la motilidad espermática se realizó mediante un sistema automatizado de análisis de espermático asistido por ordenador (CASA, *Computer Assisted Semen Analysis*) a través del programa libre OpenCASA (41).

Se colocó una gota de semen obtenido del *swim-up* sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. La muestra se evaluó con un microscopio con contraste de fases y aumento 10x, provisto de una cámara conectada al ordenador para visualizar en pantalla lo que se ve a través del ocular. Se tomaron videos de cuatro campos distintos de cada muestra y el programa OpenCASA analizó las trayectorias individuales de cada espermatozoide, proporcionando la información cuantitativa de numerosos parámetros cinéticos. En este trabajo se evaluaron los valores de motilidad total (MT) (% de espermatozoides móviles) y motilidad progresiva (MP) (% de espermatozoides que se mueven siguiendo una trayectoria recta).

Dado que el módulo de motilidad del OpenCASA permite al usuario ajustar los parámetros de análisis libremente, los videos se evaluaron según los siguientes ajustes: 60 fotogramas por segundo, 120 fotogramas, resolución de la imagen en píxeles 800x600, tamaño mínimo de la célula 10 µm², tamaño máximo de la célula 100 µm², motilidad progresiva, STR (coeficiente de linealidad) >80% y VAP (velocidad media) >90%, VCL mínima (velocidad curvilínea) 10 µm/s, umbral menor de VCL 100 µm/s, umbral mayor de VCL 200 µm/s, longitud mínima de la trayectoria 30 fotogramas, y desplazamiento máximo entre fotogramas 20 µm.

El análisis de la motilidad en espermatozoides ovinos se llevó a cabo de la misma manera que en espermatozoides humanos. La única diferencia es que se colocó una gota de una dilución 1:5 de la muestra *swim-up* en mHTF, ya que se trataba de una muestra más concentrada que la humana.

4.1.5. Evaluación de la viabilidad espermática por citometría de flujo

La evaluación de la viabilidad de los espermatozoides humanos se realizó al terminar la centrifugación del *swim-up* para comprobar si al final de todo el proceso preparativo había suficientes espermatozoides viables para llevar a cabo los experimentos.

Se realizó una tinción fluorescente doble con yoduro de propidio (IP) y diacetato de carboxifluoresceína (CFDA). Esta tinción permite diferenciar a los espermatozoides en función de si presentan su membrana plasmática dañada o no. Los espermatozoides que presentan la membrana íntegra, y por tanto se consideran viables, quedan teñidos de color verde debido a que el CFDA entra en la célula dada su permeabilidad y es hidrolizado por las esterasas celulares, dando lugar a carboxifluoresceína altamente ionizada, que no puede salir de las células que tengan la membrana intacta, quedando retenida en su interior. Por el contrario, los espermatozoides con la membrana dañada, y por tanto considerados no viables, quedan teñidos de color rojo, debido a que el IP es un colorante nuclear que solamente entra en células con la membrana dañada y se une al ADN.

Para evaluar la viabilidad, se tomaron 300 μ l de una dilución 1:15 de la muestra en HTF y se añadieron 3 μ l de CFDA (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, 10 μ M en DMSO), 3 μ l de IP (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, 7,3 μ M en agua) y 3 μ l de formaldehído (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA) 0,5% (v/v en agua). Una vez preparada la tinción se dejó incubar 15 minutos en oscuridad a 37 °C y se evaluó mediante un citómetro de flujo FC 500 (Beckam Coulter, Fullerton, California, USA) que cuenta con un láser de argón a 488 nm. Para la detección de la fluorescencia se usaron los filtros FL1-525 \pm 5 nm para el CFDA y FL4-675 \pm 5 nm para el IP permitiendo la separación de la población de espermatozoides viables (positivos para CFDA) y espermatozoides no viables (positivos para IP). A partir de un 60% de viabilidad se consideró que la muestra era apta para realizar los experimentos (42).

En el caso de los espermatozoides ovinos no se evaluó la viabilidad, ya que presentaban tan buena motilidad que no se sospechó que estuvieran dañados.

4.2 Preparación de muestras para experimentación con semen ovino

4.2.1. Obtención de las muestras espermáticas

Las muestras seminales usadas para los experimentos se obtuvieron de nueve moruecos adultos de la raza *Rasa Aragonesa*, mediante vagina artificial. Estos animales pertenecen a la Asociación Nacional de Ganaderos de la raza *Rasa Aragonesa* (ANGRA) y se encuentran estabulados en el recinto de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, concretamente en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA). Toda la experimentación con animales llevada a cabo en este trabajo estuvo aprobada por la resolución PI39/17 de la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, siguiendo el Real Decreto 53/2013 para la protección de los animales de experimentación del Gobierno de España, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 2010/63 sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Se obtuvieron dos eyaculados consecutivos de cada morueco, pero solamente se utilizaron para la experimentación la mezcla de los segundos eyaculados, ya que estudios previos demostraron que su calidad es mayor que la de los primeros eyaculados (43). Además, al usar la mezcla de los segundos eyaculados, se evita la obtención de resultados variables por diferencias entre los individuos. La muestra obtenida se transportó hasta el laboratorio a una temperatura controlada de 37 °C.

4.2.2. Selección espermática mediante el método de *swim-up*/dextrano

El método de *swim-up* utilizado está basado en el establecido originalmente para espermatozoides humanos (44), pero se modificó su composición y se eliminó la centrifugación, por resultar ésta perjudicial para los espermatozoides ovinos (45).

El medio utilizado para llevar a cabo el *swim-up* en semen ovino se denomina mHTF (*modified Human Tubular Fluid*) y está compuesto por: NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 0,4 mM, K₂HPO₄ 0,3 mM, HEPES 21 mM, glucosa 2,8 mM, piruvato sódico 0,33 mM, lactato sódico 18,6 mM y sacarosa 200 mM, pH 6,5.

Para llevar a cabo el proceso se depositaron 500 µl de semen en el fondo de un tubo redondeado de 15 mm de diámetro. A continuación, sobre la muestra depositada se añadieron 500 µl de mHTF-Dx compuesto por 30 mg de dextrano/ml mHTF. El dextrano sirve de barrera física, impidiendo el ascenso de espermatozoides con motilidad baja y de aquellos que cuenten con alteraciones en la membrana. Sobre la capa de mHTF-Dx se añadieron lentamente 1,5 ml de mHTF-A, que contiene 5 mg de albúmina sérica bovina (BSA)/ml mHTF. Posteriormente, se incubó el tubo a 37 °C en posición vertical durante 15 minutos. Tras este tiempo se retiraron 750 µl de la fase superior y se desecharon por contener restos de plasma seminal. Los 750 µl retirados se repusieron con mHTFA y se volvió a incubar otros 15 minutos. Se repitió el proceso tres veces más hasta obtener 2,25 ml de muestra espermática libre de plasma seminal, a la que se denominó **muestra *swim-up***.

4.3. Detección del calcio intracelular por fluorimetría

La detección y cuantificación del calcio intracelular libre se realizó mediante al uso de la sonda fluorescente Fluo-4-AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Este compuesto presenta cambios en la intensidad de su fluorescencia verde en función de la concentración de calcio (46). El Fluo-4-AM es uno de los indicadores de calcio de alta afinidad más brillantes y estables, presenta una constante de disociación (kd) de 345 nM y permite ser usado a concentración más baja que otras sondas, con las consiguientes ventajas de dar menor absorbancia de fondo, tener menor toxicidad y requerir menor tiempo de incubación (46). Este indicador se encuentra unido a un éster acetoximetil (AM), que concede la hidrofobicidad suficiente al compuesto para atravesar la membrana plasmática, permitiendo que pueda ser utilizado añadiéndolo directamente al medio extracelular (46). Una vez dentro de las células, las esterasas intracelulares hidrolizan el grupo AM y queda la sonda atrapada en el interior de las células (46).

En un tubo opaco de 2 ml se añadieron 350 µl de muestra espermática a una concentración de 10⁷ cél/ml y se añadieron 1,76 µl de Fluo-4-AM 1 mM (concentración final de Fluo-4-AM 5 µM). Además, se añadieron 1,75 µl de ácido plurónico al 10% (v/v en agua) para alcanzar una concentración final de 0,05%, permitiendo así la dispersión del Fluo-4-AM en el medio acuoso (46). Se incubó durante 20 minutos a 37 °C en oscuridad. Después de la incubación, se centrifugó a 700 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Esta centrifugación permite lavar la muestra y eliminar la sonda del medio, dejando únicamente la que haya entrado en las células. Inmediatamente después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en mHTF o HTF, según la especie, a una concentración de 2,5 x10⁶ cél/ml.

La medición de la fluorescencia se llevó a cabo con el fluorímetro Fluostar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) equipado con un lector de microplacas. Las placas utilizadas en todos los experimentos fueron las placas NUNC® de 384 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

En los experimentos, se depositaron las muestras espermáticas teñidas con Fluo-4-AM en los pocillos y en el fluorímetro se utilizó una longitud de onda de excitación de 485-412 nm y 520 nm de emisión. Se midió en continuo y tras establecer la línea base, se inyectó por medio de una dilución 1:3 o 1:10 (v/v) el tratamiento pertinente.

