



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Biológicas

**Dinámica del calcio intracelular en respuesta a pulsos despolarizantes
en espermatozoides de humano**

TESIS

**Para obtener el título de
Licenciada en Biotecnología**

Presenta:

Mariam Gasga Tehuintle

Directora:

M. en C. Paulina Torres Rodríguez

Codirector:

Dr. Juan Carlos Flores Alonso

H. Puebla de Zaragoza

Mes septiembre, año 2025

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de "Consortio de fisiología del Espermatozoide" del Departamento de Biología del Desarrollo y Fisiología molecular en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), (Cuernavaca, Morelos), bajo la asesoría de la M. en C. Paulina Torres Rodríguez. Para la realización de la tesis recibí el apoyo de la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz y recibí una beca el donativo PAPIIT / IN215425, titulado Estudio comprehensivo de la capacitación espermática: posibles predictores de la infertilidad.

El jurado revisor de este trabajo está conformado por:

D.C. Angelica Trujillo Hernández (Presidente)

D.C. Maria Reyna Fuentes Morales (Secretario)

M.C. Paulina Torres Rodríguez (Vocal)

Agradecimientos

Profesionales

Laboratorio:

Encargados

Dr. Alberto Darszon Israel, Dr. Takuya Nishigaki y Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz, Dr. Julio César Chávez Zamora, Dr. Ignacio López González, Dra. María del Carmen Beltrán Núñez

Apoyo técnico

Biol. José Luis de la Vega Beltrán, Dra. Yoloxochitl Sánchez Guevara, Miguel Ángel Trujillo González, Lic. Antonio Blancas

Microscopia:

Dr. Iván Oseguera López

Laboratorio Nacional para la Producción y Análisis de Moléculas y Medicamentos Biotecnológicos (LAMMB):

Dra. Mabel Rodriguez Gonzalez

Dra. Roberta Salinas Marin

Lic. Maricela Olvera Rodriguez

Ing. Luis Alberto Díaz Díaz

Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada:

Dr. Christopher David Wood

Biblioteca:

B.A. Dip.Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth

L.I. Jesús Omar Arriaga Pérez

Unidad de cómputo:

M. en T.I. Juan Manuel Hurtado Ramírez

Ing. Roberto Rodríguez Bahena

Ing. Arturo Ocádiz Ramírez

MEM David Santiago Castañeda Carreón

Mtro. Servando Aguirre Cruz

Lic. Berenice Peña Hernández

Personales

A mi tutora, la M.C. Paulina Torres Rodríguez, por todo su apoyo y acompañamiento en la elaboración de este trabajo. Le agradezco profundamente por enseñarme y brindarme el ejemplo de la dedicación y el compromiso en un proyecto. La admiro no solo en su faceta profesional, sino también en lo personal, como madre y amiga.

A la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme un espacio para aprender y crecer. Le agradezco no solo por permitirme desarrollar este proyecto, sino también por confiar en mí y ofrecerme la oportunidad de continuar mis estudios de maestría bajo su guía.

A mis padres cuyo esfuerzo me ha permitido concretar mis estudios fuera de casa, por su apoyo emocional a la distancia.

A mis hermanos que me motivaron a crecer y cuyo ejemplo lleve siempre presente en esta etapa.

A mi pareja por su amor y apoyo incondicional, por tener siempre confianza en mí, inclusive cuando yo no la tenía.

Índice.

1.RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 ESPERMATOZOIDE.....	3
2.1.1 Estructura.....	3
2.1.2 Cambios en la movilidad.....	4
2.1.3 Capacitación.....	5
2.1.4 Reacción acrosomal.....	6
3. ANTECEDENTES	7
3.1 IMPORTANCIA DEL Ca^{2+} EN EL ESPERMATOZOIDE.....	7
3.2 CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN LA DINÁMICA DEL $(Ca^{2+})_i$	8
3.2.1 GENERALIDADES DE CANALES DE Ca^{2+}	8
3.2.1.1 CatSper.....	8
3.2.1.2 Canales Cav.....	9
3.2.2 GENERALIDADES DE CANALES DE K^+ EN EL ESPERMATOZOIDE	10
3.2.2.1 FAMILIA DE CANALES SLO.....	10
3.3 TRANSITORIOS DE $(Ca^{2+})_i$ POR PULSOS DEPOLARIZANTES	11
3.4 INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE LA SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} COMO APROXIMACIÓN FUNCIONAL	12
3.5 INFLUENCIA DEL ESTILO DE VIDA EN LA SEÑALIZACIÓN DE CALCIO	13
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. OBJETIVOS.....	15
5.1. GENERALES.	15
5.2. ESPECÍFICOS.	15
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	15
6.1. MEDIOS EMPLEADOS.....	15
6.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	16
6.3 INCORPORACIÓN DE COLORANTES FLUORESCENTES	16
6.4. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS.....	18
6.5. MEDICIONES DE CALCIO MEDIANTE EL USO DE ESPECTROFLUOROMETRÍA	19
6.6. MEDICIONES DE CALCIO Y POTENCIAL DE MEMBRANA MEDIANTE EL USO DE CITOMETRÍA DE FLUJO	19
6.7. MEDICIONES DE CALCIO MEDIANTE EL USO DE MICROSCOPÍA	20
6.8 EVALUACIÓN DEL ESTILO DE VIDA	20
6.9. ANÁLISIS DE DATOS	21
6.9.1 Espectrofluorometría.....	21
6.9.2 Citometría de flujo.....	22
6.9.2.1 Calculo de Tau up, Tau down, tiempo de respuesta y amplitud	23
6.9.2.2 Calculo del potencial de membrana	24
6.9.3 Microscopía	25
7. RESULTADOS	26

7.1 PRESENCIA DE INCREMENTOS TRANSITORIOS EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE CALCIO INTRACELULAR EN ESPERMATÓZOIDES TRAS LA ADICIÓN ESCALONADA CON KCL	27
7.2 INHIBIDORES ESPECÍFICOS REDUCEN LA AMPLITUD DE LOS TRANSITORIOS DE CALCIO INDUCIDOS POR KCL.	29
7.3 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA Y SU ASOCIACIÓN CON LOS TRANSITORIOS DE Ca^{2+} DURANTE LA CAPACITACIÓN.	37
7.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN EN REGIONES ESPECÍFICAS DEL ESPERMATÓZOIDE	40
7.5 RELACIÓN DE LOS TRANSITORIO DE Ca^{2+} CON EL ESTILO DE VIDA	44
8. DISCUSIÓN.	48
9. CONCLUSIONES.....	54
10. PERSPECTIVAS	55
11. BIBLIOGRAFÍA.	62

Abreviaturas

[Ca²⁺]_i – Concentración intracelular de calcio
AMPc / cAMP – Adenosín monofosfato cíclico
BSA – Albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin*)
CaV– canales de calcio dependientes de voltaje
CbTX – Caribdotoxina
DiSC₃(5) – ,3'-Dipropylthiadicarbocyanine Iodide
DMSO – Dimetilsulfóxido
FIV– Fecundación *In Vitro*
FSC-A– área de dispersión frontal
FSC-H- altura de dispersión frontal
IbTX – Iberiotoxina
ICSI – Inyección intracitoplasmática de espermatozoide
IL-6 – Interleucina 6
IP₃R – Receptor de inositol trifosfato
KCl – Cloruro de potasio
LH – Hormona luteinizante
mM – Milimolar
NCX – Intercambiador sodio-calcio (*Na⁺/Ca²⁺ exchanger*)
OMS - Organización Mundial de la Salud
PMCA – ATPasa de Ca²⁺ de membrana plasmática
PGE1– prostaglandina E1
pHi – pH intracelular
PI– Ioduro de propidio
PKA – proteína quinasa A
ROS – Especies reactivas de oxígeno
RA – Reacción Acrosomal
SSC-A – área de dispersión lateral
SEM – Error estándar de la media
SloTX – Slotoxina
τ (tau) – Constante de tiempo
TNF-α – Factor de necrosis tumoral alfa

TRA–Técnicas de reproducción asistida

VDR – Receptor de vitamina D

V_m – Potencial de membrana

μL – Microlitro

μM – Micromolar

Índice de figuras

FIGURA 1: PREVALENCIA DE LA POBLACIÓN QUE PADECEN INFERTILIDAD.....	2
FIGURA2:ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE DE HUMANO.	4
FIGURA 3: ADQUISICIÓN DE DATOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	22
FIGURA 4: SELECCIÓN DE DATOS PARA EVALUAR LA RESPUESTA EN (Ca ²⁺) _i Y POTENCIAL DE MEMBRANA.....	23
FIGURA 5. PARÁMETROS CINÉTICOS.	24
FIGURA 6. GRÁFICO REPRESENTATIVO DEL CÁLCULO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA.....	25
FIGURA 7. REGIONALIZACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE PARA EL ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA.	26
FIGURA 8. LA ESTIMULACIÓN ESCALONADA CON KCL INDUCE AUMENTOS TRANSITORIOS EN LOS NIVELES DE (Ca ²⁺) _i , EVALUADOS MEDIANTE ESPECTROFLUOROMETRÍA.....	28
FIGURA 9. RESPUESTA DE (Ca ²⁺) _i EVALUADA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.	29
FIGURA 10. : LA PRESENCIA DE ALGUNOS INHIBIDORES REDUCE LA AMPLITUD DE LOS TRANSITORIOS DE (Ca ²⁺) _i EVALUADOS POR ESPECTROFLUOROMETRÍA.....	30
FIGURA 11. LOS INHIBIDORES DE CATSPER Y SLO3 DISMINUYEN SIGNIFICATIVAMENTE LA AMPLITUD DE LOS TRANSITORIOS DE Ca ²⁺	32
FIGURA 12. LOS INHIBIDORES Y LA CONDICIÓN NO CAPACITADA MUESTRAN ATENUACIÓN DE LOS TRANSITORIOS DE (Ca ²⁺) _i	34
FIGURA 13. INHIBIDORES DE CATSPER Y SLO3 REDUCEN SIGNIFICATIVAMENTE LA AMPLITUD MÁXIMA DEL AUMENTO DE (Ca ²⁺) _i	35
FIGURA 14. LAS FASES TAU UP, TAU DOWN Y EL TIEMPO DE RESPUESTA DE LOS TRANSITORIOS DE (Ca ²⁺) _i VARÍAN ENTRE TRATAMIENTOS.....	36
FIGURA 15. LA CITOMETRÍA DE FLUJO PERMITE LA MEDICIÓN SIMULTÁNEA DE LA SEÑAL DE FLUO-3 Y DISC ₃ (5) EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.....	37
FIGURA 16. LA CAPACITACIÓN INDUCE UNA HIPERPOLARIZACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN ESPERMATOZOIDES.....	38
FIGURA 17. LA HIPERPOLARIZACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA DURANTE LA CAPACITACIÓN SE ASOCIA CON UN AUMENTO EN LA AMPLITUD DE LOS TRANSITORIOS DE Ca ²⁺	39
FIGURA 18. EXISTE UNA DISTRIBUCIÓN DIFERENCIAL DE LA SEÑAL DE (Ca ²⁺) _i EN REGIONES ESPECÍFICAS TRAS ESTIMULACIÓN CON KCL.	41
FIGURA 19. ACTIVIDAD TRANSITORIA DE Ca ²⁺ LOCALIZADA PRINCIPALMENTE EN LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE EN CONDICIÓN NO CAPACITADA.....	42
FIGURA 20. ACTIVIDAD TRANSITORIA DE Ca ²⁺ LOCALIZADA PRINCIPALMENTE EN LA PIEZA PRINCIPAL DEL ESPERMATOZOIDE CONDICIÓN CAPACITADA.....	43
FIGURA 21. EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL MEDIANTE TINCIÓN CON PNA-ALEXA647 Y FLUO-3AM.....	44

FIGURA 22. LA SEÑAL DE $(Ca^{2+})_i$ VARÍA SEGÚN EL ESTILO DE VIDA REPORTADO POR LOS DONADORES.....	46
FIGURA 23. MAYOR AMPLITUD DE SEÑAL DE $(Ca^{2+})_i$ SE CONCENTRA EN DONADORES CON IMC EN RANGO DE PESO NORMAL Y SOBREPESO.....	47

Índice de tablas y anexos:

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES DE LAS SONDAS FLUORESCENTES EMPLEADAS. .	18
TABLA 2: CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES DE INHIBIDORES.....	19
TABLA 3. CLASIFICACIÓN POR DONADOR DE LA HIPERPOLARIZACIÓN Y DESPOLARIZACIÓN. ...	39
ANEXO 1:DATOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LOS INHIBIDORES UTILIZADOS.....	56
ANEXO 2: ENCUESTA DE ESTILO DE VIDA.....	57
ANEXO 3: COMPARACIÓN DE ΔF ENTRE CONDICIONES CON RESPECTO AL CONTROL: PROMEDIO, ERROR ESTÁNDAR Y VALOR P.	59
ANEXO 4: COMPARACIÓN DE ΔF ENTRE CONDICIONES CON RESPECTO AL CONTROL: MEDIANA, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y VALOR P	60
ANEXO 5: COMPARACIÓN DE ΔF ENTRE REGIONES.....	61

1. Resumen

La fertilidad masculina se evalúa tradicionalmente mediante parámetros semicuantitativos que no siempre reflejan con precisión su verdadero potencial funcional, por lo que se ha planteado la necesidad de estudiar nuevos enfoques que permitan analizar directamente aspectos fisiológicos del espermatozoide. En este contexto se estudió la dinámica del calcio intracelular (Ca^{2+})_i que es importante para un estado funcional óptimo de la célula. Se caracterizaron transitorios de (Ca^{2+})_i inducidos por pulsos despolarizantes, utilizando un protocolo basado en adiciones sucesivas de KCl tras una hiperpolarización inducida con valinomicina, el cual fue diseñado específicamente para calcular el potencial de membrana, pero que nos permite generar pulsos despolarizantes controlados y monitorizar la respuesta de (Ca^{2+})_i en tiempo real.

Para obtener una caracterización más completa, se emplearon tres técnicas complementarias, la espectrofluorometría, que permitió medir los cambios globales en la concentración de (Ca^{2+})_i; la citometría de flujo, que posibilitó el registro simultáneo de los niveles de (Ca^{2+})_i, el potencial de membrana y la viabilidad celular; y finalmente la microscopía, que fue utilizada para regionalizar los transitorios de (Ca^{2+})_i y la reacción acrosomal inducida.

En cada una de estas metodologías se evaluó la amplitud de la respuesta a cada adición de KCl, y por citometría de flujo se determinaron los parámetros cinéticos, así como el potencial de membrana.

Para ello, se utilizaron espermatozoides de donadores normozoospermicos, el eyaculado se obtiene mediante masturbación y los espermatozoides motiles fueron separados mediante la técnica de swim up en medio no capacitante. Estos espermatozoides se evaluaron en condiciones no capacitantes y capacitantes, tanto en ausencia como en presencia de inhibidores específicos de los canales CatSper, Slo1, Slo3.

Como resultado, se observó que los transitorios de (Ca^{2+})_i disminuyen significativamente cuando se bloquea CatSper, mientras que bajo condiciones capacitantes la respuesta del (Ca^{2+})_i se ve potenciada, especialmente en la pieza principal de los espermatozoides, proponiéndose el mecanismo de acción favorecido por el estado de capacitación de la célula.

Asimismo, se evidenció que la hiperpolarización favorece de manera indirecta la entrada de $(Ca^{2+})_i$ y que una mayor amplitud de los transitorios se relaciona con hábitos de vida saludables de los donadores. En conjunto, estos hallazgos nos permitieron caracterizar la dinámica de los transitorios de $(Ca^{2+})_i$ inducidos por pulsos despolarizantes en espermatozoides humanos y, a partir de la evidencia disponible, plantear el potencial de estas pruebas como herramientas para evaluar de forma funcional la fertilidad masculina.

2. Introducción

En la actualidad, han aumentado los casos de infertilidad humana, aproximadamente 1 de cada 6 parejas tienen problemas de infertilidad (Figura 1), las causas son multifactoriales y afectan tanto a mujeres como hombres (Treviño Santa Cruz et al., 2024).

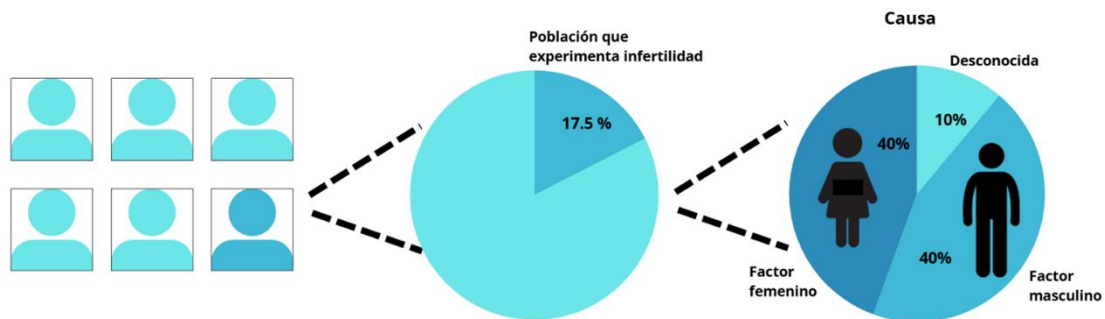


Figura 1: Prevalencia de la población que padecen infertilidad.

Representación esquemática de la prevalencia mundial de la infertilidad y la proporción atribuida a factores masculinos, femeninos y de etiología no determinada.

Nota. Adaptado de Treviño Santa Cruz et al. (2024).

Para tratar los problemas de infertilidad, se han desarrollado Técnicas de reproducción asistida (TRA), disponibles en clínicas de fertilidad donde pueden acudir las parejas que así lo requieran.

En estas clínicas, la evaluación tradicional del semen, también conocido como espermograma, se basa principalmente en la medición de algunos parámetros como la viscosidad, pH, volumen, elementos celulares diferentes de los espermatozoides, aglutinaciones, concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermática. No siempre permite diagnosticar con precisión la infertilidad masculina ni predecir el éxito

de los tratamientos de reproducción asistida (Buck Louis et al., 2014; Shamsi et al., 2011), puesto que, estos parámetros no reflejan en su totalidad la fisiología de los espermatozoides, cuya función va más allá de simplemente moverse o presentar una morfología normal; un ejemplo de ello es la integridad del material genético, la capacidad de responder a estímulos químicos, la regulación del $(Ca^{2+})_i$ y el funcionamiento de canales iónicos especializados, los cuales son primordiales para que los espermatozoides logren el proceso de fecundación, sin embargo, estos aspectos no suelen ser evaluados en los análisis convencionales (Lewis 2007).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), refiere en su último manual de examinación y procesamiento de semen humano en su sexta edición, que se requiere una batería de pruebas funcionales destinadas a evaluar la capacidad de los espermatozoides humanos para realizar los procesos fundamentales para la concepción (*WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 2021). En este trabajo buscamos analizar la dinámica del $(Ca^{2+})_i$ en respuesta a estímulos específicos, enfocándonos en cómo la capacitación, un proceso clave para la maduración funcional del espermatozoide, afecta esta respuesta; así como la influencia de diferentes canales para comprender mejor las dinámicas de señalización que caracteriza este fenómeno.

2.1 Espermatozoide

El espermatozoide es la célula germinal masculina o gameto la cual se forma en los túbulos seminíferos dentro de los testículos, mediante la espermatogénesis y cuyo único objetivo es transportar el material genético paterno y fusionarse con el ovocito para formar un cigoto que desarrollará un nuevo organismo (Fox, 2023).

2.1.1 Estructura

La estructura del espermatozoide humano refleja su alta especialización (Figura 2), se divide en la cabeza y el flagelo (WHO, 2010), la cabeza, que mide de 4 a 5 μm de largo y 3 μm de ancho, contiene al núcleo, el acrosoma y el cuerpo basal del flagelo. El núcleo, que ocupa casi toda la cabeza, contiene un conjunto haploide de cromosomas condensados e inactivos; mientras que la porción apical de la cabeza está cubierta por el acrosoma, un lisosoma que contiene enzimas esenciales para la penetración del óvulo. En el extremo posterior del núcleo se encuentra el cuerpo basal del flagelo, un solo centriolo rodeado por un centrosoma que se reorganiza dentro del óvulo para formar el nuevo

centrosoma, asegurando la correcta formación del huso mitótico y la primera división del cigoto (Paulsen, 2022).

El flagelo del espermatozoide, de aproximadamente 55 μm de longitud, se divide en tres regiones: pieza media, pieza principal y pieza terminal. Su estructura central, el axonema, presenta el patrón "9 + 2" de microtúbulos, con brazos de dineína que generan el movimiento. En la pieza media (5–7 μm), el axonema está rodeado por nueve fibras densas externas (ODF) y una vaina mitocondrial helicoidal que proporciona energía necesaria para el movimiento. Por su parte la pieza principal, que es la más larga con cerca de 50 μm contiene el axonema y solo siete ODF, ya que las asociadas a los dobletes 3 y 8 son reemplazadas por una estructura llamada vaina fibrosa, que le da soporte y estabilidad. Finalmente, la pieza terminal es la más flexible, ya que carece de las fibras densas y la vaina fibrosa; solo queda el axonema cubierto por la membrana plasmática (Kumar & Singh, 2021).

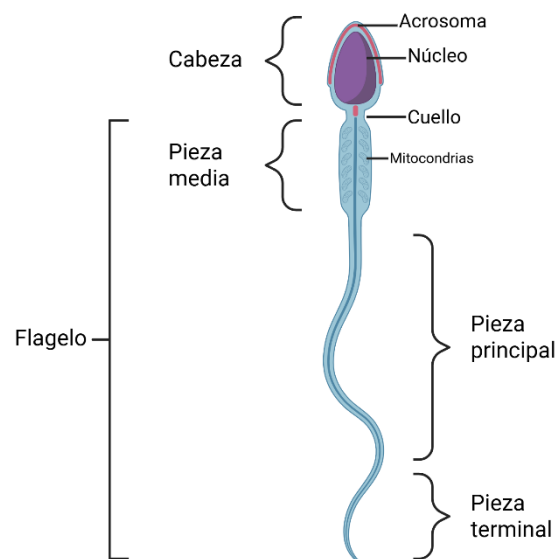


Figura2: Estructura del espermatozoide de humano.

Figura representativa de la estructura del espermatozoide humano, con los principales componentes (cabeza, pieza media, principal y terminal)

Nota. Elaboración propia creado en <https://BioRender.com>

2.1.2 Cambios en la movilidad

Desde su formación a partir de la espermatogénesis los espermatozoides permanecen inmóviles y no es hasta su paso por el epidídimo donde alcanzan la maduración y sufren varios cambios, incluido el inicio de la movilidad (Paul et al., 2021), no obstante, es posterior a la eyaculación, que los componentes del plasma seminal promueven un patrón

de nado denominado “motilidad activada”, caracterizado por un batido flagelar simétrico y de baja amplitud que genera un movimiento progresivo (Olivera et al., 2006).

Una vez dentro del tracto reproductivo de la hembra, los espermatozoides deben adaptarse a nuevas condiciones físicas y químicas que los preparan para la fecundación, es en esta etapa cuando ocurre la hiperactivación descrita por primera vez por Yanagimachi (1970) en espermatozoides de hámster. Este tipo de movimiento se presenta principalmente en el istmo y la ampolla de las trompas de Falopio, regiones cercanas al sitio de fecundación y a diferencia de la motilidad activada, la hiperactivación se manifiesta como un batido flagelar asimétrico, de alta amplitud y con trayectorias no lineales, generando un movimiento ondulatorio y vigoroso (Ho & Suarez, 2001), que permite al espermatozoide liberarse de reservorios o uniones al epitelio oviductal, desplazarse a través de secreciones mucosas densas, y penetrar la zona pelúcida (Suarez, 2008).

Para desarrollar este cambio en la movilidad es necesario un incremento en el $(Ca^{2+})_i$ que ya ha sido reportado puede ser inducido fisiológicamente por la progesterona. Esta hormona, secretada por las células del *cumulus oophorus* que rodean al ovocito, actúa mediante su unión a la enzima ABHD2 en la membrana del espermatozoide, liberando la inhibición de CatSper y permitiendo un flujo masivo de Ca^{2+} hacia el flagelo (Brown et al., 2017). De manera experimental este aumento también puede inducirse con el uso de ionóforos de calcio (Ca^{2+}) como A23187, aunque es importante considerar que a concentraciones elevadas genera inmovilidad (Mendoza-Sánchez et al., 2024; Sno et al., 2013).

Diversos estudios han explorado el papel de los canales de Ca^{2+} en este proceso, siendo el canal CatSper uno de los más relevantes, ya que su ausencia, evaluada tanto en modelos murinos como en humanos, impide la adquisición de la motilidad hiperactivada, lo que conlleva la incapacidad del espermatozoide para desplazarse de manera eficaz a través del tracto reproductor femenino y alcanzar al ovocito, lo que lo relaciona con infertilidad. (Quill et al., 2003).

2.1.3 Capacitación

Otro de los cambios importantes que experimenta el espermatozoide es un proceso de maduración denominado capacitación, que tiene lugar en el tracto reproductor femenino e implica diferentes cambios metabólicos y moleculares, que tienen como fin que el

espermatozoide adquiera la capacidad de realizar la reacción acrosomal y fusionarse con el ovocito (López-González et al., 2014).

A nivel molecular, entre los cambios que ocurren se destaca la pérdida de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide, lo que incrementa su fluidez y contribuye a su hiperpolarización, que está descrita como la transición del espermatozoide de un potencial más despolarizado (-40 mV) a uno más hiperpolarizado (-65 mV) (López-González et al., 2014); también existen cambios en las concentraciones de iones, el aumento de la actividad de la proteína quinasa A (PKA) y la fosforilación de tirosina de proteínas dando como resultado que los espermatozoides desarrollen la hiperactivación, que permite al espermatozoide atravesar de la zona pelúcida y que se lleve a cabo la fecundación (Ho & Suarez, 2001). Aunque cada uno de estos eventos moleculares ha sido estudiado de manera independiente, todavía no se comprende completamente cómo se interconectan en su totalidad, así como el orden exacto de los eventos (Stival et al., 2016).

2.1.4 Reacción acrosomal

Seguido a la capacitación, el espermatozoide es capaz de experimentar la reacción acrosomal (RA), un proceso de exocitosis en el que el acrosoma libera de forma controlada enzimas hidrolíticas. Esta RA se activa cuando el espermatozoide interacciona con la zona pelúcida del ovocito o al exponerse a inductores como la progesterona. Para que ocurra, es imprescindible un aumento del $(Ca^{2+})_i$ y un cambio en el pH (Aldana et al., 2021).