En la puesta a punto de los experimentos indicados en los apartados 4.5.2, 4.5.3, 4.5.4, 4.5.5 y 4.5.6 se realizó una doble tinción de Fluo-4-AM y IP para comprobar que las condiciones de ensayo no daban lugar a la rotura de la membrana plasmática de los espermatozoides. Para ello se siguieron los pasos de una tinción de Fluo-4-AM convencional, pero tras el lavado por centrifugación, las muestras se resuspendieron con mHTF o HTF y con IP 53 μM . Como control positivo de la tinción de IP se utilizó saponina al 0,5% (v/v) en tampón fosfato, PBS (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*), que es un detergente que disgrega la membrana plasmática de los espermatozoides permitiendo entrar al IP. Para la medición de la fluorescencia correspondiente al IP, la longitud de onda de excitación fue de 544 nm y la de emisión 650-610 nm.

Los cambios en la fluorescencia se midieron como $\Delta F/F_0$ (%), que representa el porcentaje de aumento en la fluorescencia en relación a la línea base (47).

4.4. Medida del cambio de pH intracelular

En los experimentos en los que se estudió la activación de CatSper mediante un cambio de pH o mediante cambio de voltaje en medio alcalino, se llevó a cabo una tinción con BCECF 5 μM (2',7'-Bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxy-fluorescein, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) como control del cambio de pH intracelular. Esta sonda fluorescente presenta un patrón de excitación en el que hay un punto isobéptico a 440 nm de longitud de onda en el que la intensidad de la fluorescencia no cambia con el pH, en cambio a 480 nm los cambios en el pH producen variaciones en la intensidad de la fluorescencia. Se trabajó con un ratio de señal entre ambas longitudes de onda para así contar con una intensidad de fluorescencia de referencia. En el laboratorio no se contó con filtros apropiados para realizar una excitación a 440 nm por lo que se realizó una excitación a 380 nm, que supuso la referencia, y otra a 485 nm donde se observó cambio en la intensidad de fluorescencia en función del pH. Se captó la emisión de luz a 520 nm de longitud de onda. Los cambios producidos en el ratio de fluorescencia de BCECF (485/380) se representaron como $\Delta R/R_0$ (%), que supone el cambio en el ratio de fluorescencia en relación a la línea base establecida antes del tratamiento.

Para llevar a cabo la tinción con BCECF 5 μM se tomó una alícuota de 500 μl de semen a una concentración de 10^7 células/ml y se añadieron 1,25 μl de BCECF 2 mM. Se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C en oscuridad y posteriormente se realizó una centrifugación de lavado durante 5 minutos a 700 xg y temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió con mHTF o HTF en función de la especie.

4.5. Desarrollo experimental

4.5.1. Inyección de alta concentración de Ca^{2+}

Para la realización de esta serie de experimentos se utilizó EGTA, que queló el calcio que pudiera haber en el medio, de forma que cuando se realizó la inyección de calcio 10 mM se observó mayor aumento de señal de Fluo-4AM. El EGTA se añadió junto con el mHTF (espermatozoides ovinos) o HTF (espermatozoides humanos) al resuspender las células tras la centrifugación de lavado que sucedió a la tinción con Fluo-4AM. De esta forma, el volumen de 50 μl de células teñidas que se añadió a los

pocillos contenía EGTA 5 mM. Posteriormente se realizó una inyección 1:3 de mHTF o HTF con calcio 10 mM y tras transcurrir el tiempo conveniente de medición, se realizó una segunda inyección 1:10 (v/v) con ionomicina (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA) 10 μ M como control positivo. La ionomicina es un ionóforo de calcio que induce la entrada máxima posible de calcio en la célula y por tanto la máxima señal de fluorescencia (48).

4.5.2. Inhibición de CatSper con ESI-09 y H-89 e inyección de alta concentración de Ca^{2+}

En esta serie de experimentos, tras la adición de 50 μ l de la muestra teñida con Fluo-4-AM y con IP en los pocillos y la definición de la línea base, se adicionaron 25 μ l de ESI-09 y H-89 (ambos de Cayman Chemical Company, Michigan, USA) en diferentes pocillos respectivamente para tener una concentración final de 20 μ M de ambos inhibidores. Estos compuestos son inhibidores directos de CatSper en espermatozoides de humano (47). Tras dejar actuar los inhibidores en los pocillos durante 5 minutos se procedió a realizar una segunda inyección 1:10 (v/v) con calcio 10 mM y después de medir con el fluorímetro durante el tiempo conveniente se realizó una tercera inyección 1:10 (v/v) con ionomicina 10 μ M. Como control positivo para el IP se usó saponina al 0,5% (v/v).

4.5.3. Curva dosis respuesta de calmidazolium

El calmidazolium es un compuesto que disocia los complejos calcio-calmodulina en el interior de los espermatozoides produciendo la inhibición de la bomba PMCA4 (49), una de las principales vías de salida del calcio en espermatozoides, favoreciendo la acumulación de calcio en el interior celular.

En primer lugar, se añadieron 54 μ l de muestra con Ca^{2+} 2,7 mM teñida con Fluo-4-AM y con IP a los pocillos y, tras definir la línea base, se añadieron 6 μ l de calmidazolium (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA) a distintas concentraciones (10 μ M a 3 nM). Se usó ionomicina 10 μ M y saponina 0,5% (v/v) como controles positivos de la tinción de Fluo-4-AM y de IP, respectivamente.

4.5.4. Inhibición de CatSper con ESI-09 y H-89 e inyección de calmidazolium

Para la realización de estos experimentos se adicionaron 50 μ l de muestra conteniendo Ca^{2+} 2,7 mM teñida con Fluo-4-AM y con IP. Después de definir la línea base, se añadieron 25 μ l de ESI-09 y H-89 en pocillos distintos respectivamente para obtener una concentración final de 20 μ M de ambos inhibidores. Se dejó actuar a los inhibidores en los pocillos durante 5 minutos y se realizó una segunda inyección 1:10 (v/v) con calmidazolium a la concentración seleccionada en función de los resultados observados tras los experimentos detallados en el apartado anterior (curva dosis-respuesta). Finalmente se realizó una tercera inyección 1:10 (v/v) con ionomicina 10 μ M como control positivo de la tinción de Fluo-4-AM. Se usó saponina 0,5% (v/v) como control positivo de la tinción con IP.

4.5.5. Activación de CatSper por alcalinización con NH_4Cl

En los experimentos de alcalinización con NH_4Cl se añadieron en los pocillos inicialmente 50 μ l de muestra con Ca^{2+} 2,7 mM teñida con Fluo-4-AM y con IP, se definió la línea base y, a continuación, se realizó una segunda inyección de 25 μ l con concentraciones decrecientes de NH_4Cl (50 mM, 33,3 mM, 16,7 mM, 8,3 mM). Como control positivo del Fluo-4-AM se usó ionomicina 10 μ M y como control positivo del IP se usó saponina 0,5% (v/v). Como control del cambio de pH intracelular se llevó a cabo una tinción con BCECF 5 μ M como se explicó en el apartado 4.4.

4.5.6. Activación de CatSper por cambio de voltaje con KCl en medio alcalino

En estos experimentos, se añadieron en los pocillos 50 μ l de muestra con Ca^{2+} 2,7 mM teñida con Fluo-4-AM y con IP y se definió la línea base. Seguidamente se realizó una segunda inyección de 25 μ l con medio mHTF o HTF (según la especie) con dos concentraciones altas de KCl (135 mM y 45 mM) y pH 8 en pocillos diferentes respectivamente. Como control positivo de la tinción de Fluo-4-AM se utilizó ionomicina 10 μ M y como control positivo de la tinción de IP se empleó saponina al 0,5% (v/v). Se llevó a cabo una tinción con BCECF 5 μ M como control del cambio de pH intracelular (ver apartado 4.4).

4.5.7. Activación de CatSper por progesterona

Para estudiar si la progesterona activa CatSper en espermatozoides de ambas especies se realizó una curva dosis respuesta. En primer lugar, se añadieron 50 μ l de muestra teñida con Fluo-4-AM a los pocillos y tras establecer la línea base se añadieron 25 μ l de concentraciones decrecientes de progesterona (10 μ M a 0,3 μ M en humano y 10 μ M a 0,03 μ M en ovino). Como control positivo se utilizó ionomicina 10 μ M.

4.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en estos experimentos se reflejaron como la media \pm S.E.M. (error estándar de la media) del número de repeticiones correspondiente para cada experimento. Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos se utilizó el software GraphPad Prism 8 (Prism, La Jolla, CA, USA). La comparación entre el incremento de calcio intracelular en condiciones de alta concentración de calcio en el medio entre las dos especies estudiadas se analizó mediante un test t no pareado. Para el resto de los experimentos se realizó un test Shapiro Wilk sobre un test ANOVA para analizar si los datos tenían una distribución normal. En los casos en los que los datos seguían una distribución normal, se realizó una comparación múltiple con el test ANOVA para observar si había diferencias significativas entre el control y el tratamiento, mientras que en los casos en los que los datos no seguían una distribución normal, se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Comparación del efecto de la presencia de alta concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular en espermatozoides ovinos y humanos

Estos experimentos se llevaron a cabo con la intención de observar si se producía un aumento en la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) al exponer a los espermatozoides a altas concentraciones de calcio en el medio, así como identificar posibles diferencias entre las dos especies.

Como puede apreciarse (Fig. 3), en ambas especies se produjo un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, medido como $\Delta F/F_0$ (%). Sin embargo, este incremento fue significativamente mayor ($P < 0,0001$) en espermatozoides humanos que en ovinos, en presencia de la misma concentración de calcio extracelular (10 mM).