Durante la RA, los receptores de inositol trifosfato (IP_3R) liberan Ca^{2+} almacenado en el acrosoma, lo que provoca deformaciones en sus membranas y desencadena la exocitosis. Al mismo tiempo, el flujo de Ca^{2+} regula proteínas como las sinaptotagminas, que facilitan la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del espermatozoide. Gracias a estos eventos moleculares coordinados, las enzimas necesarias pueden romper las capas protectoras del ovocito y permitir la fertilización (Sánchez Cárdenas et al., 2025).

3. Antecedentes

3.1 Importancia del Ca^{2+} en el espermatozoide

El Ca^{2+} como segundo mensajero modula vías de señalización que participan en procesos como la excitación-contracción, la motilidad, la actividad y el transporte enzimático, así como el estado de fosforilación de proteínas, y diversos mecanismos de muerte celular (Uhlén & Fritz, 2010).

En los espermatozoides maduros la condensación del núcleo reduce los niveles de transcripción, incrementando la dependencia de mecanismos de regulación postraduccionales, como la transducción de señales que puede ser mediada por Ca^{2+} para el control funcional (Correia et al., 2015). Dicha señalización se caracteriza por variaciones en la concentración citoplasmática que actúan como señales sensibles y rápidas que procesan estímulos originados tanto fuera como dentro de la célula; estas fluctuaciones pueden presentarse como picos transitorios individuales, respuestas sostenidas u oscilaciones de $(\text{Ca}^{2+})_i$ (Mata-Martínez et al., 2021).

Las oscilaciones presentes en diferentes tipos celulares destacan en el espermatozoide por su rapidez y están correlacionadas con la frecuencia del batido del flagelo y la regulación de la reacción acrosomal, además de ser parte de la diferenciación de las células germinales durante el proceso de espermatogénesis (Harper et al., 2004; Sánchez-Cárdenas et al., 2012). Estas oscilaciones fueron observadas por primera vez en el espermatozoide de verraco en 1993 y de manera general pueden ser espontáneas o inducidas por estímulos como la progesterona o el líquido folicular (Darszon et al., 2011).

Entre los patrones de respuesta identificados con progesterona, Romarowski et al. (2016) describieron que solo los espermatozoides de ratón que presentaron un patrón transitorio inmediato de aumento de $(\text{Ca}^{2+})_i$ fueron capaces de experimentar la RA.

Estudios han demostrado que la capacidad de los espermatozoides para generar oscilaciones de $(\text{Ca}^{2+})_i$ en respuesta a la progesterona puede afectar su capacidad de fertilización en técnicas de reproducción asistida ya que pueden servir como un mecanismo para prevenir la reacción acrosomal cuando los espermatozoides no están en el lugar adecuado para la fertilización (Schreiber et al., 1998).

3.2 Canales iónicos implicados en la dinámica del $(Ca^{2+})_i$

Como se analizó anteriormente los espermatozoides de los mamíferos deben responder a diversas señales durante su desarrollo, así como en su viaje por el tracto reproductor femenino. Para adaptarse a estos cambios, es importante una regulación dinámica a través de canales iónicos; estos canales pueden abrirse mediante pequeños cambios conformacionales inducidos por voltaje, ligandos, cambios de fosforilación, presión de membrana, distribuidos en las diferentes regiones del espermatozoide (Wang et al., 2021).

Si bien la señalización de $(Ca^{2+})_i$ descrita previamente depende en gran medida de transportadores específicos como CatSper (Rahban & Nef, 2020), su actividad también está modulada y potenciada por otros canales iónicos. Entre estos se encuentran miembros de la familia Slo y el canal de protones Hv1, los cuales regulan parámetros de pH y potencial de membrana (Chávez et al., 2014; Kirichok et al., 2006).

3.2.1 Generalidades de Canales de Ca^{2+}

Los canales iónicos de Ca^{2+} permiten el flujo de Ca^{2+} y son de gran relevancia para la fisiología del espermatozoide; estos canales pueden ser regulados por voltaje, que responden a cambios en el potencial de membrana; canales activados por nucleótidos cíclicos, que median respuestas quimiotácticas; y canales asociados a proteínas G. En conjunto todos estos regulan la homeostasis del Ca^{2+} , así como participan en los procesos de la movilidad, capacitación y la reacción acrosomal (Mata-Martínez et al., 2021).

3.2.1.1 CatSper

CatSper es el principal canal de Ca^{2+} expresado selectivamente en espermatozoides, localizado en la membrana de la pieza principal del flagelo. Su estructura es un complejo heteromérico conformado por al menos diez subunidades. Cuatro de ellas, las subunidades α (CatSper 1-4), forman el poro central responsable de la conducción selectiva de Ca^{2+} hacia el interior celular, mientras que las seis subunidades auxiliares (β , γ , δ , ζ , ϵ y EFCAB9) desempeñan funciones regulatorias y estructurales estabilizando el complejo, modulando su ensamblaje, sensibilidad y correcta localización en la membrana flagelar (Mendoza-Sánchez et al., 2024; Hwang & Chung, 2023). Otras proteínas

recientemente identificadas son C2CD6, SLCO6C1 y TEM249 que cumplen funciones similares (Yang et al., 2022; Lin et al., 2021).

Entre los factores que regulan la actividad del canal CatSper se encuentran la alcalinización intracelular, diversas moléculas presentes en el tracto reproductivo femenino y vías de señalización que incluyen el sistema cAMP/PKA, además de una débil dependencia del voltaje (Mendoza-Sánchez et al., 2024; Kirichok et al., 2006) Asimismo, CatSper responde a ligandos extracelulares como la progesterona en mamíferos, cuya unión induce un aumento significativo en la concentración de $(Ca^{2+})_i$ y provoca un cambio en el patrón de batido flagelar permitiendo la motilidad hiperactivada (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011), cuya relevancia para la fertilidad previamente descrita se respalda con diferentes trabajos, donde la ausencia o mutaciones en cualquiera de diferentes subunidades del canal resultan en infertilidad masculina (Hildebrand et al., 2010; Avenarius et al., 2009; Qi et al., 2007). En ratones nulos para CatSper, los espermatozoides carecen de motilidad hiperactivada, lo que les impide llegar al punto de fecundación y fertilizar el ovocito (Carlson et al., 2005; Jarow, 2002).

3.2.1.2 Canales Cav

En los espermatozoides, también se han descrito canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CaV). Estos canales se clasifican en dos grupos funcionales: los canales activados por alto voltaje (HVA: Cav1.1–1.4, Cav2.1, Cav2.2 y Cav2.3), que requieren fuertes despolarizaciones para su activación, y de bajo voltaje (LVA o tipo T: Cav3.1–3.3), sensibles a despolarizaciones moderadas asociados con la motilidad y la reacción acrosómica (Jarow, 2002). Sin embargo, los registros electrofisiológicos muestran que las corrientes tipo T aparecen en fases tempranas de la espermatogénesis y disminuyen hasta ser indetectables en espermatozoides epididimarios maduros (Pinto et al., 2023). Se sugiere la existencia de estas isoformas cav1 y cav3 en un estado latente que puede reactivarse durante la maduración espermática, aunque otros estudios todavía debaten su relevancia fisiológica (Yang et al., 2024).

Dos compuestos que han sido estudiados por su inhibición en canales de Ca^{2+} son el NNC 55-0396 (NNC) y el mibefradil. El NNC, es un inhibidor para canales Ca^{2+} de tipo T (Cav3), que también se ha demostrado bloquea el Canal CatSper. En humanos se ha observado que NNC inhibe de manera significativa el aumento de $(Ca^{2+})_i$ provocado por

la progesterona, reduciendo la motilidad progresiva y la hiperactivación espermática (Darszon et al., 2011).

Por su parte en ratón, se ha reportado que NNC bloquea las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje, afectando procesos como la capacitación espermática (Carlson et al., 2003). Aunque es importante considerar que a concentraciones micromolares de NNC, además de inhibir CatSper, eleva el pH del acrosoma, libera Ca^{2+} de este almacén intracelular e inducen la reacción acrosomal incluso en medios virtualmente libres de Ca^{2+} , esto tanto en humano como en ratón (Chávez et al., 2018).

Por otro lado, mibefradil, aunque inicialmente desarrollado como bloqueador de canales tipo L (CaV1), también ha mostrado capacidad para inhibir CatSper a concentraciones más elevadas (Strünker et al., 2011). En estudios con espermatozoides humanos, se ha encontrado que el mibefradil reduce la hiperactivación espermática de forma significativa; mientras que, en ratones, se ha documentado que este compuesto bloquea las corrientes de Ca^{2+} y afecta negativamente la motilidad y los cambios asociados a la capacitación (Zarei et al., 2025; Diao et al., 2017).

3.2.2 Generalidades de Canales de K^+ en el espermatozoide

Los canales iónicos de Potasio (K^+) permiten el paso selectivo de iones K^+ , se clasifican en diferentes familias según su mecanismo de activación, voltaje-dependientes (Kv), activados por Ca^{2+} (KCa), de rectificación interna (Kir) y de dos poros (K_2P) (Taura et al., 2021) y tienen diferentes funciones a lo largo del desarrollo del espermatozoide, como en la espermatogénesis donde influyen en la proliferación y diferenciación de las células germinales; en el caso de la capacitación estos canales modulan el potencial de membrana y la entrada de $(\text{Ca}^{2+})_i$ (Delgado-Bermúdez et al., 2025).

3.2.2.1 Familia de canales Slo

La familia Slo agrupa tres canales α principales: Slo1, Slo2 (con dos isoformas, Slo2.1 y Slo2.2) y Slo3. Cada una de estas subunidades presenta siete hélices transmembrana (S0–S6) y un dominio citosólico de gran tamaño que responde a ligandos intracelulares para modular la apertura del poro central (Ritagliati et al., 2018). Este dominio confiere a cada canal su especificidad iónica, Slo1 se activa por Ca^{2+} , Slo2.1 y Slo2.2 lo hacen en respuesta a Na^+ , y Slo3 depende de la concentración de H^+ (pH_i) (Salkoff et al., 2006).

El canal de K^+ Slo1 se expresa en diferentes tejidos y células como neuronas, músculos de vasos sanguíneos, etc (Echeverría et al., 2024). Se caracteriza por activarse por voltaje y en respuesta a un incremento de $(Ca^{2+})_i$ (Cui, 2021). En espermatozoides humanos se localiza principalmente en la región del flagelo, específicamente en la pieza intermedia, donde se encuentra asociado con mitocondrias y estructuras implicadas en la generación del movimiento (Mannowetz et al., 2013). Es sensible a Caribdotoxina (CbTX), Iberitoxina (IbTX) TEA, Slotoxina (SloTX) y Penitrem A con los que se ha determinado que el canal es responsable de la mayor parte de las corrientes de potasio características registradas en espermatozoides humanos. Este canal participa en la regulación del volumen celular y el potencial de membrana plasmática (Mannowetz et al., 2013; Tang et al., 2010).

El Canal SLO3 sólo se expresa en la línea germinal masculina y su activación responde al aumento del pH_i (en ratón), a la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ (en humano) y a cambios en el voltaje por depolarización (Santi et al., 2010). Su permeabilidad relativamente baja a K^+ y su fuerte dependencia del pH_i plantea que, a medida que las proporciones de Na^+/K^+ varían a lo largo del tracto reproductor femenino, SLO3 ejerza efectos tanto despolarizantes como hiperpolarizantes sobre la membrana espermática (Martínez-López et al., 2009). Además, en espermatozoides y sistemas heterólogos de expresión, se encontró que la actividad de SLO3 puede ser modulada por la disponibilidad de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en la membrana (Tang et al., 2010). Si bien aún no se dispone de un inhibidor específico para SLO3, se ha descrito sensibilidad a clofilium, quinidina y TEA. Este canal es imprescindible para la hiperpolarización durante la capacitación espermática; los ratones knockout de SLO3 resultan infértiles y presentan alteraciones en la osmorregulación y el control de volumen celular (Sánchez-Carranza et al., 2015; Santi et al., 2010).

3.3 Transitorios de $(Ca^{2+})_i$ por pulsos depolarizantes

Además de los estímulos fisiológicos descritos, de manera experimental, es posible inducir aumentos transitorios en la concentración de $(Ca^{2+})_i$ mediante la despolarización de la membrana plasmática con cloruro de potasio (KCl). Matamoros-Volante et al. (2018) los identificaron por causalidad en la medición simultánea de $(Ca^{2+})_i$ y el potencial de membrana por citometría de flujo en espermatozoides humanos, por su parte, Ferreira et al. (2021) estudiaron este fenómeno en espermatozoides de ratón y humanos en

diferentes estados de maduración y demostraron que la exposición a elevadas concentraciones de KCl aumenta los niveles de $[Ca^{2+}]_i$, efecto que se ve potenciado en presencia de bicarbonato (HCO_3^-); en consonancia con esas observaciones, Fraire–Zamora y González–Martínez (2004) evaluaron el efecto de la alcalinización con NH_4Cl para inducir dichos incrementos, obteniendo mayores amplitudes en condiciones más alcalinas; asimismo, Linares–Hernández et al. (1998) encontraron que cuanto mayor era el grado de despolarización alcanzado, mayor resultaba la amplitud de los transitorios.

Una explicación propuesta fue que el HCO_3^- , que activa la vía de la adenilil ciclasa soluble, promueve la activación de la proteína quinasa A (PKA) (Ferreira et al., 2021), contribuyendo así al aumento del pH intracelular y a la sensibilización del canal CatSper a señales de despolarización (Visconti et al., 1995; Chávez et al., 2019).

3.4 Inducción experimental de la señalización de Ca^{2+} como aproximación funcional

Las aproximaciones metodológicas que generan y evalúan la señalización de Ca^{2+} en espermatozoides constituyen herramientas importantes para determinar la capacidad funcional y fertilidad potencial de estos gametos. Young et al. (2024) entre diferentes pruebas técnicas complementarias para evaluar la funcionalidad de CatSper identificó que los pacientes con mutaciones en CATSPER1 o con expresión reducida del canal carecían de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por progesterona, prostaglandina E1 (PGE1) o alcalinización, además de no presentar corrientes de membrana mediadas por CatSper, lo que comprometía su hiperactivación, idea ya estudiada (Ren & Xia, 2010; Quill et al., 2003). En estos pacientes fracasaron entre otras técnicas la Fecundación *In Vitro* (FIV) convencional y únicamente al aplicar Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se restauró la fecundación debido a que solo la penetración mecánica pudo superar el defecto funcional de CatSper.

Aunque es importante considerar que no solo la hiperactivación por si sola refleja la actividad de CatSper, Wang et al. (2021) identificaron que una mutación homocigota *CATSPER3* causó fracaso de la RA e infertilidad masculina primaria pero no comprometió la motilidad y morfología de los espermatozoides y de manera similar al anterior trabajo solo el tratamiento con ICSI resultó exitoso.

Reflejando hallazgos similares Alasmari et al. (2013) observaron que el flujo defectuoso de $(Ca^{2+})_i$ inducido por progesterona se asoció a una menor hiperactivación, fue más

frecuente en pacientes de FIV que en donantes fértiles, y relacionada con una menor tasa de fecundación.

Esto en conjunto respalda la utilidad de evaluar la señalización de Ca^{2+} como un marcador funcional relevante, ya que alteraciones en la actividad de CatSper pueden pasar desapercibidas en parámetros convencionales y en cierto modo, comprometer funciones esenciales afectando directamente el éxito de técnicas de reproducción asistida.

3.5 Influencia del estilo de vida en la señalización de calcio

Aunque numerosos estudios han demostrado que hábitos como la dieta, el ejercicio, el estrés psicológico y el consumo de tabaco o alcohol influyen de manera significativa en la calidad seminal y la fertilidad masculina (Kasman et al., 2020), su impacto directo sobre la señalización de Ca^{2+} en espermatozoides todavía no ha sido evaluado en profundidad; estos factores modifican rutas moleculares como el estrés oxidativo, la liberación de citoquinas inflamatorias y las alteraciones hormonales, las cuales sí interfieren con los principales reguladores del $(\text{Ca}^{2+})_i$ espermático (Darbandi et al., 2018, Potiris et al., 2025, Carrasquel et al., 2013, Carrasquel et al., 2014).

Referente a la dieta se ha observado que el mio-inositol, la vitamina D y diferentes antioxidantes contribuyen a mantener la homeostasis del Ca^{2+} en espermatozoides humanos (Di Renzo et al., 2022). La vitamina D, a través de receptores VDR en la membrana espermática, eleva la concentración citosólica de Ca^{2+} y se ha relacionado con mejoras en la motilidad y en la capacidad de reacción acrosomal en hombres con niveles séricos bajos (Qamar et al., 2023). Por su parte, los antioxidantes limitan la peroxidación lipídica de la membrana plasmática y protegen tanto a CatSper como a la bomba PMCA de modificaciones oxidativas, preservando así la capacidad de entrada y expulsión de Ca^{2+} necesaria para la hiperactivación (Aitken & Baker, 2006).

Por su parte, el ejercicio moderado refuerza las defensas antioxidantes y reduce la inflamación testicular, lo cual favorece la funcionalidad de los canales de Ca^{2+} ; en cambio, el estrés crónico y el sobreentrenamiento elevan el cortisol, que puede unirse a CatSper y atenuar la respuesta de Ca^{2+} inducida por progesterona (Sánchez González et al., 2023), al tiempo que reprime el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal y altera la expresión de canales, lo que puede implicar una menor entrada de Ca^{2+} y motilidad comprometida (Hackney, 2008; Whirledge & Cidlowski, 2010),

4. Justificación

La infertilidad es una condición que afecta a aproximadamente 70 millones de personas en todo el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud, alrededor del 17.5% de las parejas enfrentan problemas de fertilidad, con el factor masculino contribuyendo en un 50% de los casos, siendo sus causas en torno al factor masculino diversas, incluyendo mutaciones genéticas, estilo de vida, enfermedades y efectos secundarios de medicamentos; al evaluar aspectos como la capacitación espermática y la edad paterna avanzada se han aportado nuevas perspectivas en la fisiopatología y el manejo de la infertilidad (Fainberg & Kashanian, 2019).

La fertilidad masculina se evalúa comúnmente a través de la calidad del semen, basada en parámetros como características del semen, como agregados celulares, aglutinaciones, color, volumen, la concentración espermática, la motilidad y la morfología, no obstante, aunque estos parámetros se utilizan ampliamente, su capacidad para predecir con precisión la fertilidad es limitada; a pesar de la asociación entre la calidad del semen y la posibilidad de embarazo, estudios han demostrado que estas mediciones no siempre reflejan el verdadero potencial de fertilidad masculino (Wang & Swerdloff, 2014). Por consiguiente, se ha puesto énfasis en la necesidad de incorporar nuevas aproximaciones funcionales que permitan evaluar de manera más integral la fertilidad masculina (World Health Organization, 2021; Sánchez et al., 2013).

Entre estas aproximaciones, se ha propuesto el estudio de la dinámica del $(Ca^{2+})_i$ como un marcador funcional relevante, debido a su participación en procesos clave como la motilidad, hiperactivación y capacitación (Darszon et al., 2011). El presente proyecto surge a partir de una observación metodológica realizada durante la implementación de un protocolo de medición del potencial de membrana plasmática en espermatozoides, adaptado a partir de lo propuesto por el Consorcio de Fisiología del Espermatozoide y respaldado por estudios previos (Baro Graf et al., 2019, 2020; Matamoros-Volante et al., 2020), en dicha metodología, se induce de forma artificial una hiperpolarización con valinomicina, seguida de adiciones de KCl que permiten calcular el potencial de membrana a través de la ecuación de Nernst (Babcock, 1983). Sin embargo, al realizar un análisis simultáneo de potencial y $(Ca^{2+})_i$ mediante citometría de flujo, se observó que las

adiciones de KCl provocaban aumentos transitorios en la señal de $(Ca^{2+})_i$, pero solo en espermatozoides capacitados, un hallazgo no descrito previamente en ese contexto, aunque si explorado con diferentes metodologías.

Dado que esta respuesta se repitió consistentemente en múltiples donadores, se planteó como hipótesis que estos transitorios reflejan una activación de vías específicas de entrada de $(Ca^{2+})_i$ asociadas a la capacitación y provocadas por una despolarización de la membrana. Lo anterior motivó la realización del presente trabajo, cuyo objetivo es caracterizar estos transitorios de $(Ca^{2+})_i$, explorar las entidades moleculares involucradas en su generación y analizar si factores como el estado de capacitación o el estilo de vida de los donadores influyen en esta respuesta.

5. Objetivos.

5.1. Generales.

Investigar los mecanismos subyacentes de los transitorios de $(Ca^{2+})_i$ inducidos por depolarización de la membrana y su dependencia con la capacitación espermática, con el fin de comprender mejor su papel en la fertilización y la función espermática.

5.2. Específicos.

- Corroborar la existencia de transitorios de $(Ca^{2+})_i$ inducidos por depolarización y su dependencia con la capacitación.
- Identificar la entidad molecular responsable de los transitorios de $(Ca^{2+})_i$ mediante farmacología utilizando una batería de inhibidores para diferentes canales iónicos.
- Determinar si el estilo de vida de los diferentes donadores influye en la respuesta del $(Ca^{2+})_i$ en los espermatozoides.

6. Estrategia experimental

6.1. Medios empleados

Para la separación de los espermatozoides motiles y todos los registros se utilizó un medio Human Tubal Fluid (HTF) compuesto por (mM): NaCl 90, $CaCl_2$ 1.8, $MgSO_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.37, Glucosa 2.8, piruvato de sodio 0.33, lactato de sodio 21.39, y HEPES 23.8,

denominado como la condición No Capacitante (NC). Este medio promueve la condición Capacitante (CAP) cuando lo suplementamos con 25mM de NaHCO_3^- y 75 mM de Albumina Sérica Bovina (BSA por sus siglas en ingles). Ambos medios se ajustaron a un pH de 7.4 y se filtraron por una membrana de 0.22 μm .

6.2. Obtención de muestras

Las muestras de semen se obtuvieron de donadores normozoospermicos que cumplen los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010) y que presentaron al menos 2 días de abstinencia sexual. Estos donadores firmaron el consentimiento informado aprobado por el comité de bioética de IBt. Las muestras del eyaculado se obtienen mediante masturbación, se colectan en frascos de toma de muestra estériles y se incuban durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera húmeda y a una concentración del 5% de CO_2 , transcurrido este tiempo se llevó a cabo la técnica “swim up” (nado ascendente) en medio no capacitante, con el objetivo únicamente de obtener espermatozoides motiles y separar de otros tipos celulares. Para esto se colocaron entre 200 y 300 μl dependiendo de la muestra con un mililitro de medio e inclinando los tubos 45° estos reservados nuevamente a incubación una hora. Posteriormente se realizó el conteo con ayuda de una cámara makler. Se ajustó la concentración espermática dependiendo del protocolo experimental empleado (citometría de flujo, espectrofluorometría, microscopía de epifluorescencia). El número de donadores empleado fue variable dependiendo de la metodología, para espectrofluorometría se procesaron un total de 4 donadores, en citometría de flujo se incluyeron 8 donadores en condiciones capacitantes y no capacitantes, con el uso de inhibidores se utilizaron 6 y para microscopía de epifluorescencia se emplearon 3 donadores.

6.3 Incorporación de Colorantes Fluorescentes

Las soluciones stock de los colorantes fluorescentes y de los compuestos de prueba se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) a concentraciones no citotóxicas.

Para medir los cambios en las concentraciones de $(\text{Ca}^{2+})_i$, se cargaron los espermatozoides con la sonda Fluo3-AM a una concentración variable dependiendo de la metodología empleada (Tabla 1). Esta sonda fluorescente presente en su forma acetoximetilada, penetra las membranas celulares de forma pasiva y una vez en el interior de la célula es desesterificada por esterasas citoplasmáticas, liberando la forma activa que se une a los

iones Ca^{2+} y emite fluorescencia proporcional a su concentración intracelular (Minta et al., 1989).

Para la medición de potencial de membrana plasmática se empleó una carbocianina con una cola de alquilo corta (C3) llamada 3,3'-Dipropylthiadicarbocyanine Iodide ($\text{DiSC}_3(5)$), este colorante catiónico que en presencia de cargas negativas se une y particiona en la membrana plasmática, acumulándose en ella en función a su estado de polarización (Plášek et al., 1994) y únicamente la utilizamos mediante citometría de flujo, donde empleamos una concentración de $0.25 \mu\text{M}$.

Para la determinación de la viabilidad se utilizó Ioduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés) un intercalante de ADN que solo penetra células con membranas dañadas, emitiendo fluorescencia al unirse al ADN y permitiendo así diferenciar células viables de no viables (Riccardi & Nicoletti, 2006), empleándose a una concentración de $0.1 \mu\text{M}$.

Para las mediciones de reacción acrosomal, se realizó una tinción combinada utilizando Fluo-3 AM a una concentración final de $3 \mu\text{M}$ y PNA-Alexa Fluor™ 647 (PNA-Alexa647) a $10 \mu\text{M}$. El marcador PNA-Alexa647 se une específicamente a residuos de galactosa expuestos en la membrana del acrosoma, permitiendo identificar de forma precisa espermatozoides con acrosoma intacto o reaccionado (Cross et al., 1989).

En la Tabla 1 se resumen el uso de las diferentes sondas fluorescentes dependiendo de la técnica empleada.

Parámetro	Sonda fluorescente	λ Absorción	λ Emisión	Técnica empleada	Concentración empleada	Marca, Cat. No
$(\text{Ca}^{2+})_i$	Fluo3-AM	506 nm	526 nm	Espectrofluorometría	$1 \mu\text{M}$	Invitrogen, F1242
				Citometría de flujo	$1 \mu\text{M}$	
				Microscopía de epifluorescencia	$3 \mu\text{M}$	
Viabilidad Celular	PI	535 nm	617 nm	Citometría de flujo	$0.1 \mu\text{M}$	Invitrogen, L-7011

Em	DiSC ₃ (5)	654 nm	674 nm	Citometría de flujo	0.25 μ M	Thermo Fisher, D306
Reacción Acrosomal	PNA-Alexa Fluor™ 647	651 nm	668 nm	Microscopía de epifluorescencia	10 μ M	Thermo Fisher, L32460

Tabla 1: Características y condiciones de las sondas fluorescentes empleadas.

La tabla presenta las propiedades de las sondas fluorescentes empleadas, incluyendo el parámetro fisiológico que detectan, las longitudes de onda de absorción y emisión, la técnica utilizada para su detección, la concentración final aplicada en los ensayos, así como la marca comercial y número de catálogo.