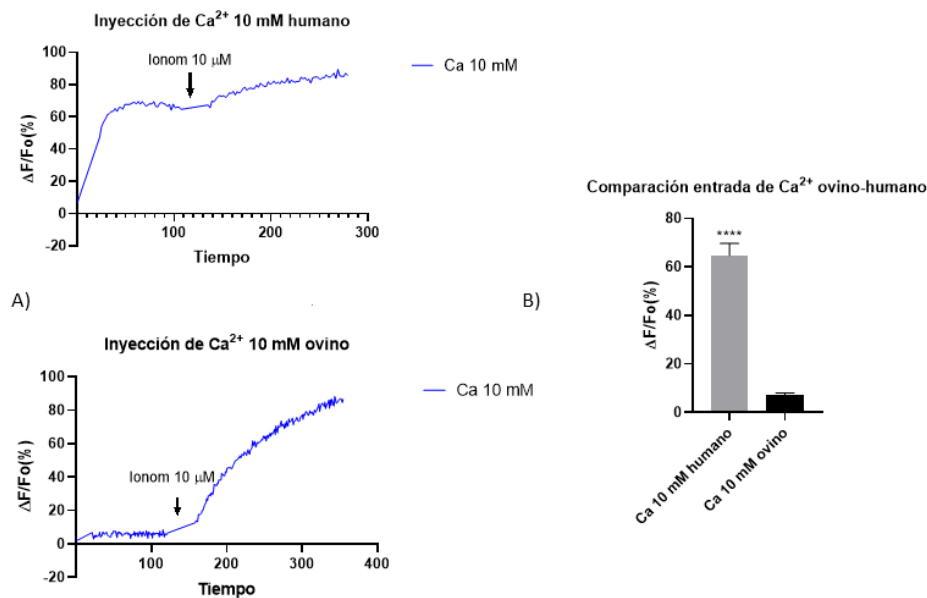


Figura 3. Efecto en los niveles de calcio intracelular de los espermatozoides tras su exposición a un medio rico en calcio. A) Gráficos representativos correspondientes a una de las repeticiones de los experimentos de exposición de los espermatozoides a medio mHTF (ovino) o HTF (humano) rico en calcio (10 mM). La cuantificación del incremento de calcio intracelular se expresa como la $\Delta F/F_0$ (%) emitida por el indicador fluorescente de calcio Fluo-4-AM respecto al tiempo (segundos). La línea del control negativo no se muestra. En los gráficos se señala el momento de la adición de ionomicina 10 μ M como control positivo. B) Representación de los resultados como la media \pm S.E.M. de los máximos incrementos de fluorescencia ($\Delta F/F_0$) de las repeticiones ($n=4$ en ovino y $n=2$ en humano). La existencia de diferencias significativas entre la entrada de calcio en ambas especies se señala como **** ($P<0,0001$).

La diferencia en la entrada de calcio en ambas especies puede deberse a que los canales de entrada de calcio, entre los que se encuentra CatSper, en espermatozoides ovinos se saturan antes y no permitan la entrada de tanto calcio en comparación con los espermatozoides humanos. Otra posibilidad es que el calcio introducido en los espermatozoides ovinos sea transportado rápidamente a los depósitos intracelulares por lo que la sonda no sería capaz de mostrar señal de ese calcio. Tampoco se puede descartar que, en los espermatozoides ovinos, ante una alta concentración de calcio intracelular, se activen rápidamente los mecanismos de salida de calcio como la bomba PMCA4 y los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ para tratar de mantener la homeostasis (50). Además, en espermatozoides humanos la entrada de calcio al citosol produce la liberación de calcio inducida por calcio (CICR, Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release) de los depósitos intracelulares, lo cual podría explicar el gran aumento del calcio citosólico observado (51).

5.2. Estudio del efecto de ESI-09 y H-89 en la entrada de calcio en espermatozoides ovinos y humanos

El objetivo de esta serie de experimentos fue estudiar si la presencia de inhibidores conocidos de CatSper en espermatozoides humanos, como son el ESI-09 y el H-89, evitaba la entrada de calcio observada tanto en espermatozoides humanos como en espermatozoides ovinos.

En el caso de espermatozoides humanos se observó (Fig. 4A y 4B, parte superior) que al incubar los espermatozoides con ESI-09 (20 μ M) y exponer los espermatozoides a una concentración de calcio extracelular de 10 mM se produjo un incremento de la concentración de calcio en el citosol de aproximadamente la mitad que en el caso de la inhibición con H-89 (20 μ M) o en el caso del control (sin inhibidores). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($P>0,05$), probablemente debido al bajo número de repeticiones experimentales ($n=2$). A pesar de ello, estos resultados

apuntarían a que ESI-09 es un inhibidor más eficaz de CatSper que el H-89, o que podría ser capaz de actuar, además, como inhibidor de otros canales de entrada de calcio. Además, ESI-09 es un inhibidor competitivo de las EPAC (proteínas de intercambio activadas por AMPc) (52) y estas proteínas participan en la movilización de calcio de los depósitos intracelulares (53), por lo que es posible que el menor incremento del calcio citoplásmico respecto al control y al uso de H-89 se deba también en parte a la reducción de la liberación de calcio de los depósitos intracelulares.

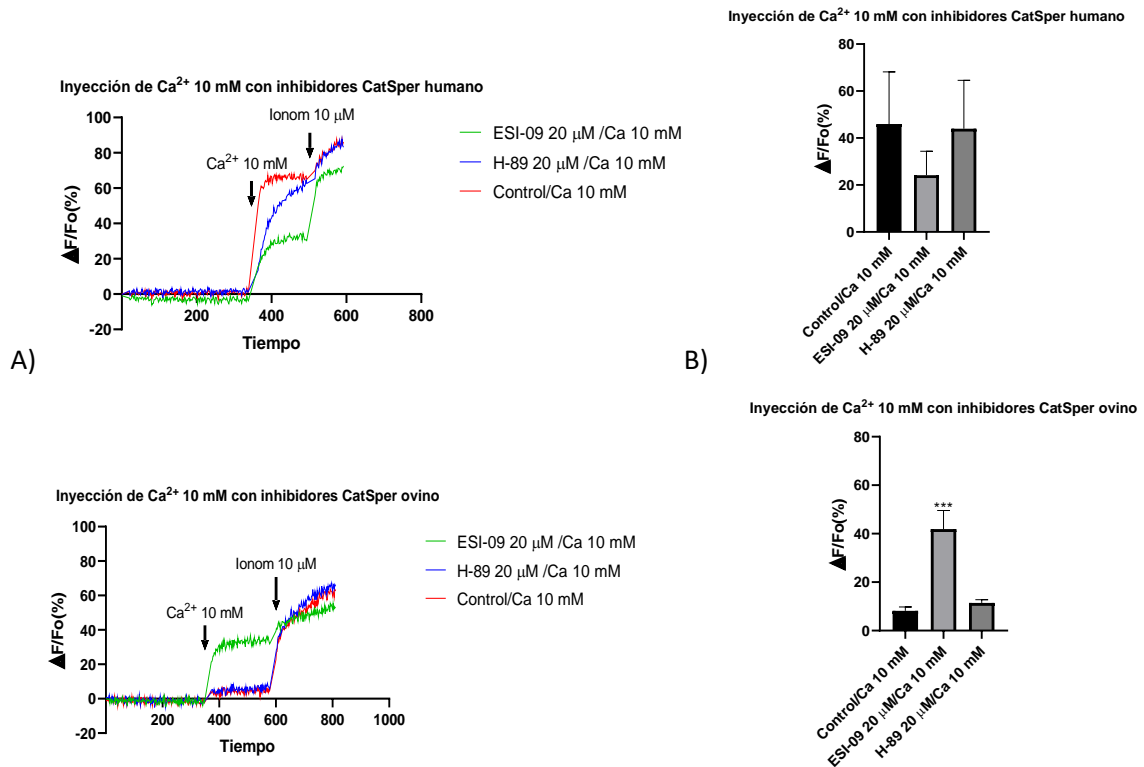


Figura 4. Efecto en la [Ca²⁺]_i de la exposición de los espermatozoides humanos y ovinos a medio rico en calcio en presencia de los inhibidores de CatSper humano ESI-09 y H-89. A) Gráficos representativos de una de las repeticiones de los experimentos de inyección de calcio 10 mM en presencia de los inhibidores conocidos de CatSper en humano ESI-09 y H-89 (20 μM). Se representa el incremento de calcio intracelular como ΔF/Fo (%) de Fluo-4-AM respecto al tiempo (segundos) en especie humana y especie ovina. En los gráficos se indica con flechas los momentos en los que se realiza la inyección de calcio 10 mM y la inyección de ionomicina 10 μM que sirve de control positivo. Los segundos iniciales en los que no hay incremento de fluorescencia, corresponden a los 5 minutos de incubación de los espermatozoides con los inhibidores. B) Representación de los resultados como la media ± S.E.M. de los máximos incrementos de fluorescencia de Fluo-4-AM de las repeticiones (n=5 en ovino y n=2 en humano). En ambos casos los datos presentan una distribución normal y se han analizado con un test ANOVA comparando los datos obtenidos de los experimentos con ESI-09 y H-89 con los datos obtenidos del control. La existencia de diferencias significativas entre la [Ca²⁺]_i al usar ESI-09 en ovino y el control se señala como *** (P<0,001)

Cabe destacar que en el caso de espermatozoides humanos en presencia de H-89, la entrada de calcio resultó retardada respecto al control, aunque terminó alcanzando valores similares.

Cuando se realizaron los mismos experimentos con espermatozoides ovinos expuestos a un medio con alta concentración de calcio (10 mM) (Fig. 5A y 5B, parte inferior), los resultados fueron sorprendentes, ya que la incubación con ESI-09 no sólo no inhibió la entrada de calcio, si no que dio lugar a una significativamente mayor entrada del mismo en comparación con el control (sin inhibidores) (P<0,001). Este resultado nos hizo sospechar que el ESI-09 20 μM podría ser tóxico para los espermatozoides ovinos, por lo que se realizaron tinciones con IP para estudiar si los espermatozoides conservaban la integridad de su membrana plasmática. Para comprobar que la tinción con IP funcionaba

correctamente, se utilizó saponina al 0,5% (v/v). En el Anexo I se muestra la curva dosis-respuesta realizada para determinar la concentración de este detergente en el ensayo.

Ni la exposición de los espermatozoides a ESI-09 ni a H-89 produjo un aumento en la señal de ioduro de propidio (Fig. 5), por lo que se descartó que estos compuestos provocaran daños en la membrana plasmática que justificaran el aumento de la señal de Fluo-4-AM. Sería necesario realizar más estudios para determinar si realmente se trata de un compuesto que potencia la entrada de calcio en espermatozoides ovinos o si el aumento de la señal de Fluo-4-AM es por otro motivo que desconocemos.

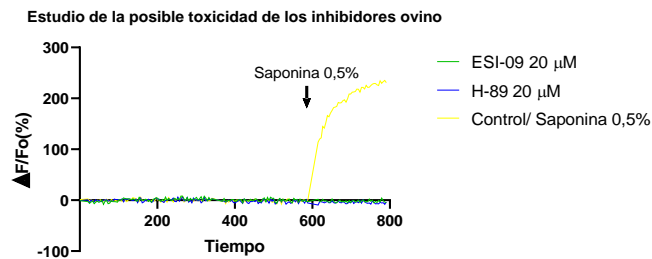


Figura 5. Gráfico representativo del incremento de señal de ioduro de propidio (IP) respecto al tiempo (segundos). La señal de IP aumenta al producirse una disrupción en la membrana plasmática de los espermatozoides que permita a la sonda entrar a la célula y unirse al ADN. En este caso, se puede ver como únicamente al inyectar saponina al 0,5% (v/v) como control positivo de daño de membrana se produjo un aumento de la señal de IP.

Por otro lado, el H-89 en espermatozoides ovinos no presentó efectos inhibitorios sobre CatSper (Fig. 4A y 4B, parte inferior), puesto que la señal de Fluo-4-AM captada fue similar en todo momento a la obtenida en el control. Esto puede explicarse por el hecho de que existen diferencias entre los canales CatSper de los espermatozoides de especie humana y ovina, que hacen que el compuesto con efectos inhibitorios en la especie humana no produzca los mismos efectos en la especie ovina.

5.3. Evaluación de la entrada basal de calcio en espermatozoides ovinos y humanos mediante la exposición a diferentes concentraciones de calmidazolium

Con esta serie de experimentos se pretendió estudiar la entrada basal de calcio a través de CatSper, sin activar los canales por ninguno de los tres mecanismos conocidos. Para ello se utilizó calmidazolium (CZ), un compuesto que disocia el complejo calcio-calmodulina, el cual es esencial para la activación de la bomba PMCA4, que expulsa Ca^{2+} del interior celular. De esta manera, al incubar los espermatozoides con calmidazolium se inhibe la salida de calcio por PMCA4.

Se puede observar (Fig. 6) como el calmidazolium ejerció un efecto dosis-dependiente en la $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides de ambas especies. Tanto en humano como en ovino, se alcanzaron $[Ca^{2+}]_i$ similares al incubar los espermatozoides con calmidazolium 10 μM (Fig. 6B). Sin embargo, al incubarlos con una concentración de 3 μM de calmidazolium, en la especie humana se obtuvo menor incremento de calcio intracelular que en la especie ovina. En ninguna de las especies las concentraciones de calmidazolium estudiadas produjeron rotura de la membrana plasmática (no se muestra gráfica).

En la especie humana se apreciaron diferencias significativas ($P < 0,0001$) entre las $[Ca^{2+}]_i$ obtenidas al incubar los espermatozoides con calmidazolium 10 μM y 3 μM. También se observaron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre las $[Ca^{2+}]_i$ medidas al incubar los espermatozoides con calmidazolium 3 μM y 1 μM. Por el contrario, en la especie ovina, pese a observarse una dependencia entre la concentración de calmidazolium y la cantidad de calcio intracelular, los resultados tras la medida del calcio fueron muy variables y no existieron diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones de

calmidazolium consecutivas (no había diferencias significativas entre el calcio intracelular medido al usar CZ 10 μM y 3 μM , pero sí entre usar CZ 10 μM y CZ 0,3 μM).

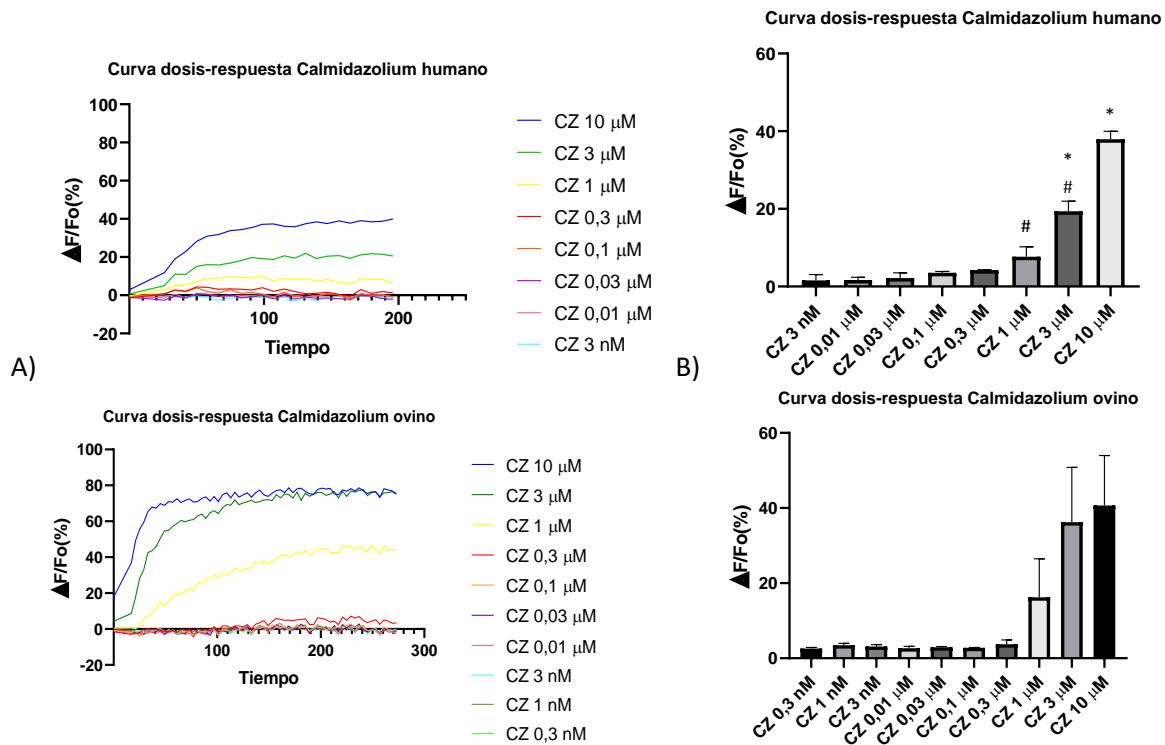


Figura 6. Efecto en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la incubación de los espermatozoides con diferentes concentraciones de calmidazolium. A) Gráficos representativos de los experimentos de incubación de los espermatozoides humanos y ovinos con calmidazolium. Se representa el incremento de calcio intracelular como $\Delta F/F_0$ (%) de Fluo-4-AM respecto al tiempo (segundos). El control negativo no se muestra. B) Representación de los resultados como la media \pm S.E.M. de los máximos incrementos de fluorescencia de las repeticiones (n=4 en ovino y n=2 en humano). En los experimentos en humano los datos presentan una distribución normal y se ha analizado mediante un test ANOVA de comparación múltiple la existencia de diferencias significativas en los niveles de calcio entre todas las concentraciones ensayadas de CZ (* P < 0,0001 entre las concentraciones marcadas; # P < 0,01 entre las concentraciones marcadas). En los experimentos en ovino los datos no presentan una distribución normal y han sido analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, sin apreciarse diferencias significativas entre concentraciones consecutivas.

5.4. Análisis del efecto de la combinación de la inhibición de CatSper y la inhibición de la bomba PMCA4 en espermatozoides ovinos y humanos

En este caso, se trató de inhibir CatSper (mediante ESI-09 y H-89) a la vez que la salida de Ca^{2+} por inhibición de la bomba PMCA4 (mediante calmidazolium) para analizar el efecto en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides de especie humana y especie ovina. La concentración de calmidazolium que se utilizó fue de 10 μM , puesto que se determinó en la serie de experimentos anteriores (Fig. 7) que es la concentración, de entre las estudiadas, que producía una mayor inhibición de PMCA4.