6.4. Tratamientos farmacológicos

Para las condiciones con antagonistas farmacológicos se incubaron los espermatozoides en condiciones NC y como condición control se utilizaron espermatozoides en condición Capacitante sin inhibidor. Decidimos utilizar algunos inhibidores de canales de K⁺ Slo1, Slo3 y para canales de Ca²⁺ CatSper. A continuación, en la tabla se muestran los inhibidores, concentraciones, marcas usadas y su blanco molecular, estas también están descritas en el Anexo 1.

Inhibidor empleado	Concentración empleada	Marca, Cat. No	Blanco Molecular
Clofilium	50 μ M	Sigma-Aldrich, C2365	IKSper (Slo3) ¹
NNC	10 μ M	Alomone, N-206	Canales de Ca ²⁺ tipo T (CatSper) ^{2,3}
Mibefradil	10 μ M	Alomone, M-150	Canales de Ca ²⁺ tipo T y L (CatSper) ⁴
Penitrem	100 μ M	Alomone, P-650	Canales BK

			*Inhibe parcialmente IKSper (Slo3) ⁵
SloTX	100 μ M	Alomone, STS-410	Canales MaxiK: Slo1 ⁶

¹Sánchez-Carranza et al., 2015; ^{2,3}Carlson et al., 2022; Darszon et al., 2011; ⁴Zarei et al., 2025;

⁵Tang et al., 2010; ⁶Mannowetz et al., 2013

Tabla 2: Características y condiciones de inhibidores.

En la tabla se describen los inhibidores empleados durante los ensayos, detallando la concentración final utilizada, el proveedor comercial junto con el número de catálogo, así como el blanco molecular específico de cada compuesto.

6.5. Mediciones de Calcio mediante el uso de espectrofluorometría

Las mediciones (Ca^{2+})_i se realizaron utilizando un espectrofluorómetro Aminco SLM 8000, con sistema de adquisición Olis Global Works y fuente de excitación Luxeon V Star LED – Cyan Lambertian. La longitud de onda de excitación fue de 505 nm y la de emisión se registró a 525 nm.

En la celda de registro del espectrofluorómetro, se colocaron un total de 5 millones de espermatozoides por registro. Se realizaron un total de 6 medidas en el espectrofluorómetro bajo las siguientes condiciones, medio capacitante tiempo 3 horas utilizando un medio 2x que contiene BSA y NaHCO_3 dividido en un control únicamente con medio y otros 5 tubos cada uno con su respectivo inhibidor. Tras el tiempo de capacitación, se centrifugó a 750xg por 5 min y se retira sobrenadante, se añade medio incompleto solo con bicarbonato para la concentración establecida para la capacitación 2x así como nuevamente el inhibidor correspondiente y por último se adicionó el marcador fluorescente correspondiente, Fluo3-AM 30 min previos al registro.

6.6. Mediciones de Calcio y potencial de membrana mediante el uso de citometría de flujo

En este caso se llevó a cabo el mismo procesamiento de muestras de donadores, con la técnica de purificación por *Swim up*; una vez realizado el conteo se ajustó el número de espermatozoides a 1×10^6 /ml. Tras el tiempo de capacitación y se adicionaron los colorantes fluorescentes: Fluo-3AM (30 min de incubación), DiSC₃(5) (5 min de incubación) y PI (se añadió antes de medirlo en el citómetro).

Se empleó el citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus y se aprovechó la medición multiparamétrica, ya que esta metodología lo permite. Se utilizó la misma estrategia metodológica para las mediciones de acuerdo con Matamoros-Volante et al. (2020).

6.7. Mediciones de Calcio mediante el uso de microscopía

Para las mediciones a nivel de célula única se empleó un microscopio de fluorescencia invertido con el sistema de superresolución Oxford Nano Imager (ONI), equipado con el objetivo de alta apertura numérica (100x, NA 1.49), una cámara sCMOS Orca Flash 4.0 V2 sensor (Hamamatsu) y fuentes de iluminación láser de diferentes longitudes de onda.

Se evaluaron dos condiciones correspondientes a espermatozoides incubados durante 3 horas en medio capacitante y espermatozoides mantenidos en medio no capacitante. Previo al registro, los espermatozoides se inmovilizaron en la cámara de adquisición mediante recubrimiento de la superficie del cubreobjetos con concanavalina A (1 mg/mL), una lectina vegetal con afinidad por azúcares específicos como α -glucósidos y manósidos, presentes en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (Nishikimi et al., 1997), facilitando su adhesión celular y permitiendo fijar los espermatozoides a la superficie de observación. Las células se dejaron adherir durante cinco minutos antes de iniciar el registro, con el fin de asegurar que las mediciones correspondieran a los mismos espermatozoides a lo largo del tiempo. Para el análisis se empleó un doble marcaje fluorescente: Fluo-3AM, para la detección de $(Ca^{2+})_i$, y una lectina aislada de cacahuete *Arachis hypogaea*, también conocida como PNA conjugada con Alexa647, para evaluar la integridad de la membrana acrosomal. Durante el experimento se utilizaron dos láseres, uno de 473 nm al 0.75% para excitar Fluo-3AM y otro de 640 nm al 5% para excitar PNA-Alexa647 ambos a una exposición de 10 ms. Se adquirió 1 imagen cada dos segundos, siguiendo la misma secuencia de adiciones empleadas en los distintos protocolos: valinomicina (1 μ M), KCl (5, 10 y 15 mM), ionomicina 10 μ M y $MnCl_2$ 5 mM de la marca Sigma-Aldrich.

6.8 Evaluación del estilo de vida

Con el objetivo de evaluar si el estilo de vida de los donantes influye en las variaciones de la respuesta de $(Ca^{2+})_i$, se utilizaron los datos obtenidos de una encuesta previamente elaborada por miembros de nuestro grupo de trabajo, en esta encuesta se buscó recabar

información del estado de salud general y los hábitos de vida de los donadores de muestras de semen utilizadas en los experimentos del laboratorio.

La encuesta se dividió en dos secciones principales, la primera con preguntas generales: edad, peso y estatura. La segunda sección incluye aspectos relacionados con su estilo de vida: el consumo de alcohol, las horas de sueño, los hábitos alimenticios, la frecuencia de la actividad física, entre otros.

Del total de 16 donadores encuestados, se utilizaron 8 para citometría de flujo en la condición capacitada y no capacitada, comparándose la frecuencia de los hábitos descritos con respecto al promedio de su amplitud de respuesta en $(Ca^{2+})_i$ a los 3 pulsos despolarizantes (5, 10 y 15 mM).

Cabe señalar que la encuesta no fue sometida a un proceso formal de validación, ya que su diseño respondió a un propósito exploratorio enfocado en describir el estado general de los donadores. Los parámetros fueron seleccionados en base a los antecedentes previamente descritos, que mencionan el posible efecto indirecto sobre la señalización de calcio en espermatozoides, lo que justificó su inclusión para el análisis.

El contenido completo de la encuesta, incluyendo todas las preguntas formuladas, se presenta en el Anexo 2.

6.9. Análisis de datos

6.9.1 Espectrofluorometría

Se normalizaron los datos adquiridos como $(F/F_0)-1$ para igualar la respuesta de la basal en todos los donadores a cero y poder evaluar el incremento relativo del transitorio de $(Ca^{2+})_i$ con respecto a la basal, posterior a los pulsos despolarizantes y se calculó la amplitud del transitorio de $(Ca^{2+})_i$ inducido por la despolarización con KCl (5, 10, 15 y 25 mM), definida como la diferencia entre el valor máximo de fluorescencia registrado inmediatamente después de la adición del estímulo y el valor basal registrado justo antes de dicha adición. Este parámetro se empleó para cuantificar la magnitud de la respuesta de $(Ca^{2+})_i$ y fue utilizado para comparar estadísticamente los efectos de los diferentes tratamientos con inhibidores.

6.9.2 Citometría de flujo

El análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo se realizó con el programa FlowJo X (versión: 10.0.7r2), donde se hizo la selección de eventos que corresponden a espermatozoides utilizando los parámetros del área de dispersión frontal (FSC-A) y el área de dispersión lateral (SSC-A) para seleccionar la población de interés (Figura 3.A); del mismo modo se excluyeron los eventos dobles con los parámetros de área de dispersión frontal (FSC-A) contra la altura de dispersión frontal (FSC-H) (Figura 3.B). Por último, se seleccionó la población de las células vivas, fluorescencia de Fluo-3 (canal FITC) vs Ioduro de propidio (canal PE-A) (Figura 3.C).

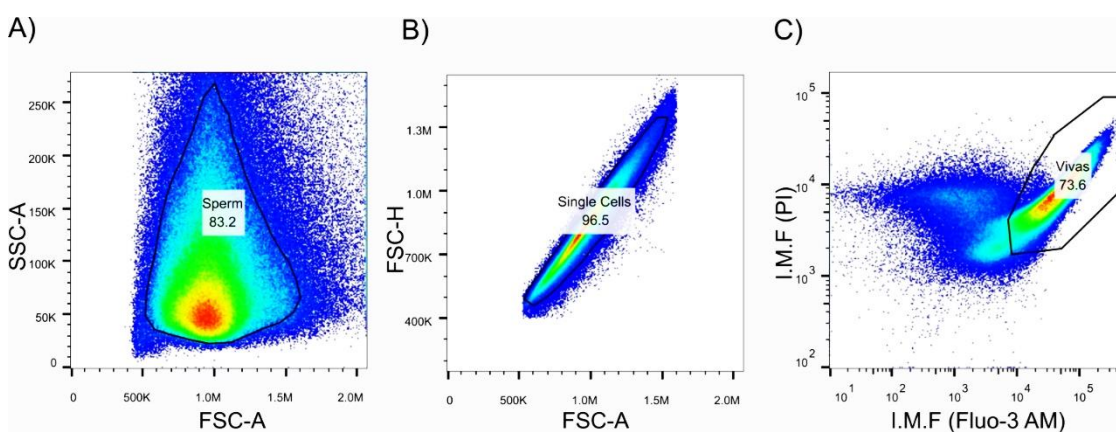


Figura 3: Adquisición de datos por citometría de flujo.

Gráfico representativo de: A) Selección de eventos espermáticos con la densidad del área de dispersión frontal (FSC-A) contra el área de dispersión lateral (SSC-A). B) Discriminación de dobles o agregados celulares con la densidad del área de dispersión frontal (FSC-A) contra la altura de dispersión frontal (FSC-H). C) Intensidad de fluorescencia de Fluo-3 (canal FITC) contra Ioduro de propidio (canal PE-A), lo que permite excluir células muertas. Las escalas de los ejes correspondientes a la fluorescencia se expresan en unidades arbitrarias (U.A.).

Los datos de fluorescencia correspondientes a los canales FITC-A y APC-A fueron registrados para evaluar, respectivamente, los cambios en $(Ca^{2+})_i$ y el potencial de membrana durante la estimulación con KCl. Posteriormente, las señales de fluorescencia y sus respectivos tiempos se exportaron en formato “.xlsx” y se procesaron mediante RStudio (versión 4.3.1).

La señal del canal FITC-A, asociada a la fluorescencia del indicador Fluo-3, se empleó para medir la dinámica de la respuesta en $(Ca^{2+})_i$. Estos datos fueron normalizados respecto al valor basal anterior a la adición de KCl, definido como F0. La normalización

se realizó mediante la fórmula $(F - F_0)$, estableciendo ese valor basal como cero para todos los trazos, con el fin de facilitar la comparación entre transitorios.

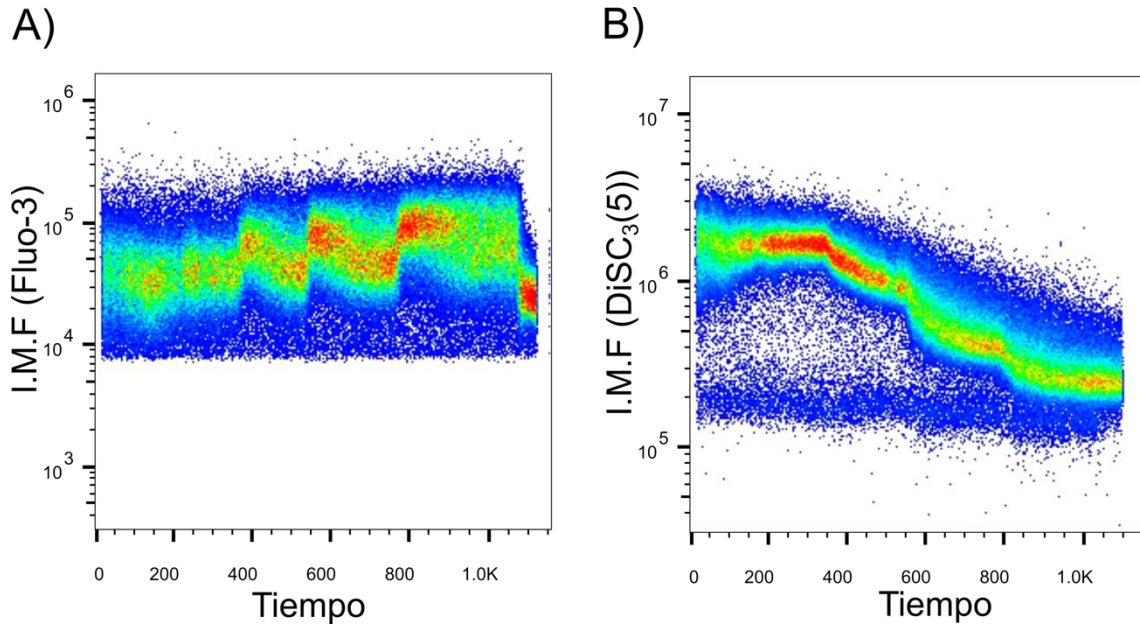


Figura 4: Selección de datos para evaluar la respuesta en $(Ca^{2+})_i$ y potencial de membrana.

(A) Gráfico representativo de los cambios en la intensidad de fluorescencia de fluo-3 (canal FITC-A) ocurridos en el tiempo y (B) cambios en la intensidad de fluorescencia de DiSC₃(5) (canal APC-A) ocurridos en el tiempo. Ambas medidas, tanto del Panel A y B, muestran la respuesta paralela en el tiempo a las adiciones de valinomicina (1 μ M), KCl (5, 10 y 15 mM), ionomicina 10 μ M y MnCl₂ 5 mM cuando se hace un registro para la calibración del Em. Las escalas de los ejes x correspondientes a la fluorescencia se expresan en unidades arbitrarias (U.A.).

6.9.2.1 Calculo de Tau up, Tau down, tiempo de respuesta y amplitud

En cada intervalo correspondiente a las adiciones de KCl (5, 10 y 15 mM), se analizan los registros de fluorescencia normalizada para calcular parámetros cinéticos que describen la dinámica de la señal de $(Ca^{2+})_i$ (Figura 5). Se identificó el valor máximo de fluorescencia (Valor_Max), que corresponde al pico de activación inducido por el estímulo, y el valor mínimo que lo precede (Valor_Min), considerado como el nivel basal antes de la activación. A partir de estos puntos se calcula la amplitud de la respuesta como la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo previo ($\text{Amplitud} = \text{Valor_Max} - \text{Valor_Min}$), lo cual refleja la magnitud del cambio inducido.

El tiempo de subida (Tau_Up) se define como el intervalo de tiempo necesario para que la señal alcance el 50 % de la amplitud desde el nivel basal, es decir, desde Valor_Min hasta el punto medio entre Valor_Min y Valor_Max. De manera

análoga, el tiempo de descenso (Tau_Down) se calcula como el tiempo que transcurre desde el pico (Valor_Max) hasta que la señal desciende nuevamente al 50 % de la amplitud, en dirección hacia el valor mínimo posterior (Valor_Min D), el cual representa el nivel de retorno tras la activación.

Ambos tiempos (Tau_Up y Tau_Down) permiten caracterizar la cinética de activación y recuperación del transitorio de $(Ca^{2+})_i$. Finalmente, el tiempo total de respuesta se determina como la suma de los tiempos totales de subida y bajada, proporcionando una medida integrada de la duración del evento de señalización asociado a cada estímulo.

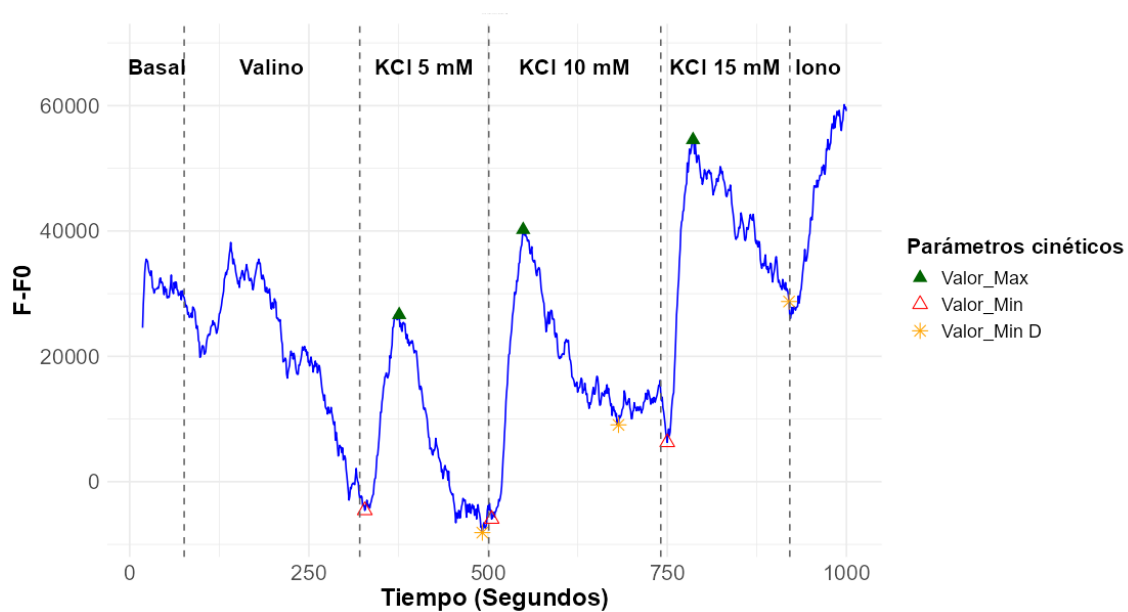


Figura 5. Parámetros cinéticos.

Gráfico representativo con los puntos de referencia para el cálculo de la amplitud, Tau up, Tau down y el tiempo de respuesta por adición de KCl (5, 10, 15 mM).

6.9.2.2 Cálculo del potencial de membrana

Para determinar el potencial de membrana basal, se inició con una medición continua de la fluorescencia de las células durante un minuto, periodo que corresponde al potencial en reposo. A continuación, se añadió valinomicina a 2 μ M, un ionóforo específico de K^+ , y se registró la señal de fluorescencia durante al menos tres minutos hasta observar su estabilización, lo que indica que el potencial de membrana se ha igualado al potencial de

equilibrio de K^+ (aprox. -84 mV) en función de las concentraciones intra- y extracelulares del ion (Matamoros-Volante et al., 2020). Seguidamente, se realizaron adiciones sucesivas de KCl a concentraciones de 5, 10, 15 mM para incrementar de forma controlada la concentración extracelular de K^+ y generar despolarizaciones del Em. Los valores de fluorescencia obtenidos tras cada adición permitieron construir una curva de calibración en la que cada punto relaciona la intensidad de fluorescencia con el potencial de membrana teórico, calculado mediante la ecuación de Nernst (Figura 6), permitiendo calcular el potencial de membrana basal y comparar las condiciones no capacitantes y capacitantes.

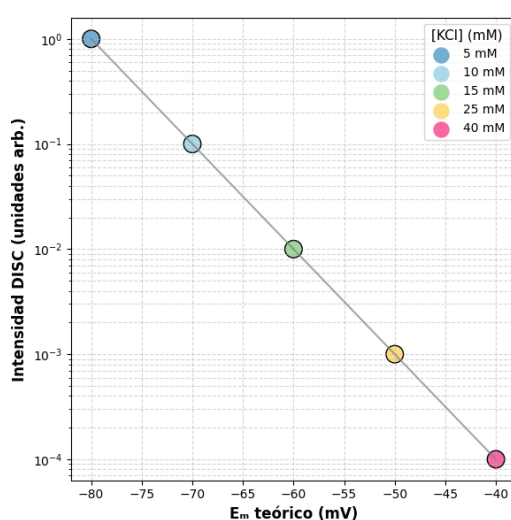


Figura 6. Gráfico representativo del cálculo del potencial de membrana.

Relación entre el potencial de membrana teórico y la intensidad de fluorescencia. Se graficó la mediana de los valores de fluorescencia del DiSC₃(5) obtenidos en las diferentes condiciones de concentración de KCl contra el valor teórico de Em, calculado mediante la ecuación de Nernst. La línea entre los puntos representa un ajuste lineal.

6.9.3 Microscopía

Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. Para cada serie de tiempo correspondiente a los distintos intervalos del protocolo experimental, se agruparon las imágenes de los dos canales registrados: Fluo-3 AM y PNA-Alexa647. En el caso de PNA-Alexa647, la evaluación consistió en identificar células con señal positiva en la zona del acrosoma de la célula, consideradas como PNA-positivas, indicando reacción acrosomal.

Para el análisis cuantitativo de la señal de $(Ca^{2+})_i$, se realizó una corrección del fondo (background subtraction), seguida de la delimitación manual de regiones de interés (ROIs) localizadas en tres regiones del espermatozoide: cabeza, pieza media (PM) y pieza principal (PP) (Figura 7). Adicionalmente, se seleccionó un ROI en una zona libre de células para registrar el fondo, para restarlo nuevamente de cada medición. De cada ROI se extrajo el valor promedio de intensidad de fluorescencia (*mean gray value*), y se corrige del fondo y es normalizado mediante la fórmula $(F/F_0) - 1$, donde F_0 corresponde a la señal basal previa a las adiciones del protocolo; para posteriormente analizar los cambios relativos en la señal de $(Ca^{2+})_i$ en respuesta a los estímulos.

Se evaluaron las células obtenidas de tres donadores independientes, con un número variable de espermatozoides analizados por cada región del espermatozoide, dependiendo de su posición en el campo.

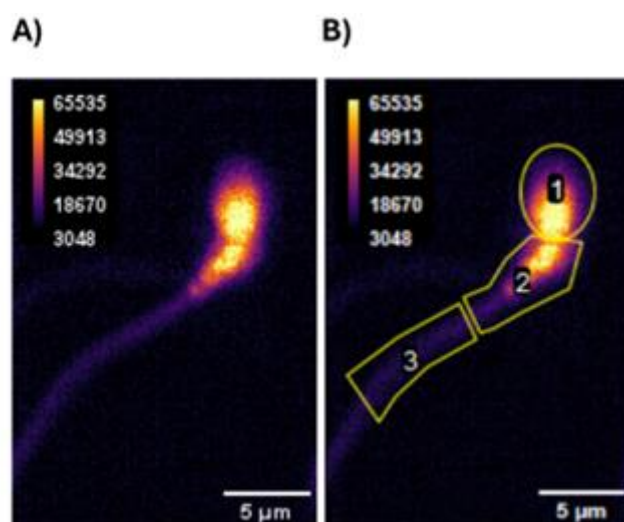


Figura 7. Regionalización del espermatozoide para el análisis de fluorescencia.

A) Imagen representativa de un espermatozoide dentro del campo visual, B) selección de las regiones de interés (ROIs) para el análisis: 1) Cabeza, 2) Pieza media (PM) y 3) Pieza principal (PP). La barra de calibración indica los valores de gris (intensidad de píxel) en unidades arbitrarias.

7. Resultados

Para cumplir con el objetivo general del presente trabajo, se plantearon distintos objetivos específicos; el primero de ellos busca corroborar la existencia de transitorios de $(Ca^{2+})_i$ inducidos por la despolarización con adiciones de KCl, cuya observación fue inicialmente reportada por distintos proyectos del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide, donde, al aplicar una serie de pulsos de KCl con fines de estimar el potencial de membrana

mediante una calibración y con el uso de la ecuación de Nernst, se evidenció que cuando se hace una tinción paralela con Fluo-3 AM se observaron aumentos transitorios en la intensidad de fluorescencia de $(Ca^{2+})_i$ en espermatozoides humanos.

Con base en este antecedente, en el presente trabajo se adaptó y validó el protocolo descrito por el Consorcio, empleando condiciones estandarizadas que incluyen el número de células, las concentraciones de reactivos y el uso del colorante Fluo-3 AM para detectar $(Ca^{2+})_i$. De manera inicial se utilizaron dos metodologías complementarias, espectrofluorimetría y citometría de flujo, con el objetivo de confirmar y caracterizar estos incrementos transitorios de la intensidad de la fluorescencia.

7.1 Presencia de incrementos transitorios en la intensidad de fluorescencia de calcio intracelular en espermatozoides tras la adición escalonada con KCl

Ambas técnicas; espectrofluorimetría y citometría de flujo, confirmaron la presencia de incrementos transitorios en la intensidad de fluorescencia de $(Ca^{2+})_i$ inducidos por pulsos de KCl. Estos transitorios se caracterizan por un aumento rápido en la señal de fluorescencia, seguido de un decaimiento cercano al nivel basal previo a la adición del estímulo (Figuras 8 y 9). Aunque ambas metodologías corroboran este fenómeno, se observaron diferencias respecto a la amplitud de las respuestas y la variabilidad entre donadores tanto en las condiciones capacitantes como no capacitantes.

Mediante espectrofluorimetría, los transitorios de $(Ca^{2+})_i$ resultaron reproducibles y mantuvieron un patrón de incremento tras cada pulso de KCl (principalmente el tercer y cuarto pulso), presentando únicamente ligeras variaciones entre los cuatro donadores analizados (Figura 8). Cabe señalar que los trazos muestran una deriva ascendente en la línea basal, fenómeno que no se observa en citometría de flujo, lo que nos lleva a señalar que, a diferencia de la citometría de flujo, esta técnica únicamente nos permite promediar la señal de fluorescencia de toda la población celular sin posibilidad de discriminar eventos individuales o aplicar exclusiones específicas.