En la especie humana se apreció (Fig. 7) como la combinación de ESI-09 y calmidazolium produjo un menor incremento de calcio que la combinación de H-89 y calmidazolium y que el control (calmidazolium sin inhibidores de CatSper), lo cual concuerda con lo observado en anteriores experimentos (Fig. 4), donde se apreciaba que el ESI-09 era más eficaz inhibiendo la entrada de calcio que el H-89. En cuanto al estudio del H-89, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ medida al combinar la inhibición de CatSper con calmidazolium fue ligeramente menor a la obtenida en el control (Fig. 7), lo cual también concuerda con el ligero efecto inhibitorio de H-89 observado (Fig. 4). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (p>0,05), probablemente debido al escaso número de repeticiones experimentales (n=2).

Por otro lado, en la especie ovina se observó (Fig. 7) como, al contrario de lo que ocurría al incubar los espermatozoides con ESI-09 y exponerlos a una alta concentración de calcio (Fig. 4), en este caso el incremento de calcio intracelular observado fue significativamente menor que en el control y en el caso del uso de H-89 ($P < 0,01$). Esto puede deberse a que el gran incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ producido por la incubación de espermatozoides ovinos con ESI-09 en presencia de calcio (Fig. 4), sumado a la inhibición de la salida de calcio por PMCA4, ponga en marcha algún mecanismo de salida de calcio para regular la homeostasis de este catión. Además, el calmidazolium solo bloquea la salida de calcio por PMCA4, pero hay más vías de expulsión de calcio al medio extracelular, como los intercambiadores Na^+/Ca^{2+} y también hay bombas SERCA (Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico) que introducen el calcio del citosol a los depósitos intracelulares (54). También hay que tener en cuenta que el calmidazolium puede tener muchos otros efectos en el espermatozoide, además de la inhibición de PMCA4, como por ejemplo la inhibición de la desfosforilación de fosfotirosinas, en espermatozoides humanos (55), por lo que es probable desconozcamos otras implicaciones del calmidazolium en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$. En cuanto al H-89, se corroboró la idea de que no produce efectos inhibitorios en CatSper de espermatozoides ovinos, puesto que la $[Ca^{2+}]_i$ medida fue en todo momento similar a la obtenida en el control.

En ninguna de las especies las condiciones ensayadas han producido un aumento en la señal de yoduro de propidio, por lo que no existe daño a nivel de la membrana plasmática (no se muestra gráfica).

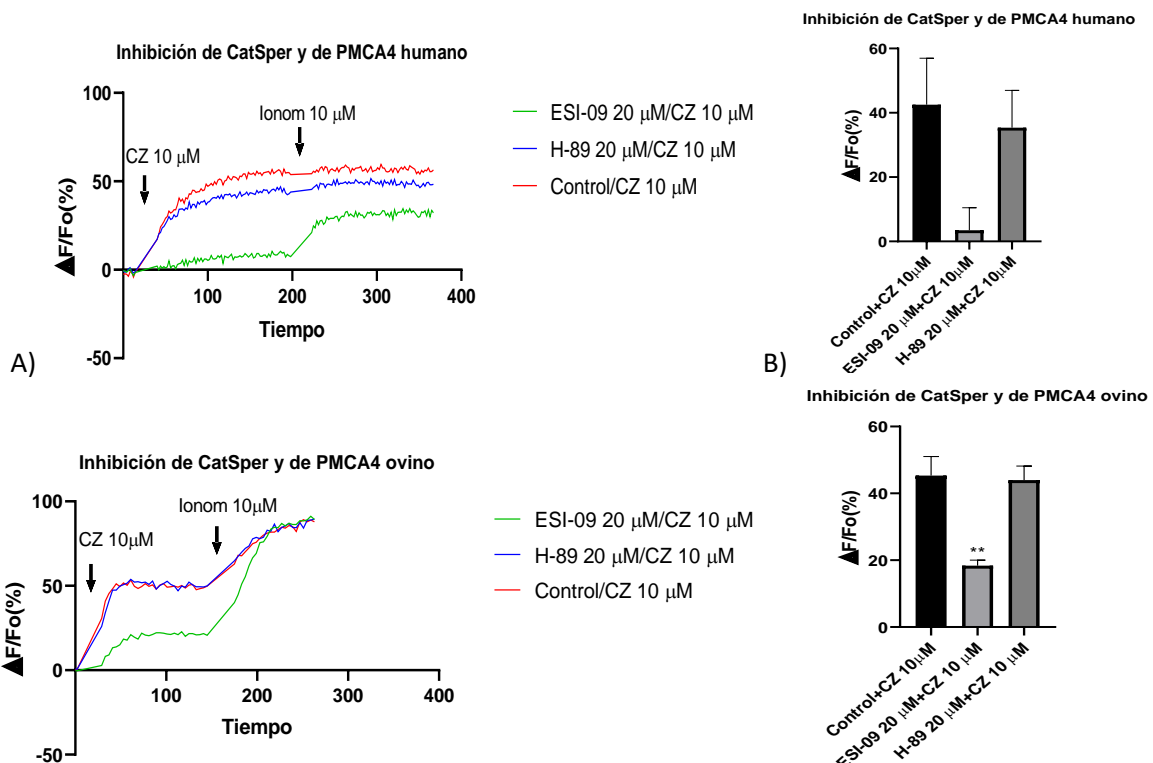


Figura 71. Efecto en la $[Ca^{2+}]_i$ de la combinación de la inhibición de CatSper y la inhibición de PMCA4. A) Gráficos representativos de una de las repeticiones de los experimentos de inyección de calmidazolium 10 μ M en presencia de ESI-09 y H-89. Se representa el incremento de calcio intracelular como $\Delta F/F_0$ (%) de Fluo-4-AM respecto al tiempo (segundos) en la especie humana y ovina. En los gráficos se indica con flechas los momentos en los que se realiza la inyección de calmidazolium 10 μ M y la inyección de ionomicina 10 μ M que sirve de control positivo. B) Representación de los resultados como la media \pm S.E.M. de los máximos incrementos de fluorescencia de Fluo-4-AM de las repeticiones ($n=4$ en ovino y $n=2$ en humano). En ambos casos los datos presentan una distribución normal y se han analizado con un test ANOVA comparando los datos obtenidos en los experimentos con ESI-09 y H-89 con los resultados obtenidos del control. La existencia de diferencias significativas entre la $[Ca^{2+}]_i$ medida al usar ESI-09 y calmidazolium respecto al control se indica como ** ($P < 0,01$).

5.5. Estudio del efecto de la alcalinización intracelular en la entrada de calcio en espermatozoides ovinos y humanos

La alcalinización intracelular es una de las formas de activación de CatSper conocidas en espermatozoides humanos (16). En estos experimentos se pretendió estudiar si la alcalinización intracelular mediante NH_4Cl producía también la activación de CatSper en espermatozoides ovinos.

En el caso de los experimentos en espermatozoides humanos se observó (Fig. 8) un efecto dosis-dependiente del NH_4Cl en el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenidos no fueron tan elevados como los descritos por otros grupos de investigación (56), probablemente debido a que en dichos grupos los donantes de muestra seminal fueron seleccionados en función de su calidad espermática y en nuestro caso los donantes fueron voluntarios, que podrían haber transportado la muestra en condiciones no ideales hasta el laboratorio, a pesar de las indicaciones recibidas. Aun así, todas las concentraciones ensayadas produjeron incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diferentes significativamente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ medida en el control ($P < 0,001$ con NH_4Cl 50 mM y NH_4Cl 33,3 mM, $P < 0,01$ con NH_4Cl 16,7 mM, $P < 0,05$ con NH_4Cl 8,3 mM).

Por otro lado, en los experimentos en espermatozoides ovinos, no se apreció (Fig. 8) una relación clara entre la concentración de NH_4Cl y el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenido al incubar los espermatozoides con NH_4Cl 50 mM respecto al control, aunque dicho incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no superó el 5%. Estos resultados apuntarían a que la alcalinización intracelular por sí sola sea no sería capaz de producir la activación de CatSper. Esto concordaría con resultados de otros grupos de investigación que demuestran que, en espermatozoides ovinos, la concentración de calcio intracelular no se modifica mediante cambios en el pH intracelular solamente (57).

En ninguna de las especies, la incubación de los espermatozoides con las concentraciones de NH_4Cl estudiadas supuso un aumento en la señal de yoduro de propidio, por lo que no se produjo daño a nivel de la membrana plasmática (no se muestra gráfica).

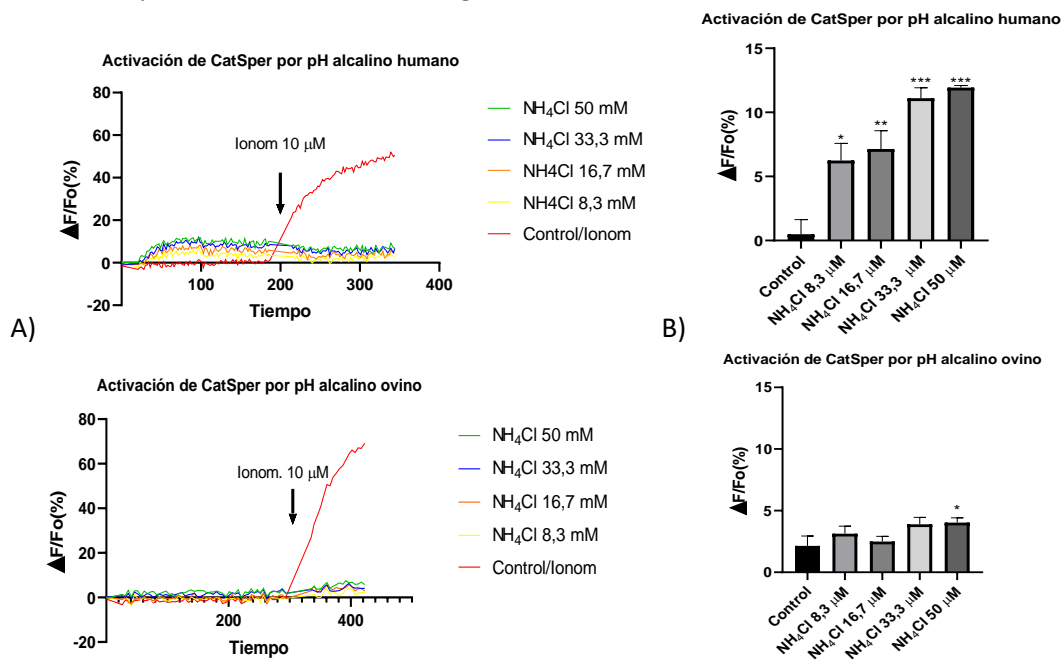


Figura 8. Efecto en la $[Ca^{2+}]_i$ de la alcalinización intracelular producida por la incubación de los espermatozoides con NH_4Cl . A) Gráficos representativos de una de las repeticiones de los experimentos de inyección de diferentes concentraciones de NH_4Cl . Se representa el incremento de calcio intracelular como $\Delta F/F_0$ (%) de Fluo-4-AM respecto al tiempo (segundos) en especie humana y especie ovina. En los gráficos se señala con una flecha el momento en el que se realiza la inyección de ionomicina 10 μM en los pocillos control. B) Representación de los resultados como la media \pm S.E.M. de los máximos incrementos de fluorescencia de Fluo-4-AM de las repeticiones ($n=4$ en ovino y $n=2$ en humano). En ambos casos los datos presentan una distribución normal y se han analizado con un test ANOVA comparando los datos obtenidos con cada concentración de NH_4Cl con el control antes de la inyección de ionomicina. La existencia de diferencias significativas entre $[Ca^{2+}]_i$ medida al incubar los espermatozoides con NH_4Cl y el control se señalan ***($P < 0,001$), **($P < 0,01$) y * ($P < 0,05$).

Con el objetivo de comprobar que el NH_4Cl estaba produciendo la alcalinización intracelular de los espermatozoides, se llevó a cabo una tinción con BCECF 5 μM . Los resultados mostraron (Fig. 9) como en ambas especies se produjo un incremento del pH intracelular al incubar los espermatozoides con las distintas concentraciones de NH_4Cl .

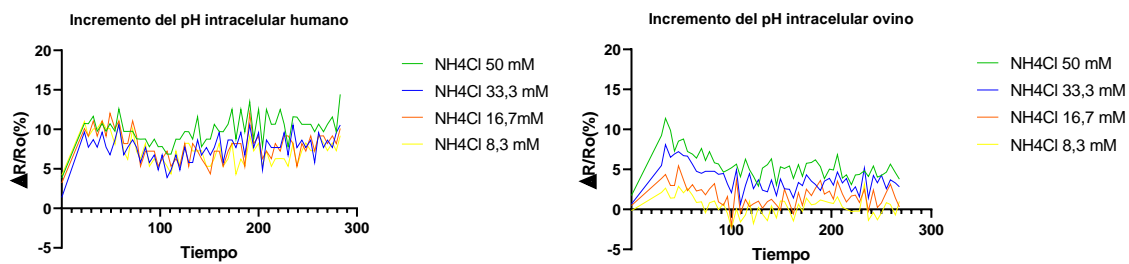


Figura 9. Control del incremento de pH intracelular al incubar los espermatozoides con diferentes concentraciones de NH_4Cl en especie humana (izquierda) y ovina (derecha). El incremento de pH intracelular se representa como $\Delta R/R_0$ (%) respecto al tiempo (segundos) en ambos casos.

5.6. Evaluación del efecto de la despolarización de membrana plasmática en la entrada de calcio en espermatozoides ovinos y humanos

En estos experimentos se estudió la activación de CatSper por despolarización de la membrana plasmática, otro de los mecanismos de activación descritos. Para ello se incubaron los espermatozoides humanos y ovinos en medio alcalino (pH 8) con elevada concentración de K^+ , ya que, según resultados de otros grupos de investigación, la entrada de calcio dependiente de despolarización es mayor si el pH del medio extracelular es alcalino (58).

En espermatozoides humanos se apreció (Fig. 10) un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ dependiente de la concentración de KCl en el medio a pH 8, aunque solo con la concentración más elevada (135 mM) se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($P < 0,01$). Los resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos de investigación (58). Por otro lado, se ha descrito que ratones *knockout* para CatSper1 no experimentan una entrada de calcio dependiente de despolarización, por lo que se confirma que, también en esta especie, la entrada de calcio se produce a través de CatSper en estas condiciones (59).

En espermatozoides ovinos también se evidenció (Fig. 10) un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ dependiente de la concentración de KCl en el medio a pH 8 ($P < 0,05$ entre KCl 135 mM y el control), pero menor que el observado en espermatozoides humanos en las mismas condiciones. Los resultados corroboran lo propuesto por otros grupos (57), que señalan que el tratamiento de espermatozoides ovinos con un medio alcalino con alta concentración de K^+ produce un incremento de calcio intracelular y del pH intracelular consecuencia de la despolarización de la membrana.

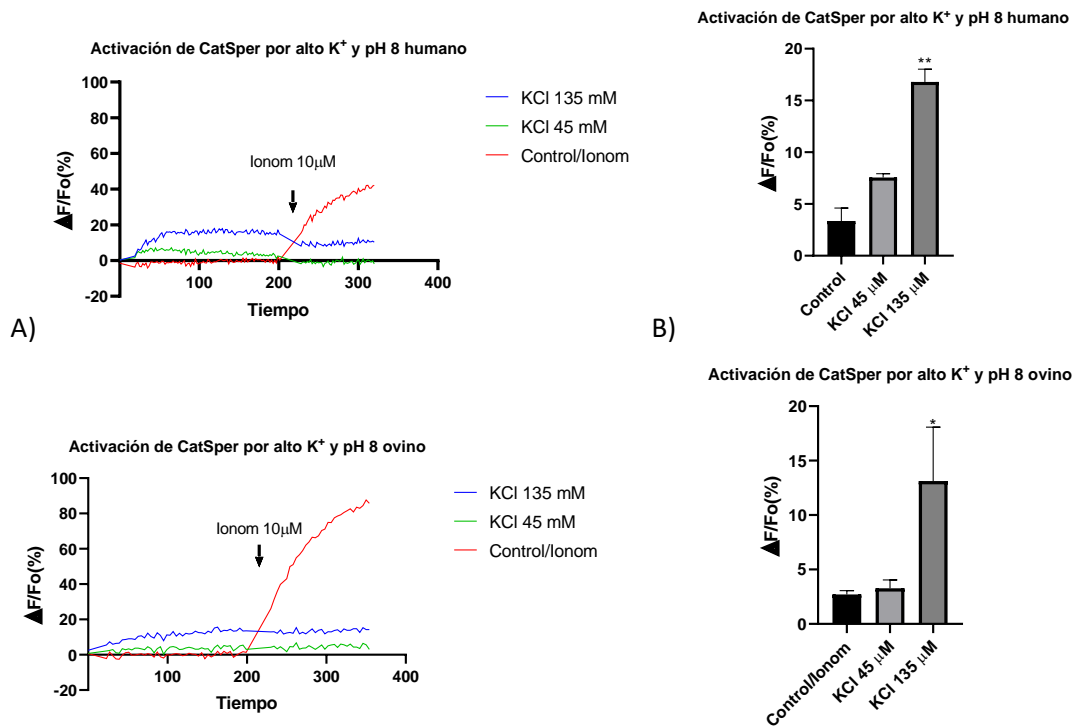


Figura 10. Efecto en la $[Ca^{2+}]_i$ de la despolarización de membrana producida por la incubación de los espermatozoides con altas concentraciones de K⁺ y pH 8. A) Gráficos representativos de una de las repeticiones de los experimentos de inyección de KCl 135 mM y 45 mM. Se representa el incremento de calcio intracelular como $\Delta F/Fo$ (%) de Fluo-4-AM respecto al tiempo (segundos) en especie humana y especie ovina. En los gráficos se señala con una flecha el momento en el que se realiza la inyección de ionomicina 10 μM en los pocillos control. B) Representación de los resultados como la media \pm S.E.M. de los máximos $\Delta F/Fo$ (%) de Fluo-4-AM de las repeticiones (n=5 en ovino y n=2 en humano). En los experimentos en humano los datos presentan una distribución normal y se ha analizado mediante un test ANOVA de comparación múltiple la existencia de diferencias significativas en los niveles de calcio entre las concentraciones ensayadas de KCl y el control antes de la inyección de ionomicina. La existencia de diferencias significativas respecto al control se señala con ** (P < 0,01). En los experimentos en ovino los datos no presentan una distribución normal y han sido analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. La existencia de diferencias significativas respecto al control se señala con * (P < 0,05).

Para comprobar si la despolarización de membrana producida por el tratamiento con elevado K⁺ había producido la alcalinización intracelular de los espermatozoides, se llevó a cabo una tinción con BCECF 5 μM . Los resultados mostraron (Fig. 11) que en la especie ovina se produjo un claro incremento del pH intracelular dependiente de la concentración de KCl utilizada en un medio a pH 8. En espermatozoides humanos no se ha podido demostrar que se produzca incremento del pH intracelular. Se requerirían más experimentos para confirmar si en espermatozoides humanos la despolarización de membrana con altas concentraciones de K⁺ produce incrementos en la entrada de calcio sin aumentar el pH intracelular.