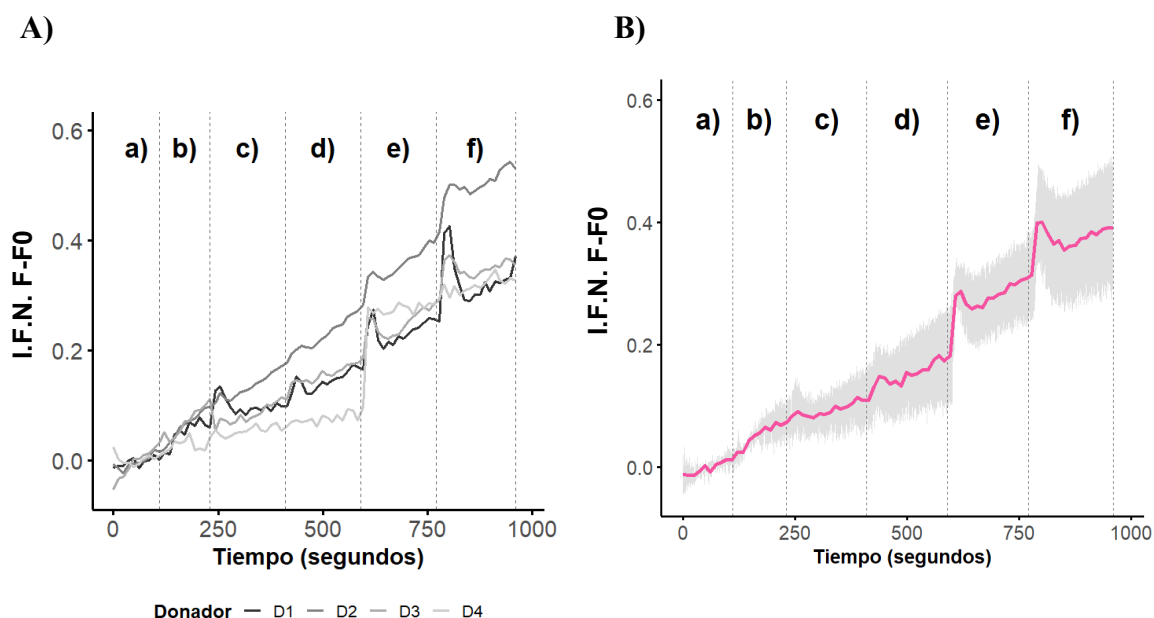


Figura 8. La estimulación escalonada con KCl induce aumentos transitorios en los niveles de $(Ca^{2+})_i$, evaluados mediante espectrofluorometría.

Panel A) Trazos individuales de la señal de $(Ca^{2+})_i$ para cada donador ($n=4$). Panel B) Promedio de la respuesta para cada tratamiento. Las adiciones se realizaron en el siguiente orden: a) Basal, b) Valinomicina ($1\ \mu M$), c) KCl ($5\ mM$), d) KCl ($10\ mM$), e) KCl ($15\ mM$) y f) KCl ($25\ mM$). El sombreado representa el error estándar de la media (SEM) y la intensidad de fluorescencia se muestra como señal normalizada (IFN).

Para el protocolo por citometría de flujo, se implementó una modificación al final de cada medición con la adición secuencial de ionomicina $10\ \mu M$ y $MnCl_2\ 5\ mM$ para obtener valores máximos y mínimos de fluorescencia como parte de un control de funcionalidad de las células y que además permite la normalización de los datos. Es importante destacar que esta técnica nos permite discriminar las células muertas y agregados celulares, quedándonos únicamente con la población viable.

También se observó una variación notable en la amplitud de los transitorios entre los ocho donadores analizados, demostrando heterogeneidad individual en la respuesta celular (Figura 9).

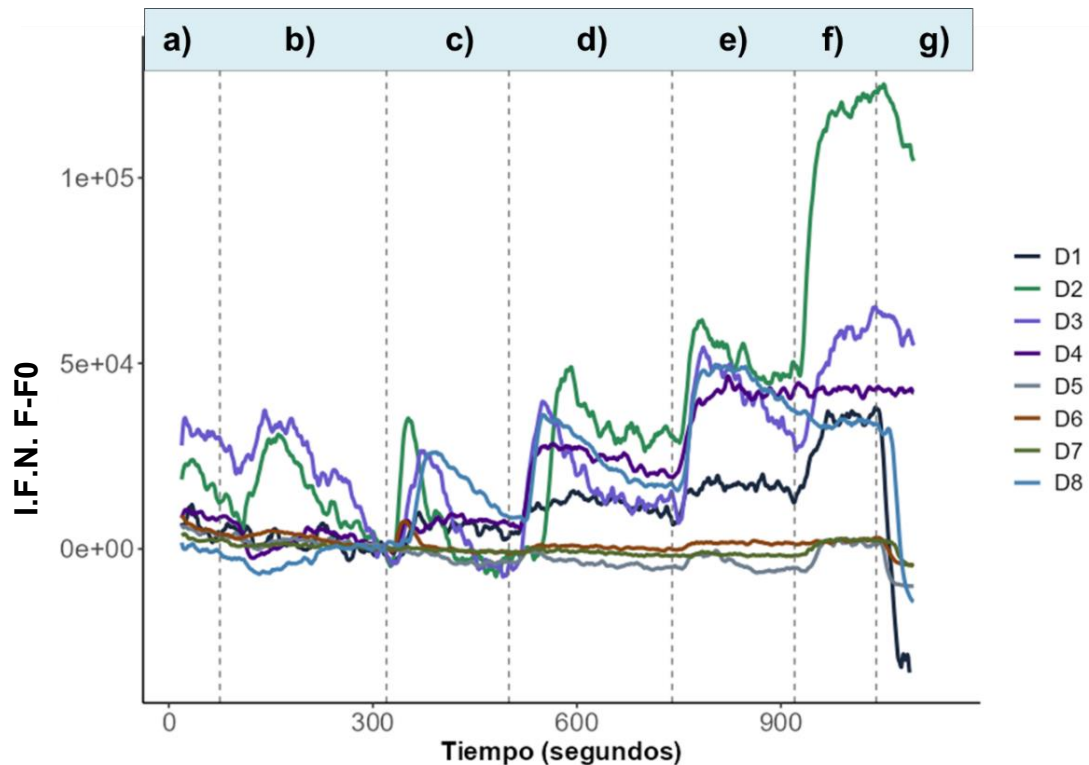


Figura 9. Respuesta de $(Ca^{2+})_i$ evaluada mediante citometría de flujo.

Trazos individuales de la intensidad de fluorescencia normalizada (IFN) de la señal de $(Ca^{2+})_i$ para cada donador (n=8). Se muestra la respuesta al protocolo de adiciones: a) Basal, b) Valinomicina (1 μ M), c) KCl (5 mM), d) KCl (10 mM), e) KCl (15 mM), f) Ionomicina (10 μ M) y g) $MnCl_2$ (5 mM).

7.2 Inhibidores específicos reducen la amplitud de los transitorios de calcio inducidos por KCl.

Para abordar el segundo objetivo, se enfocó la atención en la amplitud de los transitorios de $(Ca^{2+})_i$ previamente identificados como respuesta a la adición de KCl.

Con el fin de evaluar la participación de distintos canales iónicos en la generación de transitorios de $(Ca^{2+})_i$, se propuso una batería de inhibidores de diferentes canales y se registraron señales de fluorescencia para medir $(Ca^{2+})_i$ y se comparó con la condición control. En la Figura 10, se muestran los trazos representativos obtenidos por espectrofluorimetría tras la estimulación escalonada con KCl en presencia o ausencia de inhibidores.

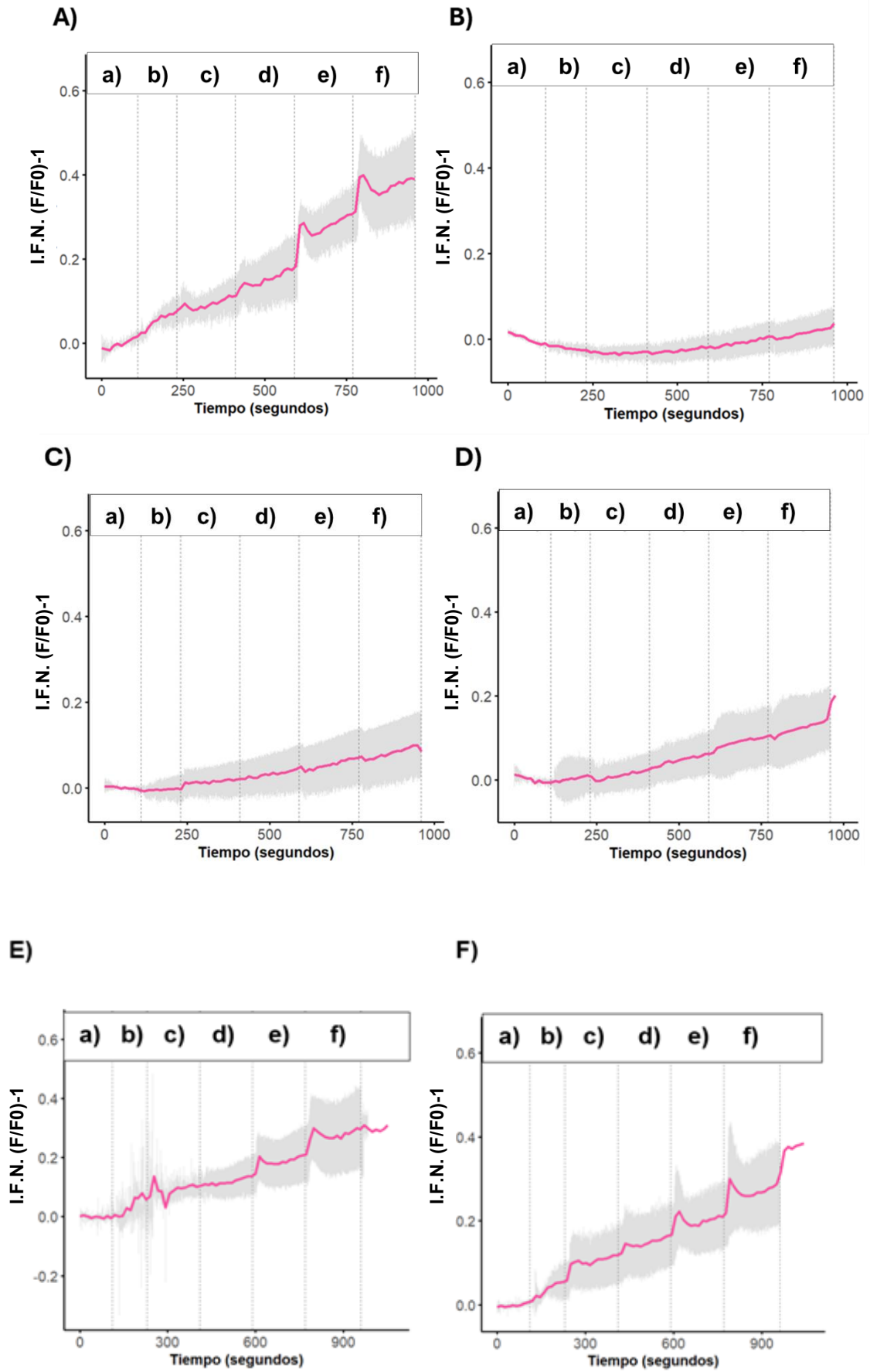


Figura 10. : La presencia de algunos inhibidores reduce la amplitud de los transitorios de $(Ca^{2+})_i$ evaluados por espectrofluorometría.

Se aplicó el siguiente protocolo de adiciones a los espermatozoides: a) Basal, b) Valinomicina (1 μ M), c) KCl (5 mM), d) KCl (10 mM), e) KCl (15 mM) y f) KCl (25 mM) bajo las condiciones de A) control capacitado, B) NNC (10 μ M), C) mibefradil (10 μ M), D) clofilium (50 μ M), E) penitrem (100 nM) y F) SloTX (100 nM). Se presenta el promedio de todos los donadores (n=4) con sombreado que representa el error estándar de la media y la intensidad de fluorescencia se muestra como señal normalizada (IFN).

En la condición control, los espermatozoides respondieron a cada adición de KCl con un incremento progresivo en la señal de fluorescencia, resultando en incrementos transitorios de $(Ca^{2+})_i$ dependientes del grado de despolarización. En contraste, el tratamiento con NNC 55-0396 (10 μ M), mibefradil (10 μ M) y clofilium (50 μ M), produjeron una atenuación evidente de la respuesta, sugiriendo una reducción en la entrada de Ca^{2+} ; por el contrario, los inhibidores como penitrem y SloTX no mostraron un efecto significativo.

Mediante la prueba estadística *t* de Student, se confirmó que con las cuatro concentraciones evaluadas (5, 10, 15 y 25 mM), la amplitud de los transitorios se redujo significativamente comparadas con el control capacitado en los tratamientos con NNC ($p = .001$, $p = .009$, $p < .001$ y $p < .001$), mibefradil ($p = .002$, $p = 0.017$, $p < .001$ y $p < .001$) y clofilium ($p = .014$, $p = .043$, $p = .006$ y $p = .002$). Por el contrario, penitrem y SloTX no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control capacitado (Figura 11).

Los valores de promedio, error estándar (EE) y *p* utilizados en este análisis se encuentran en el Anexo 3.

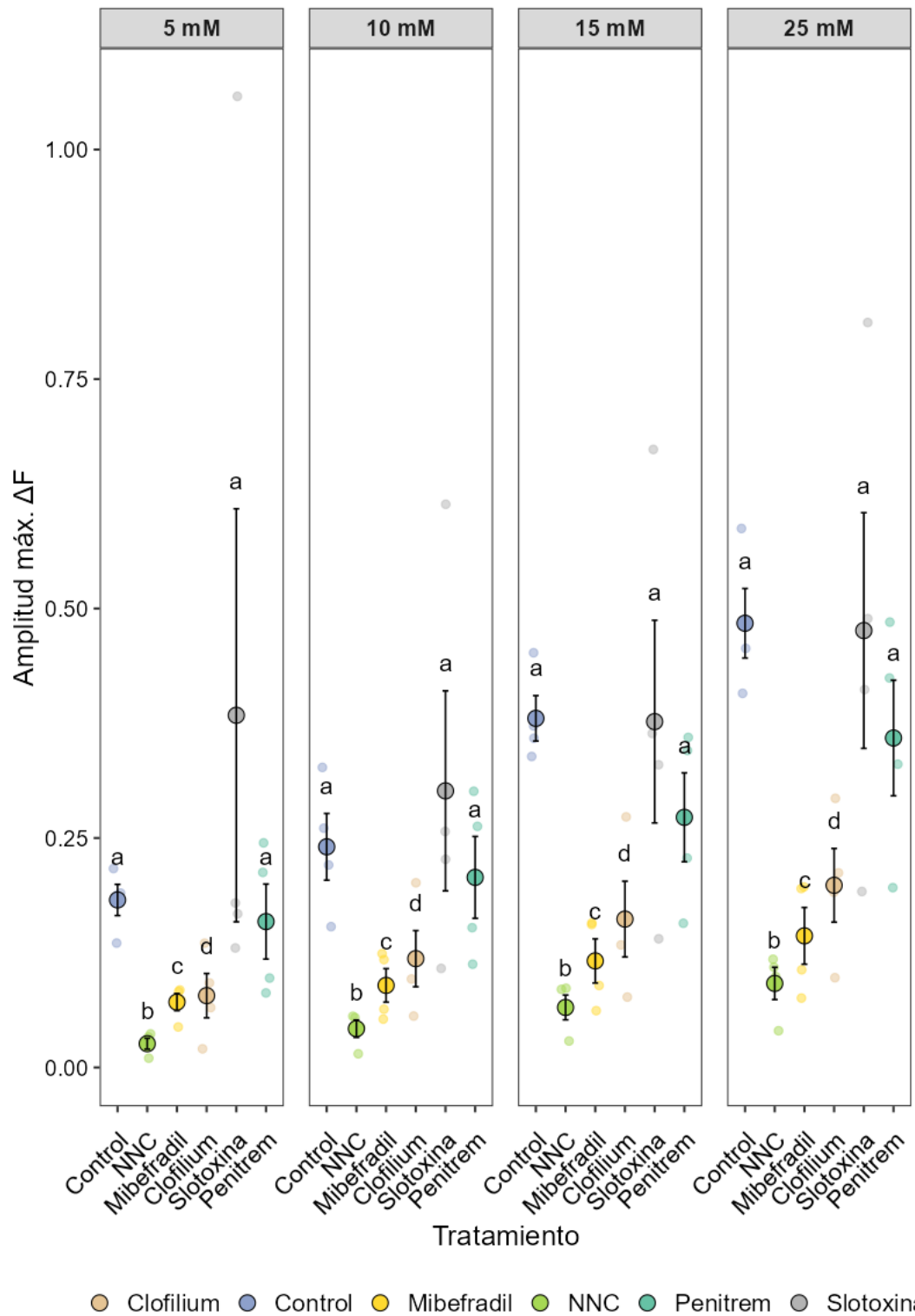
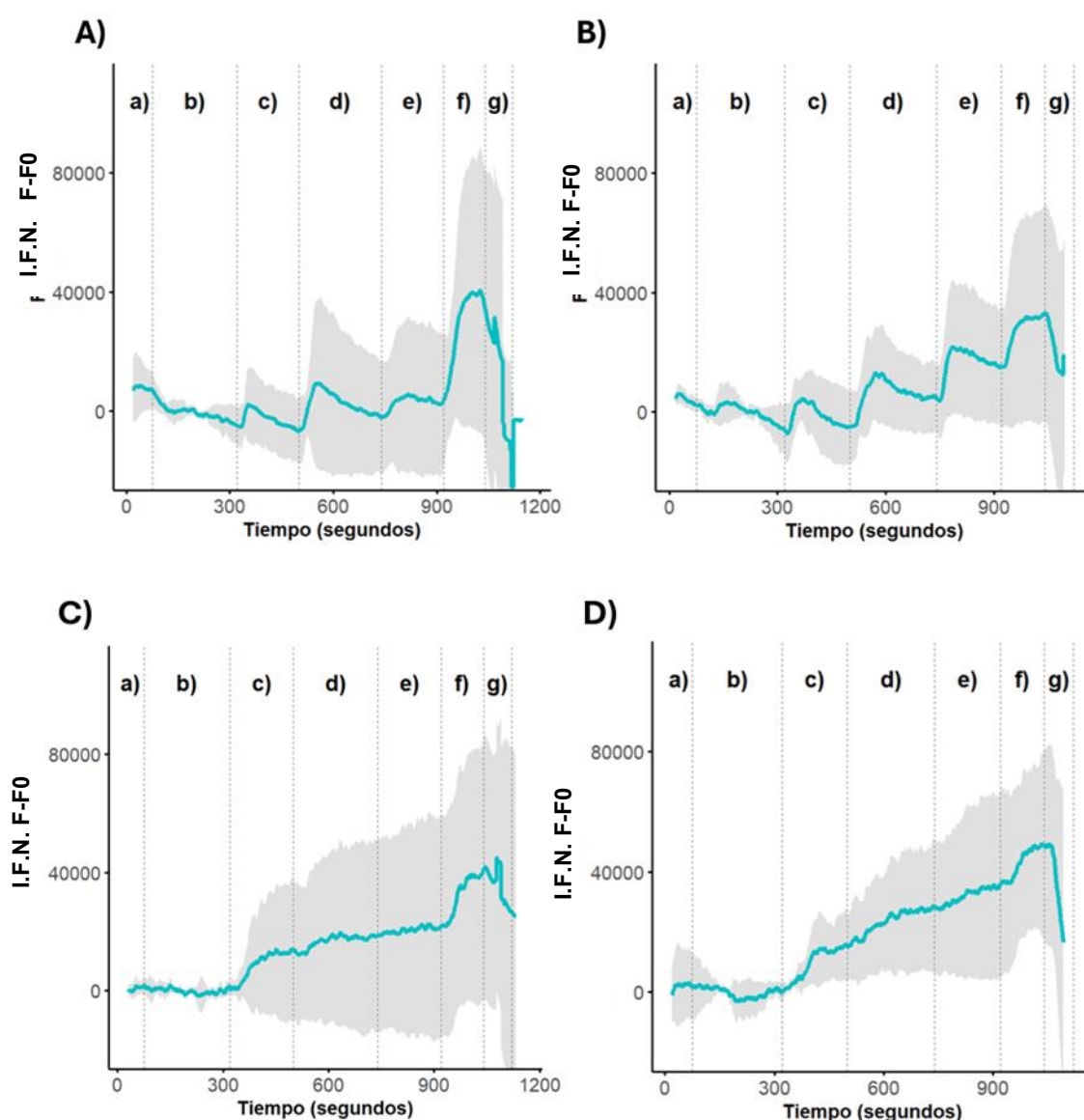


Figura 11. Los Inhibidores de *CatSper* y *Slo3* disminuyen significativamente la amplitud de los transitorios de Ca^{2+}

Se representa la amplitud máxima ΔF para cada donador ($n = 4$) bajo las diferentes concentraciones de KCl (5, 10, 15 y 25 mM), evaluadas en presencia de los distintos tratamientos: A) control capacitado, B) NNC (10 μM), C) mibefradil (10 μM), D) clofilium (50 μM), E) penitrem (100 nM) y F) SloTX a (100 nM). Cada punto muestra la media y el error estándar. Las

letras sobre los puntos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos con respecto al control dentro de una misma concentración ($p < .05$), determinadas mediante la prueba t de Student. Previamente, se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, confirmando su distribución normal.

Esta tendencia se replicó en los trazos promedio obtenidos por citometría de flujo, donde además se incorporó la condición no capacitada (NC) como parte del segundo objetivo planteado en este trabajo. En esta, las respuestas no disminuyeron de forma general, sino que variaron según la concentración de KCl administrada, encontrándose la amplitud del transitorio disminuido únicamente en la tercera adición de KCl, además en contraste con los experimentos en espectrofluorimetría en el caso del tratamiento con Clofilium (50 μM), sí se observaron transitorios, aunque con amplitudes reducidas (Figura 12).



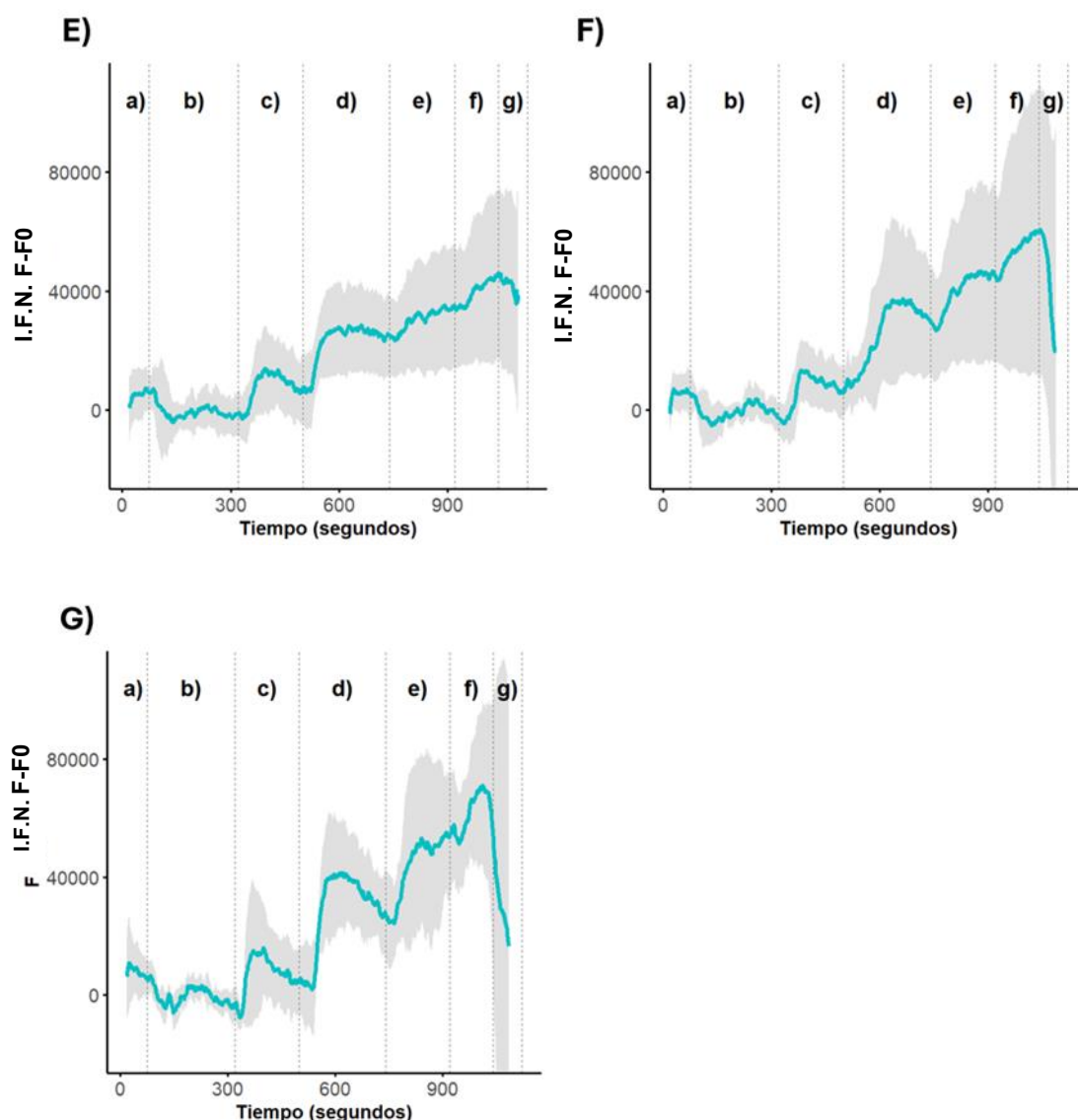


Figura 12. Los inhibidores y la condición no capacitada muestran atenuación de los transitorios de $(Ca^{2+})_i$.

Los gráficos muestran el promedio de la fluorescencia de $(Ca^{2+})_i$ normalizada a lo largo del tiempo, tras la adición secuencial de: a) Basal, b) Valinomicina (1 μ M), c) KCl (5 mM), d) KCl (10 mM), e) KCl (15 mM), f) ionomicina 10 μ M, g) $MnCl_2$ 5 mM ; bajo las siguientes condiciones experimentales: A) control no capacitado (NC), B) control capacitado (CAP) (n=8), C) NNC (10 μ M), D) mibefradil (10 μ M), E) clofilium (50 μ M), F) penitrem (100 nM) y G) SloTX (100 nM) (n=6). Se presenta el promedio de todos los donadores con sombreado que representa el error estándar de la media (SEM).

El análisis estadístico mediante la prueba U de Mann-Whitney respaldó los resultados previos (Figura 13). Tras la segunda adición de KCl (10mM), la amplitud de los transitorios tuvo una respuesta significativamente menor en comparación con el control CAP en los tratamientos con NNC ($p= .02$), mibefradil ($p= .03$) y clofilium ($p= .03$). En

la tercera adición, tanto NNC ($p=.04$) como la condición no capacitada ($p=.03$) presentaron una disminución significativa en la amplitud de los transitorios frente al control CAP; mientras que nuevamente penitrem y SloTX no mostraron cambios relevantes.

Los valores de la mediana, desviación estándar y p utilizados en este análisis se encuentran en el Anexo 4.

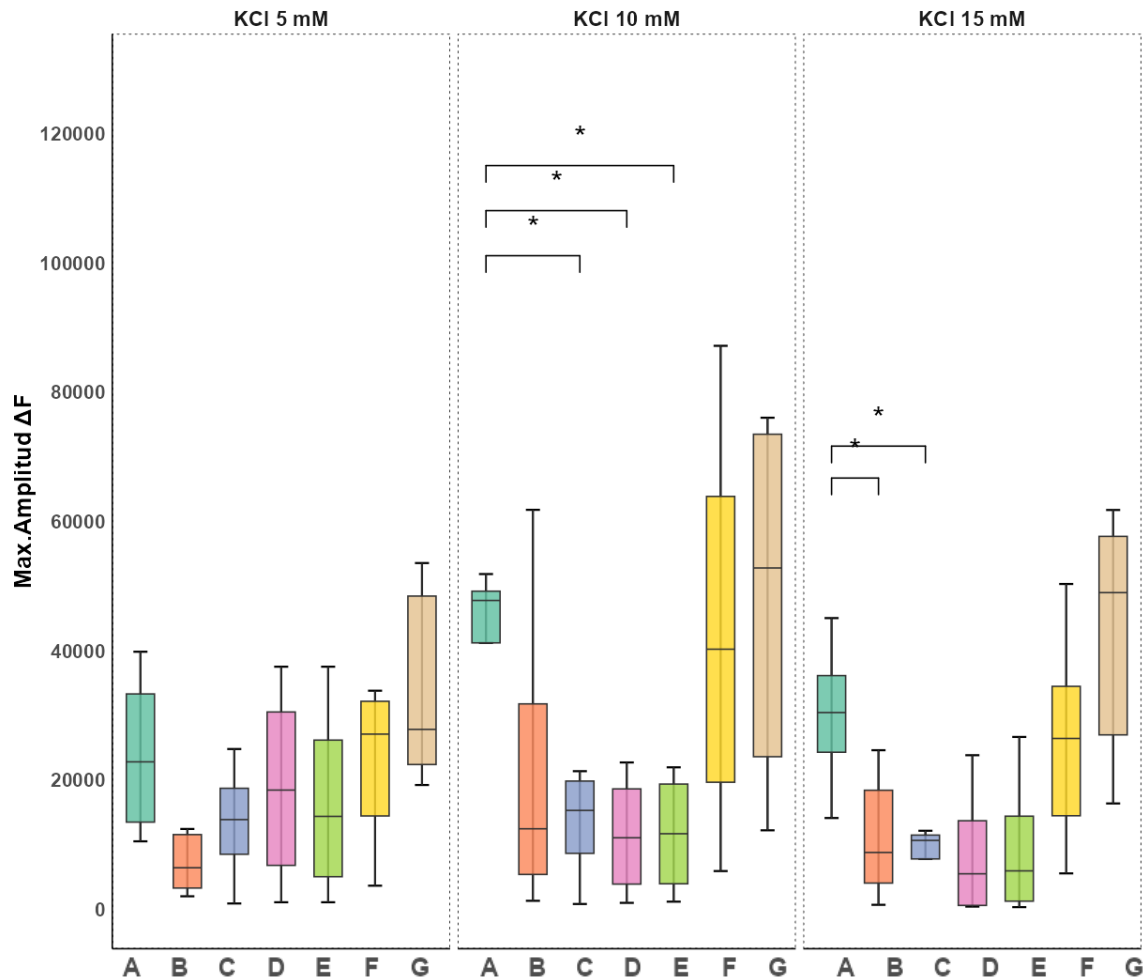


Figura 13. Inhibidores de *CatSper* y *Slo3* reducen significativamente la amplitud máxima del aumento de $(Ca^{2+})_i$.

Se muestra la distribución de la amplitud máxima de la respuesta de $(Ca^{2+})_i$ tras la adición de KCl a concentraciones de 5, 10 y 15 mM en los distintos tratamientos: A) Control (CAP), B) control (NC) ($n=8$), C) NNC (10 μ M), D) clofilium (50 μ M), E) mibefradil (10 μ M), F) penitrem (100 nM) y G) SloTX (100 nM) ($n=6$). Cada caja muestra la mediana, los cuartiles. Las diferencias significativas entre tratamientos se determinaron utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Los valores de $p < .05$ (*) se consideran significativos en comparación con el control (CAP).

Posteriormente para complementar el análisis de la respuesta se determinaron los valores de Tau up y Tau Down, así como el tiempo de respuesta total del transitorio y se hizo la comparación entre las diferentes condiciones (Figura 14).

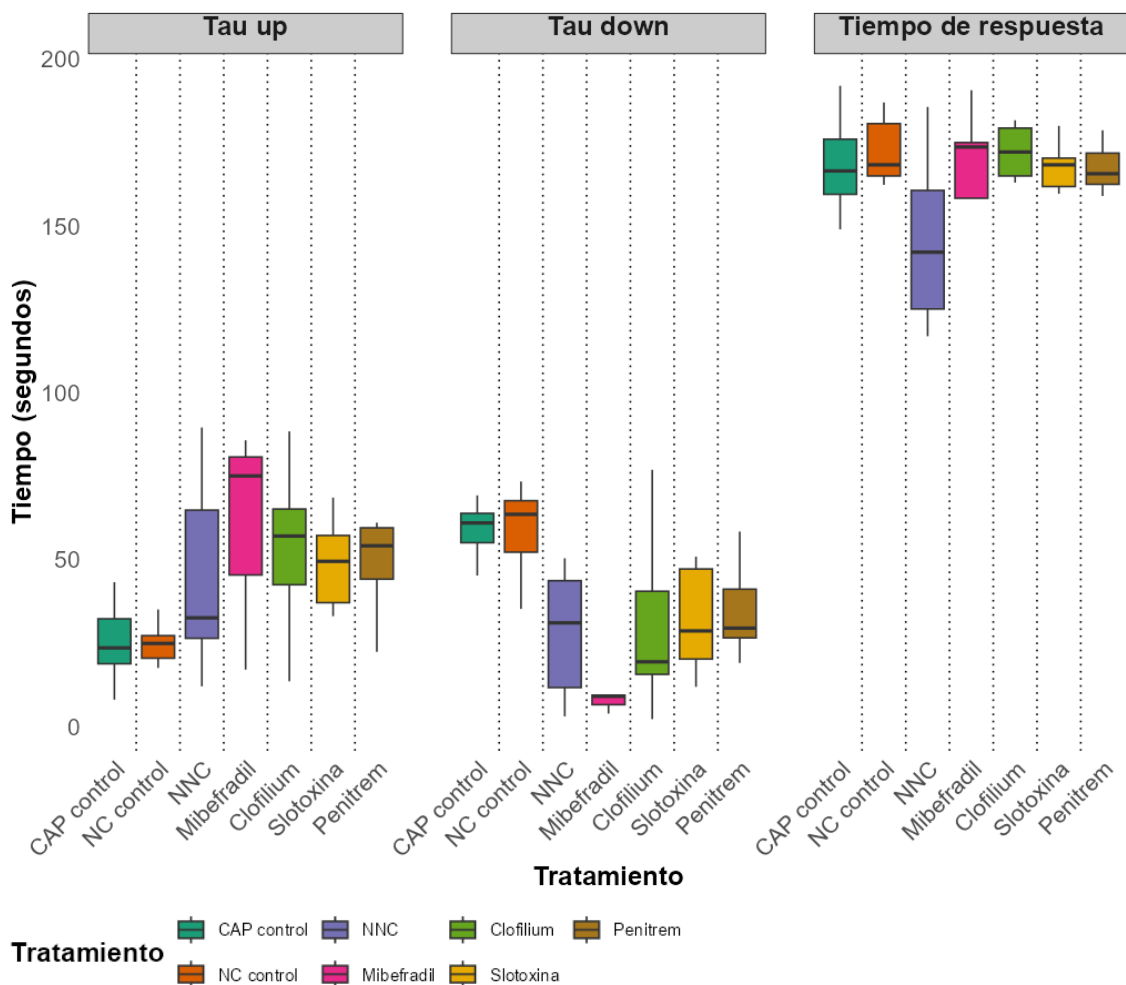


Figura 14. Las fases *Tau up*, *Tau down* y el tiempo de respuesta de los transitorios de $(Ca^{2+})_i$ varían entre tratamientos

Se muestra la distribución de los tiempos *Tau up* (fase ascendente), *Tau down* (fase descendente) y tiempo de respuesta de los transitorios de $(Ca^{2+})_i$ bajo las diferentes condiciones. Los cuadros representan la distribución de los valores promedio de las tres adiciones de KCl para cada condición. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante el test de Kruskal-Wallis seguido de comparaciones múltiples con el test de Dunn ajustado por Bonferroni. No se encontraron diferencias significativas ($p > .05$) entre los tratamientos en comparación con el control CAP.

En el caso de *Tau up*, tanto el control capacitado (CAP) como el no capacitado (NC) muestran valores más bajos, mientras que NNC y Mibefradil alcanzan valores mayores, indicando una fase ascendente más prolongada. Clofilium, SloTX y Penitrem presentan medianas intermedias con una dispersión más homogénea.

Para *Tau down*, la mayoría de las condiciones exhiben valores dentro de un rango similar, con excepción de NNC, que destaca con valores considerablemente menores, reflejando un retorno más rápido a los niveles basales debido a como se observó anteriormente una amplitud menor.

En cuanto al tiempo de respuesta, las distribuciones de los valores son relativamente similares entre la mayoría de los tratamientos, con una ligera tendencia hacia valores más elevados en NC control y NNC.

7.3 Evaluación del potencial de membrana y su asociación con los transitorios de Ca^{2+} durante la capacitación.

Como se describió en la estrategia experimental, la citometría de flujo nos permite evaluar distintos parámetros a la vez con la tinción en este caso de *Fluo-3 AM* y *DiSC₃(5)*, que nos permiten observar la respuesta en $(\text{Ca}^{2+})_i$ en conjunto con la calibración del potencial de membrana (Figura 15).

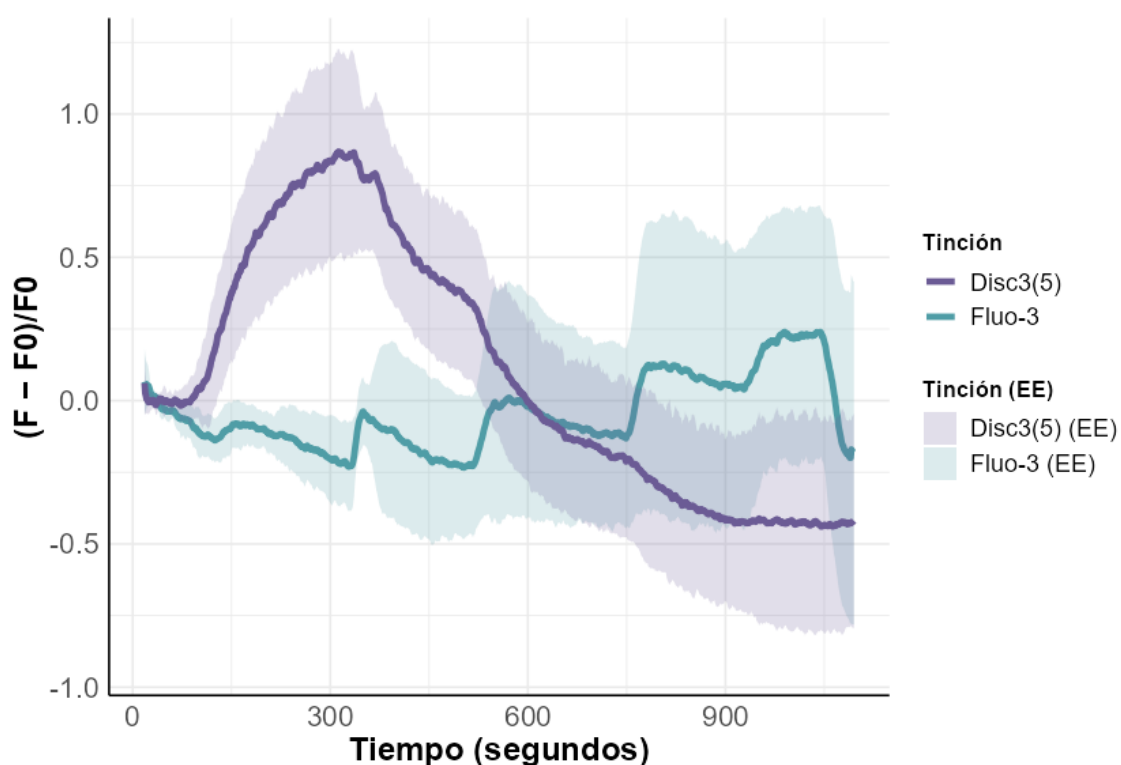


Figura 15. La citometría de flujo permite la medición simultánea de la señal de *Fluo-3* y *DiSC₃(5)* en espermatozoides humanos.

Promedio de fluorescencia normalizada a lo largo del tiempo para dos grupos de trazos: *Fluo-3* y *DiSC₃(5)* ($n = 8$) en la condición control CAP. Las líneas representan el valor medio y las áreas sombreadas indican el error estándar (EE) para cada grupo.

Para relacionar los cambios en el potencial de membrana con los transitorios de $(\text{Ca}^{2+})_i$, se calcularon los valores correspondientes tanto para la condición no capacitada (NC) como para la capacitada (CAP). En primer lugar, se determinó si los espermatozoides provenientes de distintos donadores se encontraban hiperpolarizados (Figura 16).

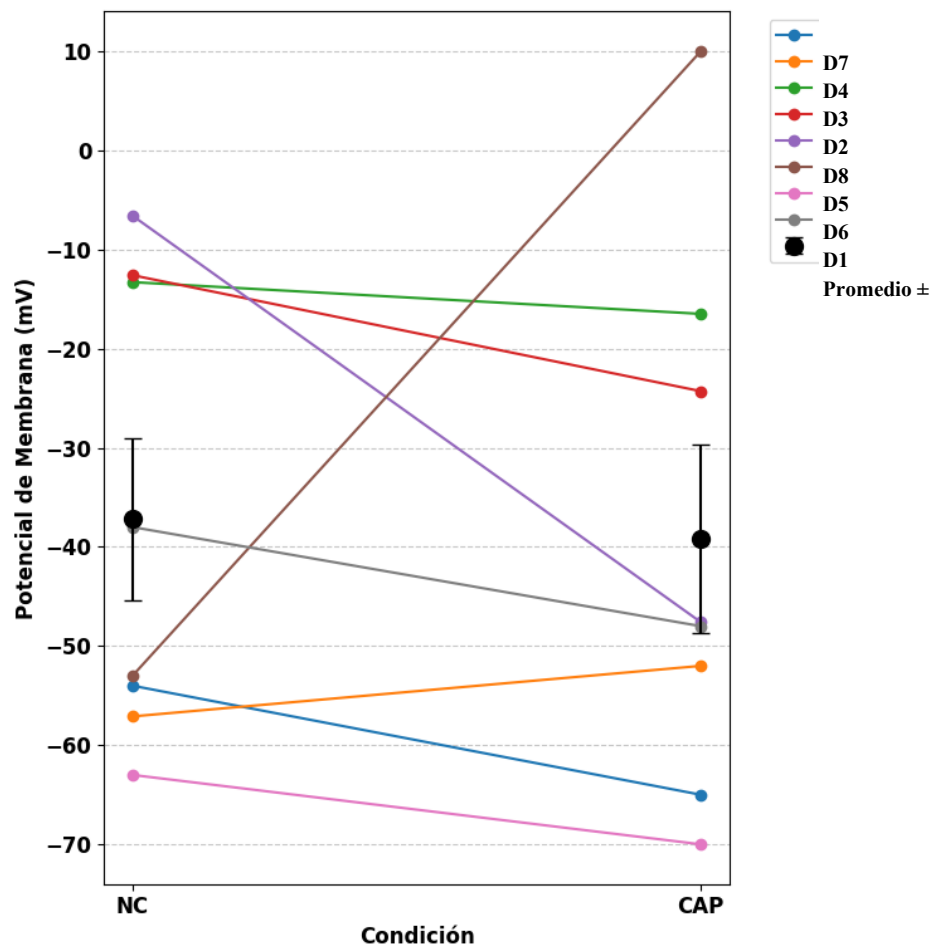


Figura 16. La capacitación induce una hiperpolarización del potencial de membrana en espermatozoides.

Comparación del potencial de membrana en condiciones NC y CAP para cada donador. Cada línea conecta los valores individuales. Los puntos negros con líneas verticales indican la media $\pm$ error estándar de la media para cada condición. Se realizó una prueba t pareada entre NC y CAP, no se encontraron diferencias significativas ($p = .855$).

Para determinar la hiperpolarización se calculó el cambio en el potencial de membrana (ΔE_m) a partir de la diferencia entre E_m en CAP y NC ($\Delta E_m = CAP - NC$); se consideró despolarización cuando ΔE_m fue mayor a +5 mV, hiperpolarización cuando fue menor a -5 mV, y sin cambio significativo cuando ΔE_m se encontró dentro del rango de ± 5 mV (Tabla 3) (Matamoros-Volante et al., 2020).

Donador	CAP (mV)	NC (mV)	ΔE_m (mV)	Clasificación
D1	-48	-38	-10	Hiperpolarización
D2	-24.3	-12.6	-11.7	Hiperpolarización
D3	-47.6	-6.6	-41	Hiperpolarización
D4	-52	-57.1	5.1	Depolarización
D5	10	-53	63	Depolarización

D6	-70	-63	-7	Hiperpolarización
D7	-54	-65	-11	Hiperpolarización
D8	-47.6	-6.6	-41	Hiperpolarización

Tabla 3. Clasificación por donador de la hiperpolarización y despolarización.

Del total de los ocho donadores evaluados, únicamente dos mostraron una respuesta de despolarización, en contraste con el resto que presentó una tendencia hacia la hiperpolarización. No obstante, dentro de este grupo, se observa una distribución heterogénea en los niveles de cambio del potencial de membrana (ΔE_m), con valores que oscilan desde 63 mV hasta -41 mV (Tabla 3).

Por último, se comparó el valor promedio de amplitud de la respuesta en $(Ca^{2+})_i$ con respecto a su valor de potencial de membrana por donador tras la capacitación para ver si existía una tendencia entre ambas respuestas.

Entre los donadores que mostraron hiperpolarización tras la capacitación, se observó una mayor amplitud del transitorio de $(Ca^{2+})_i$ en la condición capacitada, con excepción de un único caso en el que la amplitud fue menor. En contraste, aquellos que presentaron despolarización después de la capacitación exhibieron una disminución en la amplitud del transitorio de $(Ca^{2+})_i$ en dicha condición. Es importante mencionar que solo se contó con dos donadores despolarizados, no fue posible realizar un análisis estadístico, aunque se aprecia un patrón claro (Figura 17).

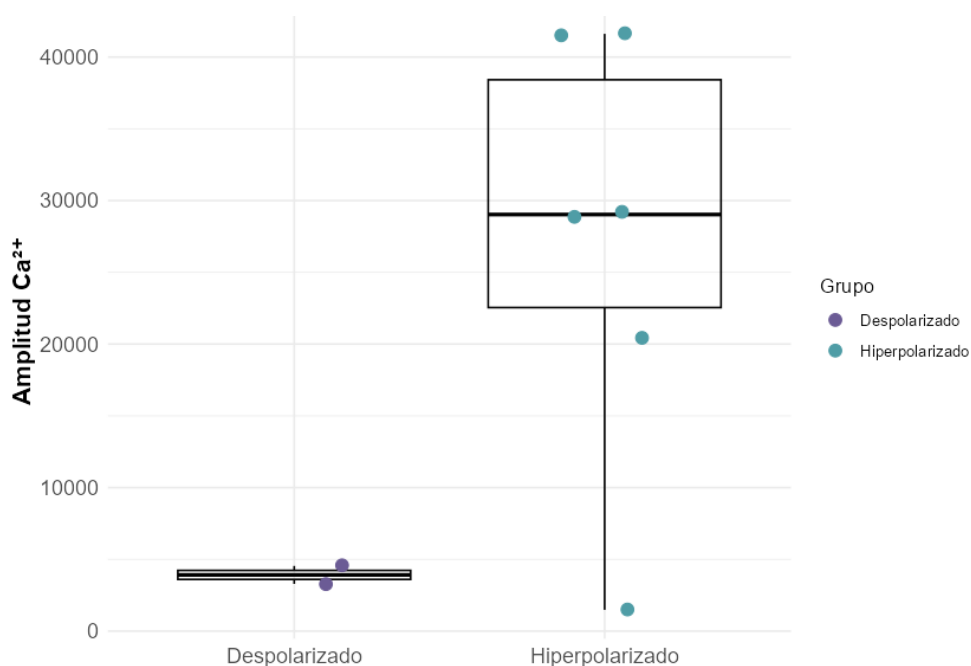


Figura 17. La hiperpolarización del potencial de membrana durante la capacitación se asocia con un aumento en la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} .

Boxplot comparativo de la amplitud promedio del transitorio de $(Ca^{2+})_i$ en espermatozoides en hiperpolarización (azul) o despolarización (morado) del potencial de membrana tras la capacitación. El gráfico muestra los valores individuales correspondientes a cada donador.

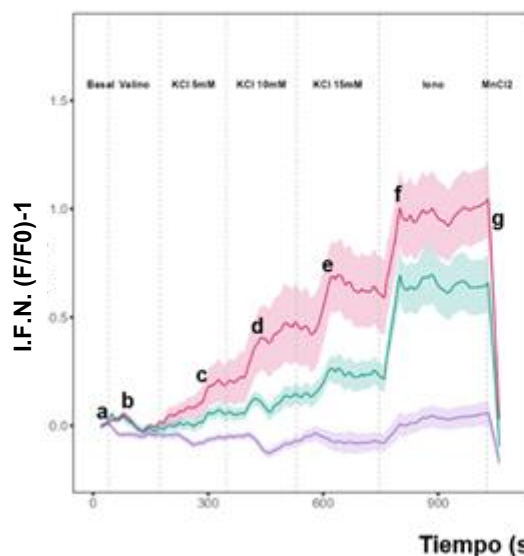
7.4 Evaluación del efecto de la depolarización en regiones específicas del espermatozoide

Aunque los dos objetivos principales del estudio ya habían sido abordados, con el propósito de ampliar la perspectiva del estudio se integró información espacial a la resolución temporal previamente obtenida mediante citometría de flujo y espectrofluorometría; esto adaptando el protocolo anteriormente utilizado pero ahora para el análisis de células individuales mediante microscopía de epifluorescencia (utilizando el microscopio ONI), que permitió evaluar el efecto de la despolarización en distintas regiones del espermatozoide bajo las condiciones capacitante (CAP) y no capacitante (NC).

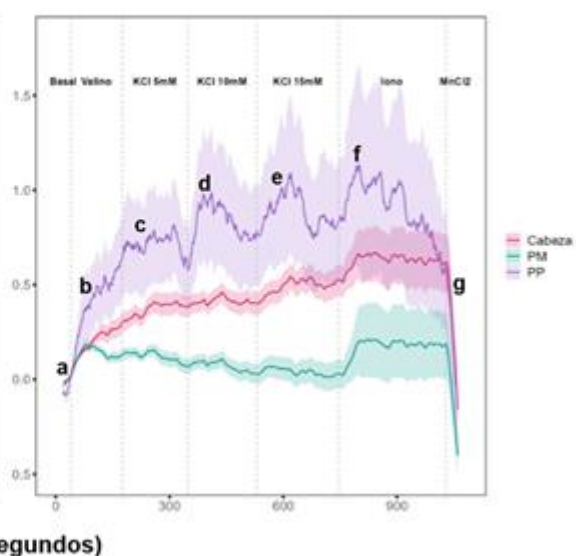
En la condición no capacitante, se observó una mayor intensidad de cambio en la fluorescencia en la región de la cabeza, seguida por la pieza media y, en menor medida, la pieza principal. En contraste, en la condición capacitada, la mayor respuesta se localizó en la pieza principal, seguida de la cabeza y finalmente la pieza media (figura 18).

A)

1)



2)



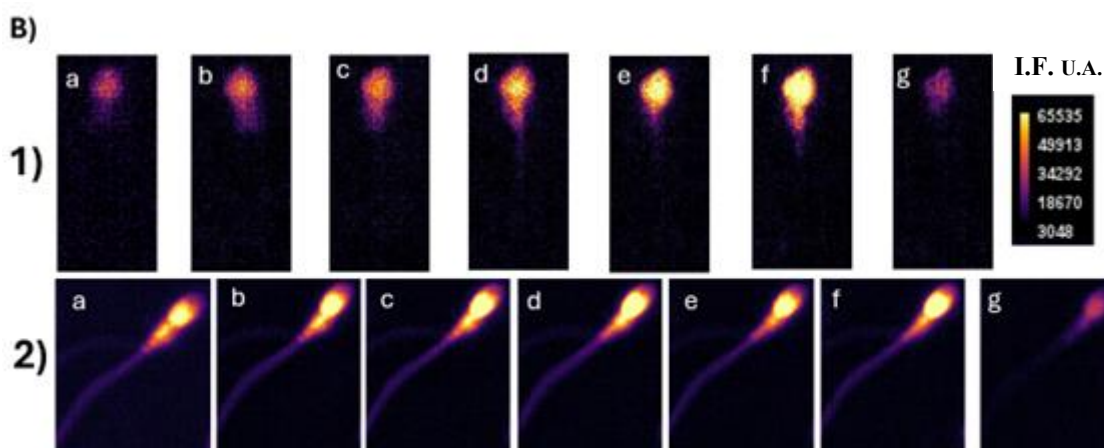


Figura 18. Existe una distribución diferencial de la señal de $(Ca^{2+})_i$ en regiones específicas tras estimulación con KCl.

Regionalización de la dinámica del $(Ca^{2+})_i$ inducida por KCl. A) Trazos promedio de la intensidad de fluorescencia normalizada (IFN) de la señal de $(Ca^{2+})_i$ en las regiones de la cabeza, pieza media (PM) y pieza principal (PP) de espermatozoides tras la estimulación con KCl para las condiciones 1) NC y 2) CAP. Las curvas representan el promedio de la señal registrada en células individuales, con sombreado indicando el error estándar de la media (SEM). Las letras (a–g) marcan puntos temporales específicos del protocolo para su referencia en B: a) Basal, b) Valinomicina (1 μ M), c) KCl (5 mM), d) KCl (10 mM), e) KCl (15 mM), f) ionomicina (10 μ M) y g) MnCl₂ (5 mM). B) Imágenes representativas en pseudo color correspondientes a los tiempos señalados (a–g) para las condiciones CAP y NC (1 y 2), mostrando la señal de Fluo-3 AM. Se analizaron un total de 32 cabezas y 30 piezas medias y principales (condición CAP) y 37 cabezas y 32 piezas medias y principales provenientes de espermatozoides de 3 donadores distintos (n=3). La barra de calibración indica los valores de gris (intensidad de fluorescencia por píxel) en unidades arbitrarias (U.A.).