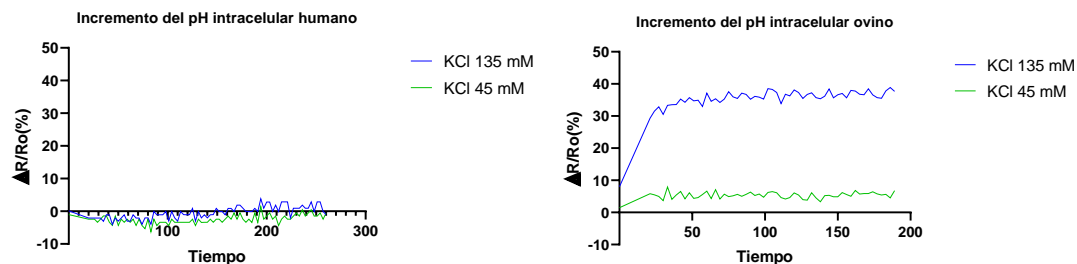


Figura 11. Control del incremento de pH intracelular al incubar los espermatozoides con diferentes concentraciones de KCl en especie humana (izquierda) y ovina (derecha). El incremento de pH intracelular se representa como $\Delta R/Ro$ (%) respecto al tiempo (segundos) en ambos casos.

En ninguna de las especies las condiciones ensayadas produjeron un aumento en la señal de ioduro de propidio (no se muestra gráfica).

5.7. Efecto de la progesterona en los niveles de calcio intracelular en espermatozoides ovinos y humanos

El objetivo de este experimento fue estudiar si la progesterona es capaz de activar el canal CatSper en espermatozoides ovino, al igual que se ha descrito en espermatozoides humanos. Para ello se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de progesterona (0,3 nM a 10 μ M en humano y 0,03 μ M a 10 μ M en ovino) en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides humanos y ovinos.

En los experimentos en espermatozoides humanos se apreció (Fig. 12) un inmediato incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ dependiente de la concentración de progesterona en el medio. Se observaron diferencias significativas en los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ producidos por las concentraciones más elevadas de progesterona (10 μ M y 3 μ M) respecto al control ($P < 0,05$). Al igual que ocurría con la activación por alcalinización intracelular, los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ fueron menores que los alcanzados en experimentos de otros grupos de investigación (56), lo cual puede deberse a diferencias de calidad o estado de la muestra seminal de trabajo, ya que el control positivo con ionomicina 10 μ M tampoco produjo un gran aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. A pesar de ello, los resultados de este TFG corroboran que la progesterona induce la entrada de calcio a través de CatSper en espermatozoides humanos (56).

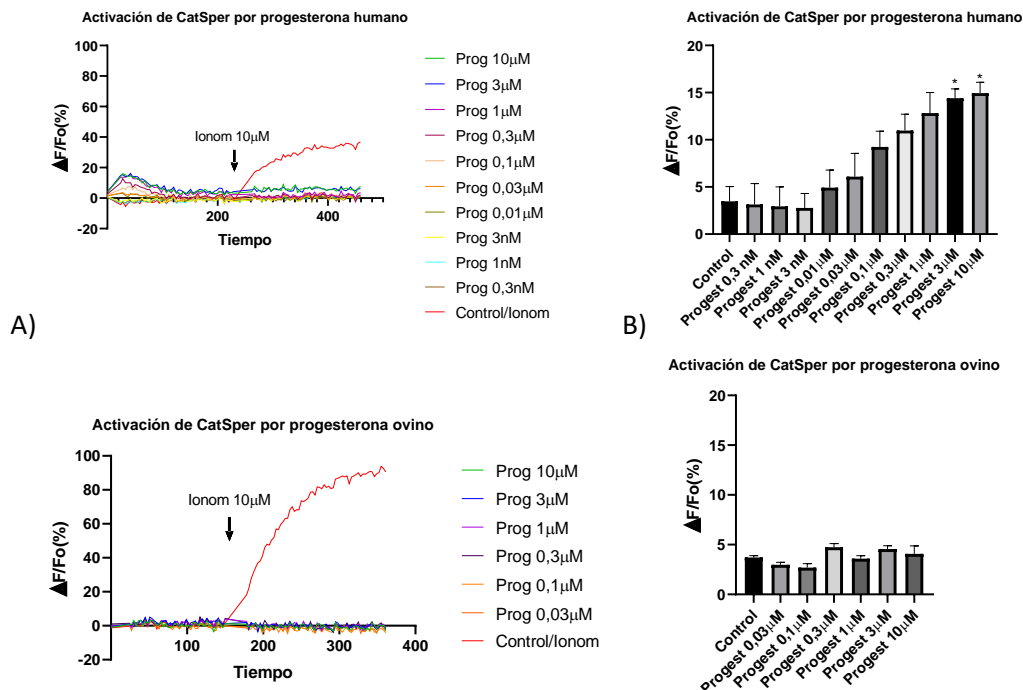


Figura 12. Efecto en la $[Ca^{2+}]_i$ de la exposición de espermatozoides humanos y ovinos a diferentes concentraciones de progesterona. A) Gráficos representativos de una de las repeticiones de los experimentos de inyección de diferentes concentraciones de progesterona. Se representa el incremento de calcio intracelular como $\Delta F/F_0$ (%) de Fluo-4-AM respecto al tiempo (segundos) en especie humana y especie ovina. En los gráficos se señala con una flecha el momento en el que se realiza la inyección de ionomicina 10 μ M en los pocillos control. B) Representación de los resultados como la media \pm S.E.M. de los máximos incrementos de fluorescencia de Fluo-4-AM de las repeticiones ($n=2$ en ovino y $n=2$ en humano). En los experimentos en humano los datos no presentan una distribución normal y han sido analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. La existencia de diferencias significativas respecto al control se indica como * ($P < 0,05$). En los experimentos en ovino los datos presentan una distribución normal y se han analizado mediante un test ANOVA de comparación múltiple, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los efectos en el calcio intracelular de la progesterona y el control.

En contraposición, no se observó (Fig. 12) ningún incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ al exponer los espermatozoides ovinos a diferentes concentraciones de progesterona. Estos resultados indicarían que el canal CatSper ovino no es activado por unión a progesterona, igual que tampoco ocurre en otras especies como el ratón (27).

6. CONCLUSIONES

1. Los espermatozoides ovinos acumulan mucha menos cantidad de calcio en el citosol que los espermatozoides humanos al ser expuestos a un medio extracelular con Ca^{2+} 10 mM.
2. El inhibidor de CatSper ESI-09, no sólo no inhibe la entrada de calcio en los espermatozoides ovinos, a diferencia de lo observado en espermatozoides humanos, si no que da lugar a un incremento en la concentración de calcio intracelular. En cambio, el inhibidor H-89 no ejerce ningún efecto observable en la entrada de calcio en espermatozoides ovinos, aunque en espermatozoides humanos se produce un incremento retardado de la concentración de calcio intracelular.
3. En los espermatozoides de ambas especies, ovino y humano, se producen valores similares de entrada basal de calcio cuando no se activa específicamente CatSper y no hay elevada concentración de calcio en el medio extracelular.
4. De los métodos de activación de CatSper estudiados, solo la despolarización de membrana plasmática usando un medio con alta concentración de K^+ y pH 8, da lugar a un incremento de calcio intracelular en espermatozoides ovinos, mientras que en espermatozoides humanos los tres métodos de activación de CatSper estudiados producen un incremento de calcio intracelular.

CONCLUSIONS

1. Ram spermatozoa accumulate much less calcium in the cytosol than human spermatozoa when exposed to an extracellular medium with Ca^{2+} 10 mM.
2. The CatSper inhibitor ESI-09 not only is unable to inhibit the calcium entry in ram sperm, unlike that observed in human sperm, but it leads to an increase in intracellular calcium concentration. In contrast, inhibitor H-89 has no significant effect on calcium entry in ram spermatozoa, although a delayed increase in intracellular calcium concentration occurs in human sperm.
3. In spermatozoa of both species, ovine and human, similar values of basal calcium entry are produced when CatSper is not specifically activated and there is no high concentration of calcium in the extracellular medium.
4. Among the CatSper activation methods studied, only the depolarization of the plasma membrane using a medium with a high concentration of K^+ and pH 8, produce an increase in intracellular calcium in ram sperm, while in human sperm the three methods of activation produce an increase in intracellular calcium.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Eisenbach M. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev Genet.* 1999;25(2):87–94.
2. Olivera M, Agr S, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. El espermatozoide , desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 2006;19(4):426–36.
3. E Baldi 1, M Luconi, L Bonaccorsi, C Krausz GF. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. Vol. 388, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library Biosci.* 1996. p. 539–47.
4. Jaiswal JK. Calcium-how and why? *J Biosci |.* 2001;26(3):357–63.
5. Alvarez L, Dai L, Friedrich BM, Kashikar ND, Gregor I, Pascal R, et al. The rate of change in Ca²⁺ concentration controls sperm chemotaxis. *Journal of Cell Biology.* 2012;196(5):653–63.
6. Navarro B, Kirichok Y, Chung JJ, Clapham DE. Ion Channels that Control Fertility in Mammalian Spermatozoa. *Int J Dev Biol* 52: 2008; 607-613
7. Publicover SJ, Giojalas LC, Teves ME, de Oliveira GSMMH, Garcia AAM, Barratt CLR, et al. Ca²⁺ signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Front Biosci.* 2008; 5623-5637
8. Costello S, Michelangeli F, Nash K, Lefievre L, Morris J, Machado-Oliveira G, et al. Ca²⁺-stores in sperm: Their identities and functions. *Reproduction.* 2009 Sep;138(3):425–37.
9. Bagur R, Hajnóczky G. Intracellular Ca²⁺ sensing: role in calcium homeostasis and signaling. *Mol Cell.* 2017; 66(6):780.
10. Walensky LD, Snyder SH. Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors Selectively Localized to the Acrosomes of Mammalian Sperm.
11. Ho HC, Suarez SS. Characterization of the Intracellular Calcium Store at the Base of the Sperm Flagellum That Regulates Hyperactivated Motility 1. *Biol Reprod.* 2003; 68:1590–6.
12. Storey BT, Keyhani E. INTERACTION OF CALCIUM ION WITH THE MITOCHONDRIA OF RABBIT SPERMATOZOA. 1973;37(1).
13. Lishko P v, Mannowetz N. CatSper: A Unique Calcium Channel of the Sperm Flagellum.
14. Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, et al. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Jul 2;279(27):28220–6.
15. Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, et al. Catsper3 and Catsper4 Are Essential for Sperm Hyperactivated Motility and Male Fertility in the Mouse 1. *Biol Reprod.* 2007; 77:37–44.
16. Rahban R, Nef S. CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol.* 2020 Dec 1;518:110951.
17. Tamburrino L, Marchiani S, Minetti F, Forti G, Muratori M, Baldi E. The CatSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. *Hum Reprod.* 2014; 29(3):418–28.
18. Sun X hong, Zhu Y ying, Wang L, Liu H ling, Ling Y, Li Z li, et al. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2017 15:1. 2017; 15(1):1–12.
19. Babcock DF. Wrath of the wraiths of CatSper3 and CatSper4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 1;104(4):1107.
20. Singh AP, Rajender S. CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online.* 2014; 30:28–38.