El análisis estadístico confirmó esta distribución regional de la respuesta, mostrando que, en la condición no capacitada, y a diferentes concentraciones de KCl (5, 10 y 15 mM), la amplitud del cambio fluorescente fue significativamente mayor en la cabeza con respecto a la pieza principal ($p < .001$), seguida de la pieza media con respecto a la principal ($p < .001$), a la concentración de KCl 5mM. Mientras que a 10 y 15 mM la cabeza tuvo un mayor cambio de la señal con respecto a la pieza principal ($p < .001$). Además, se observó una tendencia creciente en la intensidad de la respuesta conforme aumentó la concentración de KCl en todas las regiones analizadas (Figura 19).

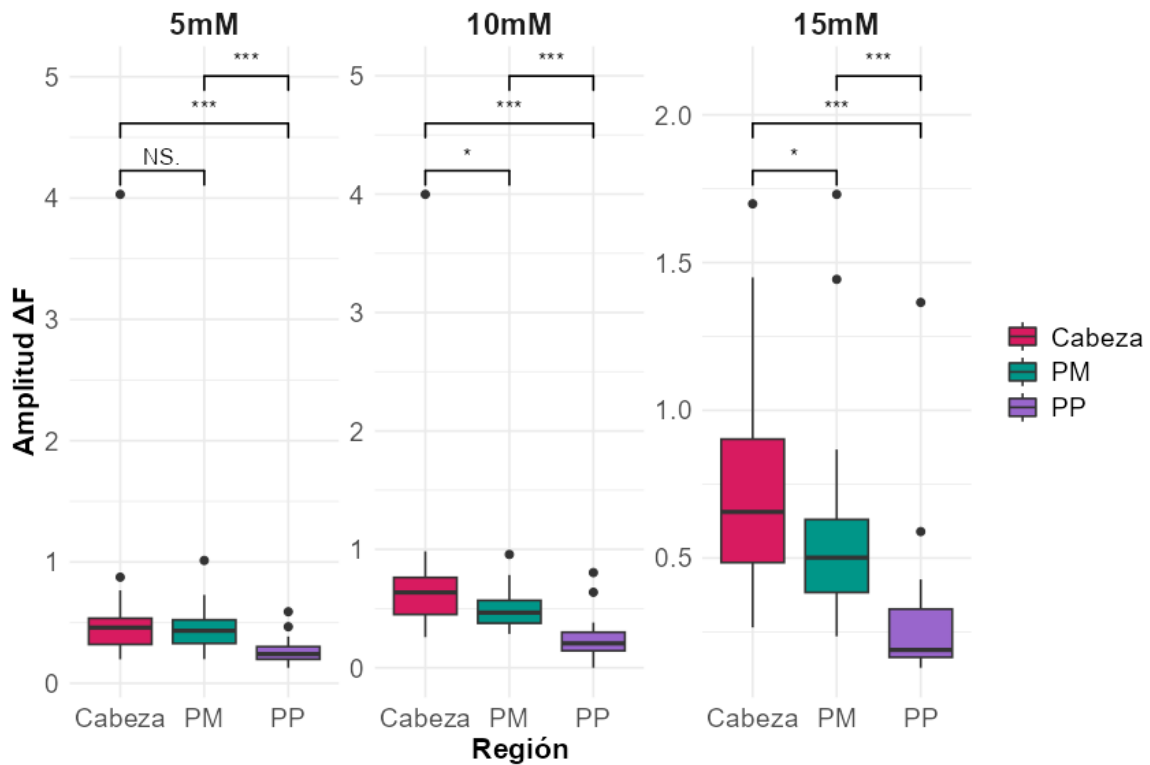


Figura 19. Actividad transitoria de Ca^{2+} localizada principalmente en la cabeza del espermatozoide en condición no capacitada.

Distribución de la amplitud (ΔF) en las regiones Cabeza, PM y PP bajo diferentes concentraciones de KCl (5, 10 y 15 mM) para la condición NC. Datos de 3 donadores; número variable de células por región. Los datos se presentan como diagramas de caja. Las diferencias estadísticas entre regiones se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de comparaciones múltiples post hoc con el test de Dunn y corrección de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < .05$ (*), $p < .01$ (**), $p < .001$ (***).

En la condición capacitada, el análisis estadístico reveló un patrón inverso al observado en NC. La pieza principal presentó la mayor amplitud de señal respecto a la cabeza en las tres concentraciones de KCl evaluadas ($p < 0.001$), así como también respecto a la pieza media ($p < 0.001$). En este caso no se identificó un incremento progresivo en la respuesta conforme aumentaron las concentraciones de KCl, si no que se mantuvo una amplitud de respuesta similar para las regiones (Figura 20).

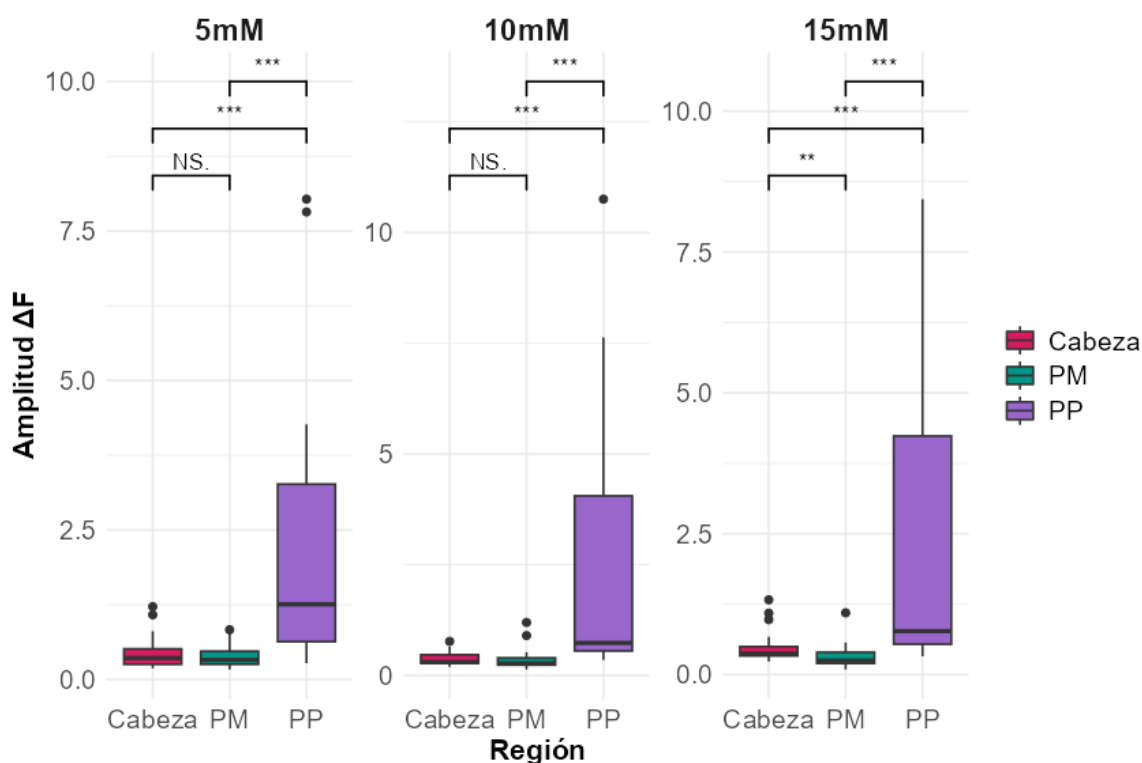


Figura 20. Actividad transitoria de Ca^{2+} localizada principalmente en la pieza principal del espermatozoide condición capacitada.

Distribución de la amplitud (ΔF) en las regiones Cabeza, PM y PP bajo diferentes concentraciones de KCl (5, 10 y 15 mM) para la condición capacitada. Datos de 3 donadores; número variable de células por región. Los datos se presentan como diagramas de caja. Las diferencias estadísticas entre regiones se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de comparaciones múltiples post hoc con el test de Dunn y corrección de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < .05$ (*), $p < .01$ (**), $p < .001$ (***)

Los valores de p utilizados en ambos análisis estadísticos (Figura 19) y (Figura 20) se encuentran en el Anexo 5.

De manera complementaria, se evaluó la reacción acrosomal inducida al final del protocolo con ionomicina para determinar si existía la correlación de esta con la presencia de transitorios y el estado de capacitación de la célula.

En este caso, de acuerdo con la literatura, se observa un mayor porcentaje de reacción acrosomal en la condición capacitante (Chhikara et al., 2023). Además, no se detectó reacción acrosomal espontánea durante el tiempo basal del registro, ya que no se observaron células PNA+. La reacción acrosomal únicamente se presentó tras la adición de la ionomicina (Figura 21).

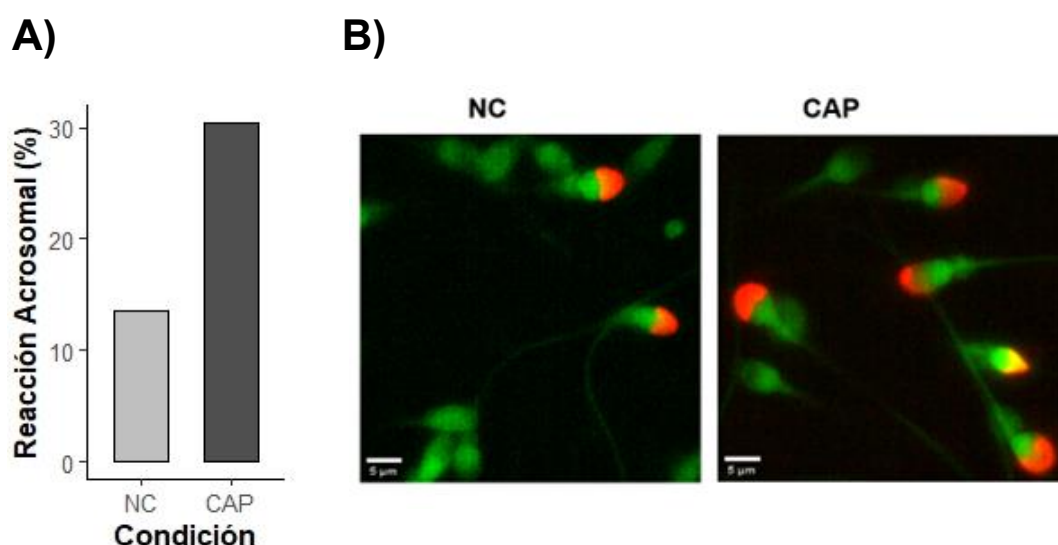


Figura 21. Evaluación de la reacción acrosomal mediante tinción con PNA-Alexa647 y Fluo-3AM.

A) Porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal en condiciones no capacitantes (NC) y capacitante (CAP). Los datos representan la media de dos experimentos independientes. B) Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con PNA-FITC (rojo) y Fluo-3 AM (verde).

7.5 Relación de los transitorio de Ca^{2+} con el estilo de vida

Como último objetivo, para examinar la posible relación entre el estilo de vida y los transitorios de $(\text{Ca}^{2+})_i$, se utilizó una encuesta dirigida a los donadores. Esta encuesta recopiló información sobre diversos aspectos de su estilo de vida, incluyendo la frecuencia del consumo de alcohol, las horas de sueño, los hábitos alimenticios, la actividad física, así como datos demográficos como edad, peso y estatura (Anexo 2). Posteriormente, se realizó un análisis estadístico para evaluar cómo se distribuía la amplitud promedio de la respuesta de los transitorios (promedio de las 3 adiciones de KCl) en relación con la frecuencia de estos hábitos (Figura 22); así como se evaluó una posible relación entre el índice de masa corporal (IMC) y esta respuesta.

Al analizar cada variable del estilo de vida por separado, se observan distintas tendencias en la magnitud de respuesta. En cuanto a las horas de sueño, los donadores que duermen menos de 8 horas presentan una menor amplitud en comparación con aquellos que duermen 8 horas, tendencia que se mantiene al comparar quienes se desvelan habitualmente frente a quienes no lo hacen. En la variable de ejercicio, se observa una menor respuesta en los donadores que realizan actividad física diaria, seguida por aquellos que lo hacen una vez por semana, mientras que la mayor amplitud de la respuesta se registra en quienes se ejercitan de 2 a 3 veces por semana.

Respecto al consumo de alcohol, los donadores que no lo consumen muestran una amplitud de los transitorios mayor en comparación con quienes sí lo hacen. De manera similar, el consumo de comida grasa revela una mayor respuesta en los individuos que la consumen entre 2 y 3 veces por semana, en contraste con quienes la consumen con menor frecuencia.

En el caso del estrés, se observa la única diferencia estadísticamente significativa, los donadores que reportan no experimentar estrés de manera cotidiana presentan una mayor amplitud en comparación con quienes sí lo experimentan. Finalmente, en el consumo de drogas, se registra una menor respuesta en aquellos que las consumen una vez por semana, comparado con quienes reportan un consumo ocasional (una vez al año o cada seis meses).

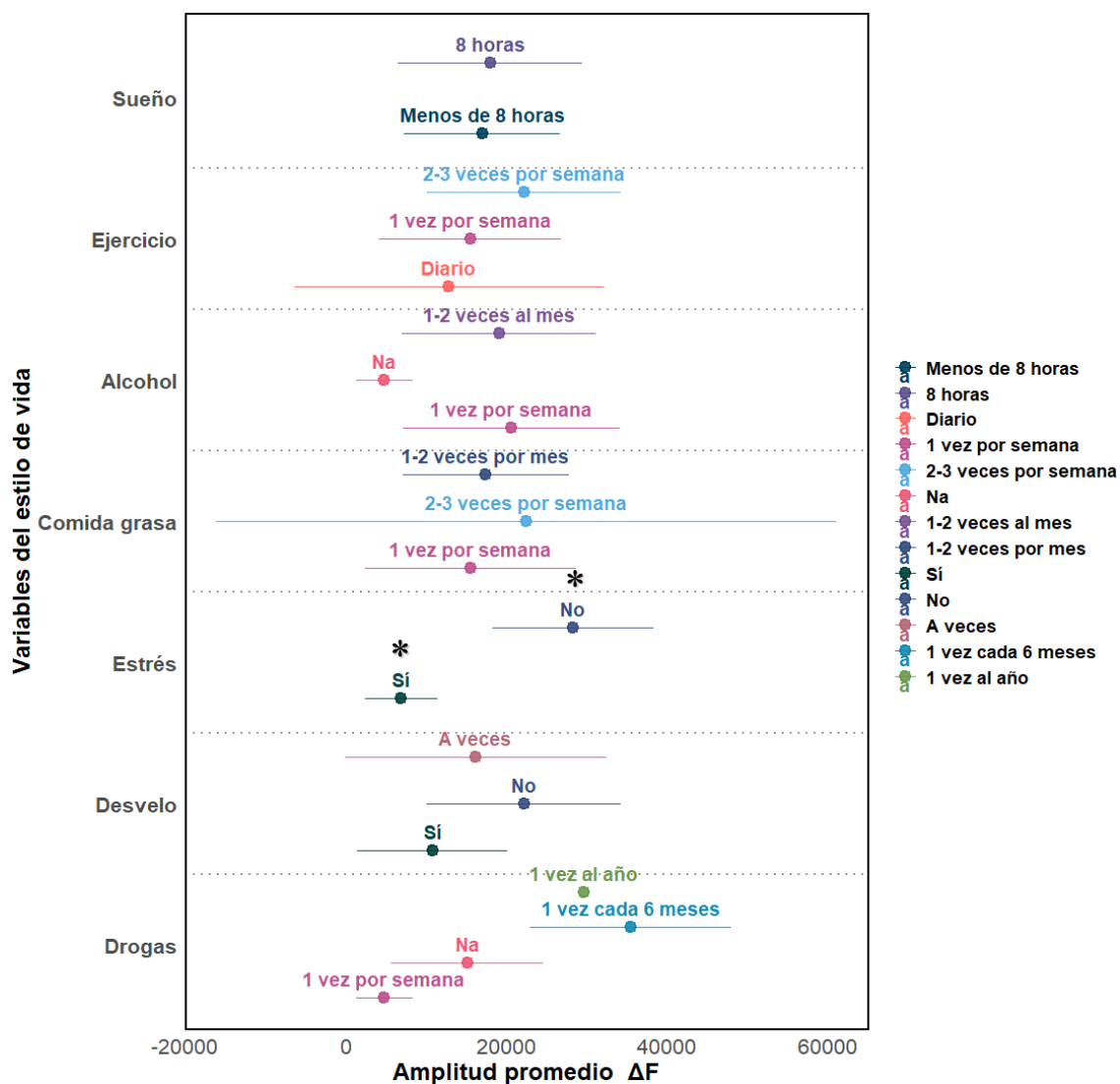


Figura 22. La señal de $(Ca^{2+})_i$ varía según el estilo de vida reportado por los donadores.

Comparación de condiciones de estilo de vida mediante análisis de varianza seguido de pruebas post hoc de Tukey, la significancia estadística se consideró con un umbral de $p < 0.05$ (*). Cada punto representa la media del valor de amplitud promedio para cada categoría dentro de una variable de estilo de vida (se reportan las frecuencias de determinados hábitos, Sueño: horas que duermen en el día, Ejercicio: frecuencia con la que se realiza, Alcohol: frecuencia con la que se consume, Comida grasa: frecuencia con la que se consume, Estrés: si creen padecerlo, Desvelo: frecuencia con la que se desvelan, Drogas: frecuencia de consumo). Las barras horizontales corresponden al intervalo de confianza del 95% alrededor de la media. Las comparaciones múltiples entre categorías fueron realizadas dentro de cada variable por separado.

Se determinó el IMC de cada uno de los donadores de las condiciones control y se hizo la relación con respecto a su amplitud promedio de la respuesta en $(Ca^{2+})_i$ a partir de lo cual se observó una tendencia no lineal; los individuos que presentaron un IMC correspondiente al rango de peso normal, aproximadamente en la mitad de este intervalo (alrededor de un IMC de 21–22), mostraron una menor amplitud de los transitorios de

$(Ca^{2+})_i$, mientras que al acercarse al límite superior del peso normal y al inicio del sobrepeso (IMC cercano a 25), se registraron los valores más altos de amplitud. Posteriormente, conforme el IMC aumentó hacia el rango de obesidad tipo 1 (por encima de 30), la amplitud de los transitorios de $(Ca^{2+})_i$ mostró una disminución progresiva (Figura 23).

La clasificación del IMC utilizada en este análisis se basa en los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (2000), que define el peso normal como un IMC entre 18.5 y 24.9, el sobrepeso entre 25 y 29.9, y la obesidad tipo I a partir de un IMC de 30 o superior.

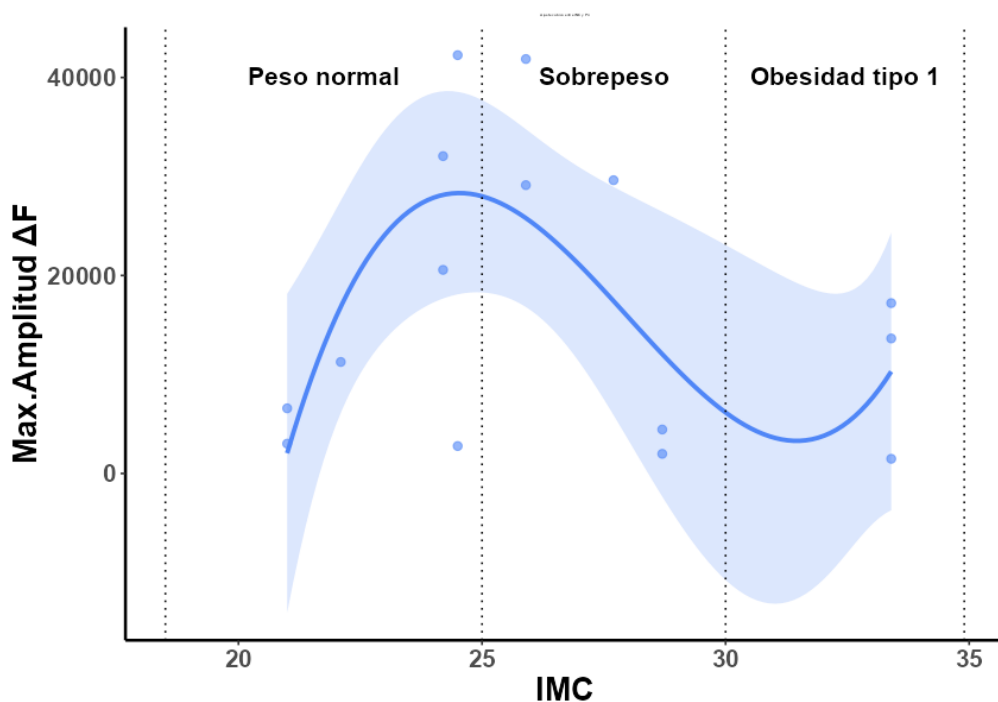


Figura 23. Mayor amplitud de señal de $(Ca^{2+})_i$ se concentra en donadores con IMC en rango de peso normal y sobrepeso.

Relación entre el índice de masa corporal (IMC) y la amplitud máxima de la señal de $(Ca^{2+})_i$ (P4) en donadores. Se muestra un ajuste cúbico (línea azul) con su intervalo de confianza del 95% (sombra azul). Las líneas verticales punteadas delimitan los rangos correspondientes a peso normal (18.5–24.9), sobrepeso (25–29.9) y obesidad tipo 1 (30–34.9), etiquetados en la parte superior del gráfico. El coeficiente de determinación del modelo fue $R^2 = 0.43$.

8. Discusión.

La dinámica del $(Ca^{2+})_i$ es un proceso fisiológico relevante para los espermatozoides y está relacionada con los procesos de capacitación, hiperactivación y reacción acrosomal, en este contexto se ha descrito ampliamente la aparición de oscilaciones y aumentos transitorios en la concentración de $(Ca^{2+})_i$ en respuesta a estímulos fisiológicos como la progesterona o el líquido folicular que actúan como señales para la activación y modificación del comportamiento espermático durante su tránsito en el tracto reproductor femenino (Mata-Martínez et al., 2021; Yang et al., 2024).

En el presente estudio, se identificaron incrementos transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ dentro de un enfoque metodológico distinto, diseñado originalmente para evaluar el potencial de membrana en espermatozoides humanos, este protocolo, se basa en la inducción controlada de despolarizaciones mediante adiciones escalonadas de KCl, si bien el medio empleado mantiene condiciones compatibles con el entorno fisiológico (pH, osmolaridad, temperatura), la naturaleza secuencial y artificial de las adiciones no representa un estímulo que ocurra de forma espontánea en el tracto reproductor femenino.

Estas observaciones nos llevaron a pensar que, además de su uso para calcular el potencial de membrana, este protocolo podría ofrecer una forma útil de investigar cómo reacciona el $(Ca^{2+})_i$ ante despolarizaciones controladas; aunque el diseño metodológico no imita un estímulo fisiológico natural, sí permite provocar cambios en el potencial de membrana de manera controlada y monitorear la señal de $(Ca^{2+})_i$ pudiendo comparar diferentes contextos celulares, como la presencia de inhibidores, el estado de capacitación y los factores relacionados con el estilo de vida.

Las concentraciones de KCl evaluadas (5, 10, 15 y 25 mM) produjeron aumentos transitorios y reproducibles en $[Ca^{2+}]_i$, mostrando una cinética común caracterizada por un aumento rápido y una recuperación progresiva, reflejado en los valores de Tau up y Tau down de las condiciones control, de modo que, este comportamiento concuerda con lo descrito por Linares-Hernández et al.(1998), quienes observaron que la magnitud del incremento de $(Ca^{2+})_i$ dependía de la concentración de KCl añadida; nuestros resultados en espectrofluorometría sugieren una tendencia similar, si bien con respuestas crecientes al aumentar la concentración de KCl. Sin embargo, en los datos obtenidos por citometría de flujo, la amplitud de respuesta entre la segunda y tercera concentración (10 y 15 mM) fue similar, posiblemente debido a que las diferencias en concentración no fueron lo

suficientemente marcadas para generar cambios adicionales en la subpoblación, además de considerar que conforme aumenta la concentración podemos estar comprometiendo la viabilidad celular y eso nos daría la diferencia de los resultados en relación con nuestra metodología.

A diferencia de estudios previos como el de Ferreira et al. (2021) y Fraire-Zamora et al. (2004), donde los transitorios de $(Ca^{2+})_i$ fueron inducidos por una única adición de KCl (30 mM) y bajo condiciones no fisiológicas de pH, nuestro protocolo incluyó estímulos escalonados en un medio al pH fisiológico (7.4). En ambos estudios, los autores observaron que la amplitud del transitorio aumentaba significativamente en condiciones de pH alcalino, sugiriendo una interacción entre la despolarización y la alcalinización para modular la entrada de $(Ca^{2+})_i$, en contraste, nuestros hallazgos muestran que dichos transitorios también pueden ser inducidos sin necesidad de alcalinizar el medio, proporcionando evidencia de que la despolarización por sí sola, incluso en condiciones fisiológicas, es capaz de activar rutas sensibles al voltaje y generar respuestas transitorias detectables, incluso con concentraciones tan bajas como 5 mM de KCl.

Es importante destacar las diferencias entre las dos principales técnicas empleadas, por un lado, la espectrofluorimetría nos permitió observar la respuesta promedio de toda la población celular, cuando una subpoblación de espermatozoides no regresa inmediatamente a su nivel basal tras un pulso, su fluorescencia residual se suma a la de los pulsos sucesivos, provocando un aumento progresivo de la señal observada. Si bien únicamente se evalúan a 4 donadores es importante considerar que se promedia la respuesta de 5 millones de células por medición y aunque un número mayor resultaría más representativo dada la variabilidad de la respuesta entre donadores, no se quiso replicar el uso de esta metodología que ya se aborda en los antecedentes.

Por citometría de flujo se midió la respuesta de un número menor de células, sin embargo el número de donadores evaluados aumentó, así como se destaca de la técnica la resolución a nivel de célula individual además de la posibilidad de excluir eventos no deseados como dobletes y células muertas, y se evaluó un número representativo de eventos en las cinéticas realizadas, evaluando un número de 100 células por segundo dando cabida a obtener datos más representativos de la fisiología espermática, siendo importante considerar que la capacitación puede disminuir el porcentaje de espermatozoides viables (Matamoros-Volante et al., 2018); esto limita la interpretación

de estudios basados exclusivamente en señales promedio, como los anteriormente descritos.

Parte de la caracterización de los transitorios de $(Ca^{2+})_i$ inducidos por depolarización nos condujo a investigar cuál era la entidad molecular responsable o mayormente implicada en su respuesta, el uso de inhibidores de canales en la metodología por citometría de flujo resultó en una reducción significativa de la amplitud del segundo pulso de KCl utilizando NNC-55-0396, y en el caso de NNC mantuvo esta inhibición en el tercer pulso, mostrando además una marcada tendencia general a atenuar la respuesta; ambos compuestos inhiben la corriente de CatSper en espermatozoides humanos (Carlson et al., 2022; Zarei et al., 2025), y también bloquean canales de Ca^{2+} tipo T (Cav3.x), en el caso de mibefradil incluyendo también corrientes de tipo L (Cav1.x) (Arnoult et al., 1996; Huang et al., 2004), por lo que estos resultados nos llevaron a suponer que son estos canales, principalmente CatSper y los Cav, los que generan los transitorios de Ca^{2+} ; otra observación relevante del efecto de estos inhibidores fue la alteración de la cinética típica del transitorio, que pasó de un patrón de rápida subida-pico-bajada casi al nivel basal previo a la adición, a un perfil más plano y prolongado, sin un pico de subida definido y con una señal que no retorna completamente al basal; en este contexto, Tau up se prolongó y Tau down se aceleró poblacionalmente.

Para elucidar el mecanismo del proceso resultó importante la comparación entre las condiciones capacitantes y no capacitante, puesto que, como se describió en los antecedentes, la capacitación es una etapa determinante para el espermatozoide que le permite adquirir su capacidad de fertilización, desencadenando una serie de modificaciones bioquímicas y funcionales que no solo preparan al espermatozoide para la interacción con el ovocito, sino que también condicionan su capacidad de responder a estímulos externos (Benko et al., 2023; Lishko et al., 2016). Considerando esto, se plantea que este estado podría estar vinculado con la generación de los transitorios de Ca^{2+} .

Nuestros experimentos por citometría observaron la presencia de los transitorios tanto en las condiciones capacitantes como no capacitantes pero encontramos diferencias en concreto en la amplitud de la respuesta siendo esta menor en las células no capacitadas y estadísticamente significativa en el tercer pulso depolarizante así como en los tiempos de la respuesta ya que las células no capacitadas tardaron más tanto en llegar al máximo del transitorio así como en bajar a la respuesta mínima, teniendo por tanto, un tiempo total de

la respuesta mayor. Esto puede explicarse a partir del antecedente de que CatSper, canal que identificamos como uno de los principales responsables de la respuesta al estímulo, es sensible a los cambios en el pH intracelular, los cuales se producen durante la capacitación espermática (Chávez et al., 2019); si bien Fraire-Zamora y González-Martínez (2004) demostraron que la alcalinización con cloruro de amonio aumenta la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} en proporción al grado de pH en la condición no capacitada; otro enfoque es la relevancia del bicarbonato, responsable de la activación de la vía sAC/PKA que sensibiliza a CatSper al pH y al voltaje (Orta et al., 2018); en esta misma línea Ferreira et al. (2021), inhibieron sAC y observaron una reducción significativa de los transitorios inducidos por despolarización, además de comprobar que en los espermatozoides epididimales que no se les expone al bicarbonato, no se presentan los transitorios hasta que fueron alcalinizados artificialmente. Lo que nos hace pensar que los espermatozoides en la condición no capacitante podrían aún presentar transitorios debido a una exposición residual al bicarbonato presente en el plasma seminal tras la eyaculación.

En coherencia con esta idea, los resultados de distribución espacial mostraron que en la condición no capacitante la señal de Ca^{2+} presenta mayor amplitud en la cabeza, seguida de la pieza media y finalmente la pieza principal, este patrón coincide con la presencia predominante de canales T-tipo/TRP en regiones proximales al núcleo y su capacidad para responder a modificaciones relativamente pequeñas de pH_i , sin mayor dependencia de segundos mensajeros (Bedu-Addo et al., 2005; Wennemuth et al., 2003). En contraste en las células en la condición capacitante, la señal es máxima en la pieza principal, donde CatSper se ubica de forma más abundante, y luego decae hacia la cabeza y la pieza media, reflejando la difusión del Ca^{2+} desde la cola hacia el resto de la célula (Kirichok et al., 2006; Lishko et al., 2011), esto apoya la postura de que, tras la activación de sAC/PKA, CatSper es el canal principal de entrada de Ca^{2+} en la pieza principal, mientras que los canales T-tipo/TRP contribuyen en menor medida.

Evaluar las células por medio de la microscopia de epifluorescencia nos permitió no solo regionalizar sino también monitorear en tiempo real la respuesta individual de cada célula, así como determinar si las células eran capaces de experimentar la RA con la adición de ionomicina, observando un porcentaje de reacción acrosomal acorde a lo reportado para las condiciones capacitadas y no capacitadas (Chhikara et al., 2023). No obstante, dado

que estos experimentos se realizaron únicamente con 3 donadores, los resultados deben interpretarse considerando la variabilidad biológica entre individuos que no se puede abordar por completo.

Otra pregunta planteada en torno al estado de capacitación es si la hiperpolarización podría contribuir o relacionarse con la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} , este cambio en el potencial de membrana está asociada a la capacitación y permite al espermatozoide desarrollar la reacción acrosomal (De La Vega-Beltran et al., 2012). Nuestros resultados en ambas condiciones capacitantes y no capacitantes nos permitieron identificar que, tras la capacitación, los donadores que se hiperpolarizaron presentaban valores mayores de la amplitud de los transitorios, mientras que aquellos que se depolarizaron exhibieron una disminución de la amplitud, aunque debido a la falta de una prueba estadística se toman los resultados con cautela siendo necesario ampliar el número de donadores para poder evaluar la significancia. En los experimentos por citometría el bloqueo de Slo3 con clofilium redujo de forma significativa la amplitud del segundo pulso de despolarización, mientras que en los experimentos por espectrofluorimetría esta inhibición fue consistente en los 3 pulsos; lo que corresponde junto con los resultados de hiperpolarización a una observación acorde con Chávez et al. (2014), quienes demostraron en espermatozoides de ratón que la corriente de K^+ mediada por Slo3 favorece la entrada de Ca^{2+} a través de CatSper, pues en células sin Slo3 la respuesta de Ca^{2+} se veía notablemente reducida y solo podía restablecerse elevando externamente el pH_i o hiperpolarizando la membrana con valinomicina; esta hiperpolarización incrementa la fuerza electromotriz para Na^+ , potencia la actividad del intercambiador Na^+/H^+ y otros sistemas dependientes de Na^+ , lo que eleva el pH_i y sensibiliza a CatSper (Chávez et al., 2014; Wang et al., 2003) que nos ayuda a explicar la respuesta en los transitorios conforme a lo señalado en los apartados previos, pero es necesario tener presente que no todas las células alcanzan la hiperpolarización durante la capacitación (López-González et al., 2014), lo cual concuerda con la variabilidad de respuestas que observamos a nivel individual por microscopía y refuerza la importancia de combinar ambas aproximaciones para caracterizar la heterogeneidad funcional del espermatozoide.

Por último, la variabilidad observada entre la amplitud de la respuesta entre los donadores nos llevó a indagar los posibles determinantes de dicha heterogeneidad, para lo que se vinculó la amplitud de los transitorios con las características del estilo de vida (horas de

sueño, actividad física, consumo de alcohol, dieta, estrés) y el IMC de los donadores. El sueño como primera característica evaluada mostró una menor respuesta en los donadores que presentaban desvelos y menos de 8 horas de sueño, si bien no existen estudios que relacionen este parámetro directamente con la dinámica del Ca^{2+} , si se ha relacionado con una disminución de la testosterona, alteración de los ritmos circadianos; afectando la producción de melatonina y cortisol que impiden en conjunto la modulación adecuada de la entrada de Ca^{2+} (Chen et al., 2020; Zhong et al., 2022); por su parte en el ejercicio se muestra una tendencia de mejor respuesta cuando es de manera moderada en contraste a cuando se realiza en menor o en mayor frecuencia que es concordante con la idea de la mejora de la salud reproductiva en general pero de forma excesiva repercute en parámetros similares a los antes abordados como la producción de cortisol y desequilibrios hormonales (Hackney, 2006, 2008; Wise et al., 2011). No obstante, conviene señalar que la frecuencia por sí sola no basta para explicar tales efectos, se debe considerar la modalidad del ejercicio así como la intensidad del mismo ya que también son determinantes del efecto en las células (Vaamonde et al., 2009). La tendencia observada en el consumo de alimentos altos en grasa, donde una mayor frecuencia de consumo se asoció con una mayor amplitud de respuesta de $(\text{Ca}^{2+})_i$, resulta contraria a lo reportado por Salas-Huetos et al. (2017) y Skoracka et al. (2020), quienes describen una disminución en la calidad seminal asociada al consumo elevado de ácidos grasos trans y saturados aunque esta discrepancia podría explicarse considerando que, según otra sección la encuesta aplicada, los donadores refirieron un patrón alimenticio variado con características similares a la dieta mediterránea, lo cual podría modular los efectos negativos de las grasas menos saludables (Cutillas-Tolín et al., 2015). En cuanto al consumo de drogas, la literatura ha relacionado esta práctica con una disfunción directa de los canales CatSper en espermatozoides, usando dos compuestos tanto el fitocannabinoide psicoactivo delta-9-tetrahidrocannabinol, como su análogo no psicoactivo el cannabidiol y ambos inhibieron la activación del canal dependiente e independiente del ligando de manera dosis-dependiente (Wehrli et al., 2025). El factor de estrés que presenta una diferencia significativa puede integrarse como un punto de convergencia entre los demás factores analizados, que pueden tener como efecto un estado de estrés metabólico mediado principalmente por el aumento de cortisol. Existe evidencia que el cortisol interfiere con la señalización de $(\text{Ca}^{2+})_i$ y con la capacidad de inducir la reacción acrosómica por progesterona (Sánchez González et al., 2023).

Para finalizar, el IMC evaluado mostró una tendencia hacia una mayor respuesta en individuos con peso normal y aquellos en el inicio del sobrepeso, en contraste con quienes se encuentran en un rango de obesidad, esto explica que un estado fisiológico relativamente más equilibrado; en cambio, en personas con obesidad puede presentarse un entorno inflamatorio caracterizado por la presencia de citocinas proinflamatorias como el TNF- α con capacidad de alterar la homeostasis del $(Ca^{2+})_i$ en espermatozoides humanos y, en consecuencia, afectar su funcionalidad (Chianese et al., 2017). Además, la mayor respuesta observada en individuos con sobrepeso podría estar asociada a modificaciones en la cinética de la señalización, ya que se ha identificado una correlación positiva entre la fosforilación de tirosina y el IMC, proceso que puede estar mediado por diversas vías de transducción como la PKA, las cuales podrían influir en la amplitud del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ (Ortiz-Vallecillo et al., 2024); No obstante, es fundamental señalar que el IMC, aunque es una herramienta clínica útil para estimar el estado nutricional, no representa una medida directa de la adiposidad ni permite, por sí solo, diagnosticar sobrepeso, obesidad o la existencia de inflamación crónica o disfunción celular, debido a sus limitaciones como indicador metabólico (Sweatt et al., 2024).

9. Conclusiones.

En este trabajo identificamos la presencia de transitorios de $(Ca^{2+})_i$ inducidos por pulsos despolarizantes. Demostramos que la entidad responsable de estos transitorios es CatSper, resultando en una distribución de la señal que predomina en la pieza principal en células capacitadas mientras que en las no capacitadas su contribución es menor y se relacionó con la actividad de otros posibles canales Cav/T-tipo.

Determinamos que estos transitorios no dependen exclusivamente del estado de capacitación de la célula, sino que están modulados por eventos moleculares característicos de la misma, proponiendo la alcalinización intracelular y la activación de la vía sAC por bicarbonato como principales moduladores; y que la hiperpolarización de membrana favorece indirectamente la respuesta de Ca^{2+} al potenciar dicha alcalinización.

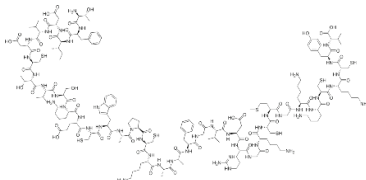
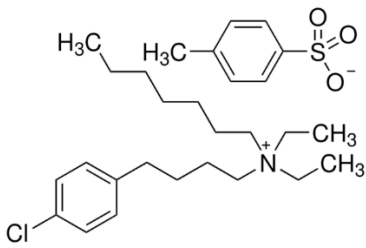
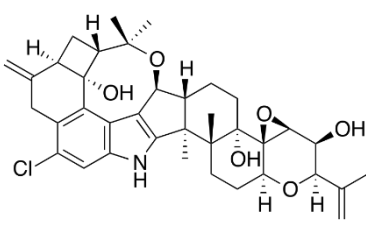
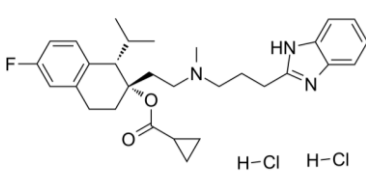
Finalmente, hallamos que los donadores con estilos de vida más saludables presentan una mayor amplitud de los transitorios, lo que resalta el potencial de este parámetro como predictor funcional, debido a la importancia del canal CatSper en el proceso de

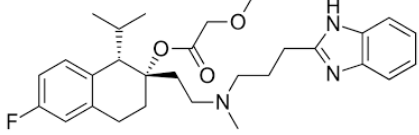
fertilización, así como del resto de características presentes en la capacitación que pueden potenciar esta respuesta.

10. Perspectivas

Se propone ampliar el número de donadores para fortalecer la veracidad estadística, así como estudiar la interacción con marcadores de estrés celular, como especies reactivas de oxígeno (ROS), daño en el ADN espermático o la expresión de proteínas de respuesta al estrés. Además, se plantea utilizar inhibidores de CatSper en condiciones no capacitantes complementando con estudios de imagen para atribuir la señal de calcio a entidades moleculares específicas y confirmar el sitio de inicio de dicha señal.

Anexo 1: Datos estructurales y funcionales de los inhibidores utilizados.

Compuesto	Descripción	Estructura	Peso molecular	Inhibición
Slotoxina	Péptido aislado del veneno del escorpión Hoffmann Centruroides noxius. Miembro de la superfamilia de la toxina del escorpión corto		4092 g/mol	*Canales MaxiK de mamíferos como Slo1 en espermatozoides *Es capaz de diferenciar entre tres tipos de complejos, α , $\alpha+\beta 1$ y $\alpha+\beta 4$.
Clofilium	Fármaco antiarrítmico clase III		339 g/mol	*Bloquea irreversiblemente IKsper (Slo3) en espermatozoides de ratón y humano
Penitrem A	Micotoxina indol-diterpeno (producida por <i>Penicillium</i> , etc).		633 g/mol	*Antagonista de canales BK *Inhibe parcialmente IKsper humano (Slo3).
NNC 55-0396	Bloqueador sintético derivado de fenilpirazol	 H-Cl H-Cl	564 g/mol	*Bloqueador de canales de Ca^{2+} tipo T (CatSper)

Mibefradil	Bloqueador sintético de canales derivado de tetralina		495 g/mol	*Bloqueador de canales de Ca^{2+} tipo T y L (CatSper)
------------	---	---	-----------	---

Anexo 2: Encuesta de estilo de vida.

Pregunta	Opciones de respuesta
Edad	Valor numérico
Peso (kg)	Valor numérico
Altura (m)	Valor numérico
¿A qué te dedicas?	Texto libre
¿Cuántas horas de sueño tienes?	8 horas, Menos de 8 horas
¿Te desvelas con frecuencia?	A veces, No, Si
¿Eres sexualmente activo?	No, Si
¿Padeces o has padecido de infecciones de vías urinarias?	No, Si, Tal vez
¿Con qué frecuencia has padecido infecciones de vías urinarias en toda tu vida?	2-3 veces
¿Alguna vez has notado algo raro en tu muestra seminal	No, No se, Si, Tal vez
Menciona si has visto lo siguiente en tu muestra:	Aglutinados gelatinosos, Bajo rendimiento apesar de la abstinencia , Hay días q es más espeso que otros , Mal olor, Nada, Nada inusual, Ninguna, Ninguno, No, No , No he notado nada raro , Presencia de sangre
¿Con qué frecuencia tienes relaciones?	1 vez por semana, 1-2 por mes, 2 veces al mes, 2 veces por semana, Difiere entre 1 a 2, Ninguna, No soy activo en este momento
¿Tienes o has intentado tener hijos?	No, Si
Si has tomado la decisión de tomar hijos, ¿has presentado problemas para concebir?	No
Si has logrado concebir, indica el número de hijos que tienes	1.0
¿Consumes bebidas alcoholicas?	No, Si
¿Con qué frecuencia consumes bebidas alcoholicas?	1 vez por semana, 1-2 veces al mes
¿Consumes tabaco o cigarro electrónico?	No, Si
¿Con qué frecuencia fumas?	2-3 veces por semana
¿Consumes o has consumido alguna droga?	No, Si

¿Con qué frecuencia consumes?	1 vez al año aprox , 1 vez cada 6 meses aprox, 1 vez por semana, 2-3 veces por semana, solo las probé y ya no consumo
¿Padeces alguna enfermedad crónico-degenerativa?	No, Tal vez
¿Qué enfermedad padeces?	Texto libre
¿Tienes alguna predisposición genética a alguna enfermedad crónico-degenerativa (tu familia directa padece alguna enfermedad)?	No, No se, Si
¿Qué enfermedad padecen tus familiares directos?	Texto libre
¿Tomas algún medicamento de manera regular?	No, Si
¿Realizas ejercicio o alguna actividad física?	A veces, No, Si
Durante tus actividades diarias, ¿Cuanto tiempo pasas sentado, manejando, en oficina etc?	10 horas, 2 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas
¿Con qué frecuencia realizas ejercicio?	1 vez por semana, 2-3 veces por semana, 4 a 5 veces por semana, Diario
¿Consumes algún suplemento alimenticio?	No, Si
¿Qué suplemento alimenticio usas?	Texto libre
¿Podrías mencionar la composición de tu dieta?	Frutas, Carne roja, Carne blanca (pescado/ pollo), Cereales/ carbohidratos, Frutas, Carne roja, Carne blanca (pescado/ pollo), Grasas saludables (aguacate, aceite de oliva, cacahuates)
¿Consumes comida alta en grasas?	No, Si
¿Con qué frecuencia consumes comida alta en grasa?	1 vez por semana, 1-2 veces por mes, 2-3 veces por semana
¿Consideras que padeces de estrés?	No, Si, Tal vez
¿Afecta el estrés tu vida cotidiana?	No, No se, Si
¿Con qué frecuencia te estréas?	1 vez por semana, 1-2 veces por mes, 2-3 veces por semana, Diario
¿Ultimamente te has deprimido?	No, No se, Si, Tal vez
¿Sufres de ansiedad?	No, Si, Tal vez
¿El área de obtención de muestra te parece adecuado?	No, Si, Tal vez
¿El material audiovisual te parece suficiente?	No, Si
¿Qué material audiovisual agregarías?	Texto libre
¿Te gustaría hacer algún comentario adicional acerca del área de donación?	Texto libre

Anexo 3: Comparación de ΔF entre condiciones con respecto al control: promedio, error estándar y valor p.

Concentración	Condición	ΔF máxima	SE	p_value
KCl 5 mM	Control	0.1825	0.01698769	NA
KCl 5 mM	NNC	0.0259	0.00594545	0.00132
KCl 5 mM	Mibefradil	0.0712	0.00933925	0.00282
KCl 5 mM	Penitrem	0.15895	0.04088004	0.01474
KCl 5 mM	Slotoxina	0.3837	0.22500901	0.4376
KCl 5 mM	Clofilium	0.07825	0.02412891	0.62288
KCl 10 mM	Control	0.2404	0.03634944	NA
KCl 10 mM	NNC	0.042225	0.00949407	0.00956
KCl 10 mM	Mibefradil	0.089425	0.01826761	0.01724
KCl 10 mM	Penitrem	0.2071	0.04457391	0.04376
KCl 10 mM	Slotoxina	0.30135	0.10894904	0.62619
KCl 10 mM	Clofilium	0.11855	0.03060276	0.5845
KCl 15 mM	Control	0.38035	0.02477951	NA
KCl 15 mM	NNC	0.0654	0.0134798	0.00016
KCl 15 mM	Mibefradil	0.1161	0.0240451	0.00026
KCl 15 mM	Penitrem	0.272525	0.04845511	0.0064
KCl 15 mM	Slotoxina	0.3768	0.11040351	0.97677
KCl 15 mM	Clofilium	0.16165	0.04124198	0.1112

KCl 25 mM	Control	0.48395	0.03790131	NA
KCl 25 mM	NNC	0.09155	0.01760741	0.00054
KCl 25 mM	Mibefradil	0.1434	0.0309017	0.00052
KCl 25 mM	Penitrem	0.35895	0.06298815	0.0021
KCl 25 mM	Slotoxina	0.476	0.12837359	0.95585
KCl 25 mM	Clofilium	0.198475	0.04015448	0.15074

Anexo 4: Comparación de ΔF entre condiciones con respecto al control: Mediana, desviación estándar y valor p

Concentración	Tratamiento	Mediana	SD	p.value
KCl 5mM	Control CAP	22786.5	13843.74	NA
KCl 5mM	Control NC	6398.85	11208.43	0.1098
KCl 5mM	NNC	13852	10044.15	0.4705
KCl 5mM	Mibefradil	18420	16884.1	0.4705
KCl 5mM	Clofilium	14348	16505.87	0.4705
KCl 5mM	Slotoxina	27078.65	12529.89	0.9151
KCl 5mM	Penitrem	27812.41	15826.45	0.3359
KCl 10mM	Control CAP	47763	13128.91	NA
KCl 10mM	Control NC	12430.5	23733.31	0.1658
KCl 10mM	NNC	15273.5	9334.11	0.0204
KCl 10mM	Mibefradil	11038.5	10224.06	0.0304
KCl 10mM	Clofilium	11664	10152.41	0.0304

KCl 10mM	Slotoxina	40220.43	31577.44	0.9151
KCl 10mM	Penitrem	52790.26	29541.24	0.9148
KCl 15mM	Control CAP	30418.5	12838.48	NA
KCl 15mM	Control NC	8764.5	9762.341	0.0428
KCl 15mM	NNC	10629.5	5151.004	0.0304
KCl 15mM	Mibefradil	5463	11032.92	0.0606
KCl 15mM	Clofilium	5916.5	12141.81	0.0606
KCl 15mM	Slotoxina	26407.66	16398.4	0.7491
KCl 15mM	Penitrem	48975.63	19817.65	0.2410

Anexo 5: Comparación de ΔF entre regiones

	Regiones comparadas	p KCl 5mM	p KCl 10mM	p KCl 15 mM
Condición NC	Cabeza/PM	1	0.41765912	0.23301125
	Cabeza/PP	1.3244E-05	2.4229E-09	1.1898E-09
	PM/PP	5.0603E-05	1.7637E-05	3.9233E-05
Condición CAP	Cabeza/PM	1	0.64824626	0.0683074
	Cabeza/PP	2.2988E-05	3.0444E-05	0.00102094
	PM/PP	4.4176E-06	7.1304E-08	2.2738E-08

11. Bibliografía.

- Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(1-2), 66-69. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026>
- Alasmari, W., Barratt, C. L. R., Publicover, S. J., Whalley, K. M., Foster, E., Kay, V., Martins Da Silva, S., & Oxenham, S. K. (2013). The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Human Reproduction*, 28(4), 866-876. <https://doi.org/10.1093/humrep/des467>
- Aldana, A., Carneiro, J., Martínez-Mekler, G., & Darszon, A. (2021). Discrete Dynamic Model of the Mammalian Sperm Acrosome Reaction: The Influence of Acrosomal pH and Physiological Heterogeneity. *Frontiers in Physiology*, 12, 682790. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.682790>
- Amiri, M., & Ramezani Tehrani, F. (2020). Potential Adverse Effects of Female and Male Obesity on Fertility: A Narrative Review. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 18(3). <https://doi.org/10.5812/ijem.101776>
- Arnoult, C., Cardullo, R. A., Lemos, J. R., & Florman, H. M. (1996). Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23), 13004-13009. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13004>
- Asare-Anane, H., Bannison, S. B., Ofori, E. K., Ateko, R. O., Bawah, A. T., Amanquah, S. D., Oppong, S. Y., Gandau, B. B. N., & Ziem, J. B. (2016). Tobacco smoking is associated with decreased semen quality. *Reproductive Health*, 13(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12978-016-0207-z>
- Avenarius, M. R., Hildebrand, M. S., Zhang, Y., Meyer, N. C., Smith, L. L. H., Kahrizi, K., Najmabadi, H., & Smith, R. J. H. (2009). Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *The American Journal of Human Genetics*, 84(4), 505-510. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.004>

- Babcock, D. F. (1983). Examination of the intracellular ionic environment and of ionophore action by null point measurements employing the fluorescein chromophore. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(10), 6380-6389.
- Baro Graf, C., Ritagliati, C., Stival, C., Balestrini, P. A., Buffone, M. G., & Krapf, D. (2019). Determination of a Robust Assay for Human Sperm Membrane Potential Analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 101. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00101>
- Baro Graf, C., Ritagliati, C., Torres-Monserrat, V., Stival, C., Carizza, C., Buffone, M. G., & Krapf, D. (2020a). Membrane Potential Assessment by Fluorimetry as a Predictor Tool of Human Sperm Fertilizing Capacity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 383. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00383>
- Baro Graf, C., Ritagliati, C., Torres-Monserrat, V., Stival, C., Carizza, C., Buffone, M. G., & Krapf, D. (2020b). Membrane Potential Assessment by Fluorimetry as a Predictor Tool of Human Sperm Fertilizing Capacity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 383. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00383>
- Benko, F., Urminská, D., Ďuračka, M., & Tvrdá, E. (2023). Signaling Roleplay between Ion Channels during Mammalian Sperm Capacitation. *Biomedicines*, 11(9), 2519. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11092519>
- Brown, S. G., Costello, S., Kelly, M. C., Ramalingam, M., Drew, E., Publicover, S. J., Barratt, C. L. R., & Da Silva, S. M. (2017). Complex CatSper-dependent and independent $[Ca^{2+}]_i$ signalling in human spermatozoa induced by follicular fluid. *Human Reproduction*, 32(10), 1995-2006. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex269>
- Buck Louis, G. M., Sundaram, R., Schisterman, E. F., Sweeney, A., Lynch, C. D., Kim, S., Maisog, J. M., Gore-Langton, R., Eisenberg, M. L., & Chen, Z. (2014). Semen quality and time to pregnancy: The Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment Study. *Fertility and Sterility*, 101(2), 453-462. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.10.022>
- Carlson, A. E., Quill, T. A., Westenbroek, R. E., Schuh, S. M., Hille, B., & Babcock, D. F. (2005). Identical Phenotypes of CatSper1 and CatSper2 Null Sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32238-32244. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501430200>