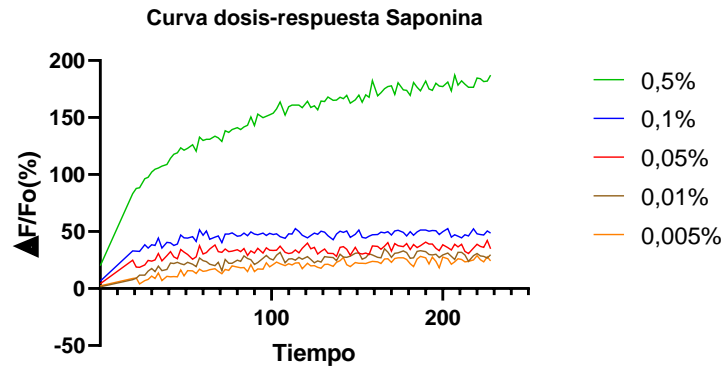
21. Hwang JY, Mannowetz N, Zhang Y, Everley RA, Gygi SP, Bewersdorf J, et al. Dual Sensing of Physiologic pH and Calcium by EFCAB9 Regulates Sperm Motility. *Cell*. 2019 May 5; 177(6):1480.
22. Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Oct 23; 98(22):12527–31.
23. Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* 2006 439:7077. 2006 Feb 9;439(7077):737–40.
24. Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, et al. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 2011 471:7338. 2011 Mar 16; 471(7338):382–6.
25. Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, et al. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science* (1979). 2016 Apr 29;352(6285):555–9.
26. Lishko P v., Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* 2011 471:7338. 2011 Mar 16;471(7338):387–91.
27. Sumigama S, Mansell S, Miller M, Lishko P v., Cherr GN, Meyers SA, et al. Progesterone accelerates the completion of sperm capacitation and activates catsper channel in spermatozoa from the rhesus macaque. *Biol Reprod*. 2015 Dec 1;93(6):1–11.
28. Wang D, King SM, Quill TA, Doolittle LK, Garbers DL. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ Exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol*. 2003;5.
29. Lishko P v., Kirichok Y. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol*. 2010 Dec ; 588(Pt 23):4667.
30. Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. Shedding Light on Sperm phertility. *Cell*. 2010 Feb 5;140(3):310–2.
31. Peralta-Arias RD, Vivenes CY, Camejo MI, Piñero S, Proverbio T, Martínez E, et al. ATPases, ion exchangers and human sperm motility. *Reproduction*. 2015 May 1;149(5):475–84.
32. Nowicka-Bauer K, Szymczak-Cendlak M. Structure and Function of Ion Channels Regulating Sperm Motility—An Overview. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 2;22(6).
33. Schreiber M, Wei A, Yuan A, Gaut J, Saito M, Salkoff L. Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1998 Feb 6;273(6):3509–16.
34. Olivera M, Agr S, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. El espermatozoide , desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2006;19(4):426–36.
35. Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol*. 2002 Jan 1;53(1–2):133–50.
36. Visconti PE, Krapf D, de La Vega-Beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*. 2011 May;13(3):395.
37. P. Talbot, R. G. Summers, B. L. Hylander, E. M. Keough LEF. The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A23187. *J Exp Zool*. 1976;62(663):121–42.
38. Marquez B, Suarez SS. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline-Stimulated Ca²⁺ Influx. *Biol Reprod*. 2007 Apr 1;76(4):660–5.
39. Alasmari W, Costello S, Correia J, Oxenham SK, Morris J, Fernandes L, et al. Ca²⁺ Signals Generated by CatSper and Ca²⁺ Stores Regulate Different Behaviors in Human Sperm * □ S. 2013;
40. Mortimer D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod Fertil Dev*. 1994 Jan 1;6(1):25–31.
41. Alquézar-Baeta C, Gimeno-Martos S, Miguel-Jiménez S, Santolaria P, Yániz J, Palacín I, et al. OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS Comput Biol*. 2019 ;15(1):e1006691.

42. Vasan SS. Semen analysis and sperm function tests: How much to test? *Indian J Urol*. 2011 Jan;27(1):41.
43. Ollero M, Muiño-Blanco T, López-Pérez MJ, Cebrián-Pérez JA. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int J Androl*. 1996;19(5):287–92.
44. Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nuñez RC, Heyner S, Caballero PP, et al. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum Reprod* . 1993;8(7):1087–92.
45. García-López N, Ollero M, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology*. 1996 Jul 1;46(1):141–51.
46. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical Calcium Indicators. *Methods* . 2008 Nov;46(3):143.
47. Wang T, Young S, Krenz H, Tüttelmann F, Röpke A, Krallmann C, et al. The Ca²⁺ channel CatSper is not activated by cAMP/PKA signaling but directly affected by chemicals used to probe the action of cAMP and PKA. *J Biol Chem* . 2020 Sep 9 ;295(38):13181.
48. Mata-Martínez E, José O, Torres-Rodríguez P, Solís-López A, Sánchez-Tusie AA, Sánchez-Guevara Y, et al. Measuring Intracellular Ca²⁺ Changes in Human Sperm using Four Techniques: Conventional Fluorometry, Stopped Flow Fluorometry, Flow Cytometry and Single Cell Imaging. *J Vis Exp* . 2013;(75):50344.
49. Strehler EE. Plasma Membrane Calcium ATPases as Novel Candidates for Therapeutic Agent Development. 2013;
50. Peralta-Arias RD, Vivenes CY, Camejo MI, Piñero S, Proverbio T, Martínez E, et al. ATPases, ion exchangers and human sperm motility. *Reproduction*. 2015;149(5):475–84.
51. Correia J, Michelangeli F, Publicover S. Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm. 2003;
52. Zhu Y, Chen H, Boulton S, Mei F, Ye N, Melacini G, et al. Biochemical and Pharmacological Characterizations of ESI-09 Based EPAC Inhibitors: Defining the ESI-09 “Therapeutic Window.” *Sci Rep*. 2015;5:1–8.
53. Miro-Moran A, Jardin I, Ortega-Ferrusola C, Salido GM, Peña FJ, Tapia JA, et al. Identification and Function of Exchange Proteins Activated Directly by Cyclic AMP (Epac) in Mammalian Spermatozoa. *PLoS One* . 2012 May 25;7(5):e37713.
54. Lawson C, Dorval V, Goupil S, Leclerc P. Identification and localisation of SERCA 2 isoforms in mammalian sperm. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(5):307–16.
55. Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, et al. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: Identification of A Kinase Anchor Proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol*. 1996;180(1):284–96.
56. Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, et al. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 2011 471:7338 .
57. Babcock DF, Pfeiffer DR. Independent elevation of cytosolic [Ca²⁺] and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. *J Biol Chem*. 1987;262(31):15041–7.
58. Fraire-Zamora JJ, González-Martínez MT. Effect of intracellular pH on depolarization-evoked calcium influx in human sperm. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(6 56-6):1688–96.
59. Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, et al. CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(25):14864–8.

8. ANEXOS

ANEXO I. Curva dosis respuesta de saponina

Se realizó una curva dosis respuesta de saponina para determinar la concentración adecuada a la que cargar la saponina para utilizarla como control positivo de los experimentos en los que se usó ioduro de propidio como sonda para estudiar la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Se decidió finalmente utilizar la concentración de saponina 0,5% (v/v) por ser la que proporcionó una señal de fluorescencia mayor.



Anexo I. Gráfico de la curva dosis respuesta de saponina. Se representan los incrementos en la señal de ioduro de propidio ($\Delta F/F_o$ (%)) respecto al tiempo (segundos) a diferentes concentraciones de saponina.