- Carlson, A. E., Westenbroek, R. E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D. E., Hille, B., Garbers, D. L., & Babcock, D. F. (2003). CatSper1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14864-14868.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2536658100>
- Carlson, E. J., Francis, R., Liu, Y., Li, P., Lyon, M., Santi, C. M., Hook, D. J., Hawkinson, J. E., & Georg, G. I. (2022). Discovery and Characterization of Multiple Classes of Human CatSper Blockers. *ChemMedChem*, 17(15), e202000499. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000499>
- Carrasquel, G., Camejo, M. I., Michelangeli, F., & Ruiz, M. C. (2013). Effect of Tumor Necrosis Factor- α on the Intracellular Ca^{2+} Homeostasis in Human Sperm. *American Journal of Reproductive Immunology*, 70(2), 153-161. <https://doi.org/10.1111/aji.12106>
- Carrasquel, G., Camejo, M. I., Michelangeli, F., & Ruiz, M. C. (2014). IFN-gamma alters the human sperm membrane permeability to Ca^{2+} . *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60(1), 21-27. <https://doi.org/10.3109/19396368.2013.833658>
- Chávez, J. C., De La Vega-Beltrán, J. L., José, O., Torres, P., Nishigaki, T., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2018). Acrosomal alkalization triggers Ca^{2+} 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., Ferreira, J. J., Butler, A., De La Vega Beltrán, J. L., Treviño, C. L., Darszon, A., Salkoff, L., & Santi, C. M. (2014). SLO3 K^+ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(46), 32266-32275.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607556>
- Chen, H.-G., Sun, B., Chen, Y.-J., Chavarro, J. E., Hu, S.-H., Xiong, C.-L., Pan, A., Meng, T.-Q., Wang, Y.-X., & Messerlian, C. (2020). Sleep duration and quality in relation to semen quality in healthy men screened as potential sperm donors. *Environment International*, 135, 105368.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105368>
- Chhikara, N., Tomar, A. K., Datta, S. K., & Yadav, S. (2023). Proteomic changes in human spermatozoa during in vitro capacitation and acrosome reaction in normozoospermia and asthenozoospermia. *Andrology*, 11(1), 73-85. <https://doi.org/10.1111/andr.13289>

- Correia, J., Michelangeli, F., & Publicover, S. (2015). Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm. *REPRODUCTION*, 150(2), R65-R76. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0102>
- Cross, N. L., Morales, P., Overstreet, J. W., & Hanson, F. W. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research*, 15(3), 213-226. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120150303>
- Cui, J. (2021). BK Channel Gating Mechanisms: Progresses Toward a Better Understanding of Variants Linked Neurological Diseases. *Frontiers in Physiology*, 12, 762175. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.762175>
- Cutillas-Tolín, A., Mínguez-Alarcón, L., Mendiola, J., López-Espín, J. J., Jørgensen, N., Navarrete-Muñoz, E. M., Torres-Cantero, A. M., & Chavarro, J. E. (2015). Mediterranean and western dietary patterns are related to markers of testicular function among healthy men. *Human Reproduction*, dev236. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev236>
- Dai, J.-B., Wang, Z.-X., & Qiao, Z.-D. (2015). The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 17(6), 954. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.150847>
- Darbandi, M., Darbandi, S., Agarwal, A., Sengupta, P., Durairajanayagam, D., Henkel, R., & Sadeghi, M. R. (2018). Reactive oxygen species and male reproductive hormones. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0406-2>
- Darszon, A., & Hernández-Cruz, A. (2014). T-type Ca²⁺ channels in spermatogenic cells and sperm. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 466(4), 819-831. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1478-2>
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., & Espinosa, F. (1999). Ion Channels in Sperm Physiology. *Physiological Reviews*, 79(2), 481-510. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.2.481>
- 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>
- De La Vega-Beltran, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Krapf, D., Hernandez-González, E. O., Wertheimer, E., Treviño, C. L., Visconti, P. E., & Darszon, A. (2012). Mouse Sperm Membrane Potential Hyperpolarization Is Necessary and Sufficient to Prepare Sperm for the Acrosome

Reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44384-44393.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393488>

Delgado-Bermúdez, A., Yeste, M., Bonet, S., & Pinart, E. (2025). Physiological role of potassium channels in mammalian germ cell differentiation, maturation, and capacitation. *Andrology*, 13(2), 184-201. <https://doi.org/10.1111/andr.13606>

Di Renzo, L., De Lorenzo, A., Fontanari, M., Gualtieri, P., Monsignore, D., Schifano, G., Alfano, V., Marchetti, M., & On behalf of SIERR. (2022). Immunonutrients involved in the regulation of the inflammatory and oxidative processes: Implication for gamete competence. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(4), 817-846. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02472-6>

Diao, R., Wang, T., Fok, K. L., Li, X., Ruan, Y., Yu, M. K., Cheng, Y., Chen, Y., Chen, H., Mou, L., Cai, X., Wang, Y., Cai, Z., Zeng, X., & Chan, H. C. (2017). CCR6 is required for ligand-induced CatSper activation in human sperm. *Oncotarget*, 8(53), 91445-91458. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20651>

Echeverría, F., Gonzalez-Sanabria, N., Alvarado-Sanchez, R., Fernández, M., Castillo, K., & Latorre, R. (2024). Large conductance voltage-and calcium-activated K⁺ (BK) channel in health and disease. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1373507. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1373507>

Eisenberg, M. L., Esteves, S. C., Lamb, D. J., Hotaling, J. M., Giwercman, A., Hwang, K., & Cheng, Y.-S. (2023). Male infertility. *Nature Reviews Disease Primers*, 9(1), 49. <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00459-w>

Fainberg, J., & Kashanian, J. A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research*, 8, 670. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>

Fawcett, D. W. (1975). The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology*, 44(2), 394-436. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90411-X)

Ferreira, J. J., Lybaert, P., Puga-Molina, L. C., & Santi, C. M. (2021). Conserved Mechanism of Bicarbonate-Induced Sensitization of CatSper Channels in Human and Mouse Sperm. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 733653. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.733653>

- Fraire-Zamora, J. J., & González-Martínez, M. T. (2004). Effect of intracellular pH on depolarization-evoked calcium influx in human sperm. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(6), C1688-C1696. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00141.2004>
- Hackney, A. C. (2006). Exercise as a stressor to the human neuroendocrine system. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 42(10), 788-797.
- Hackney, A. C. (2008). Effects of endurance exercise on the reproductive system of men: The “exercise-hypogonadal male condition”. *Journal of Endocrinological Investigation*, 31(10), 932-938. <https://doi.org/10.1007/BF03346444>
- Harper, C. V., Barratt, C. L. R., & Publicover, S. J. (2004). Stimulation of Human Spermatozoa with Progesterone Gradients to Simulate Approach to the Oocyte. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 46315-46325. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401194200>
- Hildebrand, M. S., Avenarius, M. R., Fellous, M., Zhang, Y., Meyer, N. C., Auer, J., Serres, C., Kahrizi, K., Najmabadi, H., Beckmann, J. S., & Smith, R. J. H. (2010). Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *European Journal of Human Genetics*, 18(11), 1178-1184. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.108>
- Ho, H., & Suarez, S. (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: Function and regulation. *Reproduction*, 122(4), 519-526. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220519>
- 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 [(1 S,2 S)-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>
- 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>
- Imai, K., & Lehmann, H. (1975). The oxygen affinity of haemoglobin Tak, a variant with an elongated beta chain. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 412(2), 288-294. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(75\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0005-2795(75)90043-4)

- Jarow, J. P. (2002). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *The Journal of Urology*, 168(5), 2309.
- Karayiannis, D., Kontogianni, M. D., Mendorou, C., Douka, L., Mastrominas, M., & Yiannakouris, N. (2016). Association between adherence to the Mediterranean diet and semen quality parameters in male partners of couples attempting fertility. *Human Reproduction*, humrep;dew288v1. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew288>
- Kasman, A. M., Del Giudice, F., & Eisenberg, M. L. (2020). New insights to guide patient care: The bidirectional relationship between male infertility and male health. *Fertility and Sterility*, 113(3), 469-477. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.01.002>
- Kelly, M. C., Brown, S. G., Costello, S. M., Ramalingam, M., Drew, E., Publicover, S. J., Barratt, C. L. R., & Martins Da Silva, S. (2018). Single-cell analysis of $[Ca^{2+}]_i$ signalling in sub-fertile men: Characteristics and relation to fertilization outcome. *Human Reproduction*, 33(6), 1023-1033. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey096>
- Kirichok, Y., Navarro, B., & Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature*, 439(7077), 737-740. <https://doi.org/10.1038/nature04417>
- Kumar, N., & Singh, A. K. (2021). The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: An evolving mystery. *Biology of Reproduction*, 104(3), 508-520. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa213>
- Lewis, S. E. M. (2007). Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction*, 134(1), 31-40. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0152>
- Lin, S., Ke, M., Zhang, Y., Yan, Z., & Wu, J. (2021). Structure of a mammalian sperm cation channel complex. *Nature*, 595(7869), 746-750. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03742-6>
- Linares-Hernández, L., Guzmán-Grenfell, A. M., Hicks-Gomez, J. J., & González-Martínez, M. T. (1998). Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1372(1), 1-12. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00035-2)

- Lindemann, C. B., & Lesich, K. A. (2010). Flagellar and ciliary beating: The proven and the possible. *Journal of Cell Science*, 123(4), 519-528. <https://doi.org/10.1242/jcs.051326>
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387-391. <https://doi.org/10.1038/nature09767>
- Lishko, P. V., Miller, M. R., & Mansell, S. A. (2016). The Role of Sperm Ion Channels in Reproduction. En *Ion Channels in Health and Disease* (pp. 223-238). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802002-9.00009-1>
- López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís-López, A., Santi, C. M., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2014). Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 20(7), 619-629. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau029>
- Ma, J., Wu, L., Zhou, Y., Zhang, H., Xiong, C., Peng, Z., Bao, W., Meng, T., & Liu, Y. (2019). Association between BMI and semen quality: An observational study of 3966 sperm donors. *Human Reproduction*, 34(1), 155-162. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey328>
- MacDonald, A. A., Herbison, G. P., Showell, M., & Farquhar, C. M. (2010). The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: A systematic review with meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 16(3), 293-311. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp047>
- Mannowetz, N., Naidoo, N. M., Choo, S.-A. S., Smith, J. F., & Lishko, P. V. (2013). Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *eLife*, 2, e01009. <https://doi.org/10.7554/eLife.01009>
- Martínez-López, P., Santi, C. M., Treviño, C. L., Ocampo-Gutiérrez, A. Y., Acevedo, J. J., Alisio, A., Salkoff, L. B., & Darszon, A. (2009). Mouse sperm K⁺ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(2), 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.008>
- Mata-Martínez, E., Sánchez-Cárdenas, C., Chávez, J. C., Guerrero, A., Treviño, C. L., Corkidi, G., Montoya, F., Hernandez-Herrera, P., Buffone, M. G., Balestrini, P. A., & Darszon, A. (2021).

Role of calcium oscillations in sperm physiology. *Biosystems*, 209, 104524.

<https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2021.104524>

Matamoros-Volante, A., Castillo-Viveros, V., Torres-Rodríguez, P., Treviño, M. B., & Treviño, C. L.

(2020). Time-Lapse Flow Cytometry: A Robust Tool to Assess Physiological Parameters Related to the Fertilizing Capability of Human Sperm. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 93. <https://doi.org/10.3390/ijms22010093>

Matamoros-Volante, A., Moreno-Irusta, A., Torres-Rodriguez, P., Giojalas, L., Gervasi, M. G., Visconti, P. E., & Treviño, C. L. (2018). Semi-automatized segmentation method using image-based flow cytometry to study sperm physiology: The case of capacitation-induced tyrosine phosphorylation. *Molecular Human Reproduction*, 24(2), 64-73.

<https://doi.org/10.1093/molehr/gax062>

Mendoza-Sánchez, J. E., Chávez-Zamora, J. C., Rodríguez-Tobón, A., Morales Otal, A., & Arenas-Ríos, E. (2024). Canal catiónico específico del espermatozoide: CatSper. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 27.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2024.685>

Michalek, K., & Oberska, P. (2023). Aquaporins in the male reproductive system: A chance for paternity or a road to nowhere? *Andrology*, 11(6), 970-972. <https://doi.org/10.1111/andr.13374>

Minta, A., Kao, J. P. Y., & Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 8171-8178. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83165-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83165-9)

Nishikimi, A., Yamada, M., Minami, N., & Utsumi, K. (1997). Evaluation of acrosomal status of bovine spermatozoa using concanavalin a lectin. *Theriogenology*, 48(6), 1007-1016.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00327-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00327-0)

Orta, G., De La Vega-Beltran, J. L., Martín-Hidalgo, D., Santi, C. M., Visconti, P. E., & Darszon, A. (2018). CatSper channels are regulated by protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16830-16841. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001566>

Ortiz-Vallecillo, A., Santamaría-López, E., García-Ruiz, D., Martín-Lozano, D., Candenias, L., Pinto, F. M., Fernández-Sánchez, M., & González-Ravina, C. (2024). Influence of BMI, Cigarette

Smoking and Cryopreservation on Tyrosine Phosphorylation during Sperm Capacitation.

International Journal of Molecular Sciences, 25(14), 7582.

<https://doi.org/10.3390/ijms25147582>

Paul, N., Talluri, T. R., Nag, P., & Kumaresan, A. (2021). Epididymosomes: A potential male fertility influencer. *Andrologia*, 53(9). <https://doi.org/10.1111/and.14155>

Paulsen, D. F. (2022). *Histology & cell biology: A USMLE step 1 review* (Sixth edition). McGraw-Hill.

Pinto, F. M., Odriozola, A., Candenaz, L., & Subirán, N. (2023). The Role of Sperm Membrane Potential and Ion Channels in Regulating Sperm Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 6995. <https://doi.org/10.3390/ijms24086995>

Plášek, J., Dale, R. E., Sigler, K., & Laskay, G. (1994). Transmembrane potentials in cells: A diS-C3(3) assay for relative potentials as an indicator of real changes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1196(2), 181-190. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)00209-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)00209-6)

Potiris, A., Moustakli, E., Trismpioti, E., Drakaki, E., Mavrogianni, D., Matsas, A., Zikopoulos, A., Sfakianakis, A., Tsakiridis, I., Dagklis, T., Zachariou, A., Christopoulos, P., Domali, E., Drakakis, P., & Stavros, S. (2025). From Inflammation to Infertility: How Oxidative Stress and Infections Disrupt Male Reproductive Health. *Metabolites*, 15(4), 267. <https://doi.org/10.3390/metabo15040267>

Publicover, S., Harper, C. V., & Barratt, C. (2007). [Ca²⁺]_i signalling in sperm—Making the most of what you've got. *Nature Cell Biology*, 9(3), 235-242. <https://doi.org/10.1038/ncb0307-235>

Qamar, A. Y., Naveed, M. I., Raza, S., Fang, X., Roy, P. K., Bang, S., Tanga, B. M., Saadeldin, I. M., Lee, S., & Cho, J. (2023). Role of antioxidants in fertility preservation of sperm—A narrative review. *Animal Bioscience*, 36(3), 385-403. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0325>

Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I. S., Quill, T. A., & Clapham, D. E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4), 1219-1223. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610286104>

- Quill, T. A., Sugden, S. A., Rossi, K. L., Doolittle, L. K., Hammer, R. E., & Garbers, D. L. (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14869-14874.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2136654100>
- Rahban, R., & Nef, S. (2020). CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518, 110951.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110951>
- Ren, D., & Xia, J. (2010). Calcium Signaling Through CatSper Channels in Mammalian Fertilization. *Physiology*, 25(3), 165-175. <https://doi.org/10.1152/physiol.00049.2009>
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), 1458-1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
- Ritagliati, C., Baro Graf, C., Stival, C., & Krapf, D. (2018). Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mechanisms of Development*, 154, 33-43.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.04.004>
- Romarowski, A., Sánchez-Cárdenas, C., Ramírez-Gómez, H. V., Puga Molina, L. del C., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A., Darszon, A., & Buffone, M. G. (2016). A Specific Transitory Increase in Intracellular Calcium Induced by Progesterone Promotes Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm. *Biology of Reproduction*, 94(3), 63. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.136085>
- Salas-Huetos, A., Bulló, M., & Salas-Salvadó, J. (2017). Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: A systematic review of observational studies. *Human Reproduction Update*, 23(4), 371-389. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx006>
- Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., & Wei, A. (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(12), 921-931.
<https://doi.org/10.1038/nrn1992>
- Sánchez Cárdenas, C., Hernández-Cruz, A., Visconti, P. E., & Darszon, A. (2025). Real-Time Acrosome Reaction and Intracellular Calcium Recordings in Mice Sperm. En M. Álvarez-Rodríguez (Ed.), *Spermatology* (Vol. 2897, pp. 417-433). Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4406-5_27

- Sánchez González, S. R., Mata Martínez, E., Torres Juárez, J. A., Arias, R. J., De Blas, G. A., & Sánchez Tusie, A. A. (2023). Cortisol modulates Ca^{2+} signaling and acrosome reaction in human sperm. *Andrology*, 11(1), 134-142. <https://doi.org/10.1111/andr.13319>
- Sánchez, V., Wistuba, J., & Mallidis, C. (2013). Semen analysis: Update on clinical value, current needs and future perspectives. *REPRODUCTION*, 146(6), R249-R258. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0109>
- Sánchez-Cárdenas, C., Guerrero, A., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A., & Darszon, A. (2012). Acute Slices of Mice Testis Seminiferous Tubules Unveil Spontaneous and Synchronous Ca^{2+} Oscillations in Germ Cell Clusters1. *Biology of Reproduction*, 87(4). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100255>
- Sánchez-Cárdenas, C., Servín-Vences, M. R., José, O., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A., & Darszon, A. (2014). Acrosome Reaction and Ca^{2+} Imaging in Single Human Spermatozoa: New Regulatory Roles of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Biology of Reproduction*, 91(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.119768>
- Sánchez-Carranza, O., Torres-Rodríguez, P., Darszon, A., Treviño, C. L., & López-González, I. (2015). Pharmacology of hSlo3 channels and their contribution in the capacitation-associated hyperpolarization of human sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 466(3), 554-559. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.073>
- Santi, C. M., Martínez-López, P., De La Vega-Beltrán, J. L., Butler, A., Alisio, A., Darszon, A., & Salkoff, L. (2010). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Letters*, 584(5), 1041-1046. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.005>
- Santi, C. M., Orta, G., Salkoff, L., Visconti, P. E., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2013). K^+ and Cl^- channels and transporters in sperm function. *Current Topics in Developmental Biology*, 102, 385-421. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416024-8.00014-3>
- Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M., & Salkoff, L. (1998). Slo3, a Novel pH-sensitive K^+ Channel from Mammalian Spermatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), 3509-3516. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3509>

- Shamsi, M. B., Imam, S. N., & Dada, R. (2011). Sperm DNA integrity assays: Diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(11), 1073-1085. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9631-8>
- Shi, X., Chan, C. P. S., Waters, T., Chi, L., Chan, D. Y. L., & Li, T.-C. (2018). Lifestyle and demographic factors associated with human semen quality and sperm function. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 64(5), 358-367. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1491074>
- Šíp, M., Heřman, P., Plášek, J., & Hroudá, V. (1990). Transmembrane potential measurement with carbocyanine dye diS-C3-(5): Fast fluorescence decay studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 4(3), 321-328. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(90\)85037-W](https://doi.org/10.1016/1011-1344(90)85037-W)
- Skoracka, K., Eder, P., Łykowska-Szuber, L., Dobrowolska, A., & Krela-Kaźmierczak, I. (2020). Diet and Nutritional Factors in Male (In)fertility—Underestimated Factors. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5), 1400. <https://doi.org/10.3390/jcm9051400>
- Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J. A., Wetzel, C. H., Zimmer, R. K., & Hatt, H. (2003). Identification of a Testicular Odorant Receptor Mediating Human Sperm Chemotaxis. *Science*, 299(5615), 2054-2058. <https://doi.org/10.1126/science.1080376>
- Stein, J. M. (1975). The effect of adrenaline and of alpha- and beta-adrenergic blocking agents on ATP concentration and on incorporation of ^{32}P into ATP in rat fat cells. *Biochemical Pharmacology*, 24(18), 1659-1662. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(75\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(75)90002-7)
- Stival, C., Puga Molina, L. D. C., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E., & Krapf, D. (2016). Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. En M. G. Buffone (Ed.), *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization* (Vol. 220, pp. 93-106). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7_5
- Strücker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., & Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature*, 471(7338), 382-386. <https://doi.org/10.1038/nature09769>
- Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*, 14(6), 647-657. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn029>

- Suarez, S. S., Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B., & Powell, R. L. (1991). Evidence for the Function of Hyperactivated Motility in Sperm1. *Biology of Reproduction*, 44(2), 375-381. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.2.375>
- Sweatt, K., Garvey, W. T., & Martins, C. (2024). Strengths and Limitations of BMI in the Diagnosis of Obesity: What is the Path Forward? *Current Obesity Reports*, 13(3), 584-595. <https://doi.org/10.1007/s13679-024-00580-1>
- Tamburrino, L., Marchiani, S., Minetti, F., Forti, G., Muratori, M., & Baldi, E. (2014). The CatSper calcium channel in human sperm: Relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. *Human Reproduction*, 29(3), 418-428. <https://doi.org/10.1093/humrep/det454>
- Tang, Q.-Y., Zhang, Z., Xia, J., Ren, D., & Logothetis, D. E. (2010). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Activates Slo3 Currents and Its Hydrolysis Underlies the Epidermal Growth Factor-induced Current Inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19259-19266. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.100156>
- Tang, Q.-Y., Zhang, Z., Xia, X.-M., & Lingle, C. J. (2010). Block of mouse Slo1 and Slo3 K⁺ channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine. *Channels*, 4(1), 22-41. <https://doi.org/10.4161/chan.4.1.10481>
- Tateno, H., Krapf, D., Hino, T., Sánchez-Cárdenas, C., Darszon, A., Yanagimachi, R., & Visconti, P. E. (2013). Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18543-18548. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317113110>
- Taura, J., Kircher, D. M., Gameiro-Ros, I., & Slesinger, P. A. (2021). Comparison of K⁺ Channel Families. En N. Gamper & K. Wang (Eds.), *Pharmacology of Potassium Channels* (Vol. 267, pp. 1-49). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/164_2021_460
- Uhlén, P., & Fritz, N. (2010). Biochemistry of calcium oscillations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 28-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.117>

- Treviño Santa Cruz, C., Torres Rodríguez, P., & Chávez Zamora, J. C. (2024). *Aportaciones de la biotecnología para atender la infertilidad*. Obsidiana Digital. Recuperado de <https://obsidianadigital.mx/aportaciones-de-la-biotecnologia-a-la-infertilidad/>
- Vaamonde, D., Da Silva-Grigoletto, M. E., García-Manso, J. M., Vaamonde-Lemos, R., Swanson, R. J., & Oehninger, S. C. (2009). Response of semen parameters to three training modalities. *Fertility and Sterility*, 92(6), 1941-1946. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.010>
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa: I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121(4), 1129-1137. <https://doi.org/10.1242/dev.121.4.1129>
- Wang, C., & Swerdloff, R. S. (2014). Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertility and Sterility*, 102(6), 1502-1507. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.021>
- Wang, D., King, S. M., Quill, T. A., Doolittle, L. K., & Garbers, D. L. (2003). A new sperm-specific Na⁺/H⁺ Exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature Cell Biology*, 5(12), 1117-1122. <https://doi.org/10.1038/ncb1072>
- Wang, H., McGoldrick, L. L., & Chung, J.-J. (2021). Sperm ion channels and transporters in male fertility and infertility. *Nature Reviews Urology*, 18(1), 46-66. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00390-9>
- Wang, J., Tang, H., Zou, Q., Zheng, A., Li, H., Yang, S., & Xiang, J. (2021). Patient with CATSPER3 mutations-related failure of sperm acrosome reaction with successful pregnancy outcome from intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 9(2), e1579. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1579>
- Wang, J.-J., Wang, S.-X., Tehmina, Feng, Y., Zhang, R.-F., Li, X.-Y., Sun, Q., & Ding, J. (2022). Age-Related Decline of Male Fertility: Mitochondrial Dysfunction and the Antioxidant Interventions. *Pharmaceuticals*, 15(5), 519. <https://doi.org/10.3390/ph15050519>
- Wassarman, P. M. (1999). Mammalian Fertilization. *Cell*, 96(2), 175-183. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80558-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80558-9)

- Wehrli, L., Altevogt, H., Brenker, C., Zufferey, F., Rossier, M. F., Strünker, T., Nef, S., & Rahban, R. (2025). The major phytocannabinoids, delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), affect the function of CatSper calcium channels in human sperm. *Human Reproduction*, 40(5), 796-807. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaf020>
- Whirledge, S., & Cidlowski, J. A. (2010). Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinologica*, 35(2), 109-125.
- WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (6th ed). (2010). World Health Organization.
- Wise, L. A., Cramer, D. W., Hornstein, M. D., Ashby, R. K., & Missmer, S. A. (2011). Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. *Fertility and Sterility*, 95(3), 1025-1030. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.11.006>
- Wise, L. A., Rothman, K. J., Wesselink, A. K., Mikkelsen, E. M., Sorensen, H. T., McKinnon, C. J., & Hatch, E. E. (2018). Male sleep duration and fecundability in a North American preconception cohort study. *Fertility and Sterility*, 109(3), 453-459. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.11.037>
- Woolley, D. (2003). Motility of spermatozoa at surfaces. *Reproduction*, 126(2), 259-270. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260259>
- Yanagimachi, R. (1970). THE MOVEMENT OF GOLDEN HAMSTER SPERMATOZOA BEFORE AND AFTER CAPACITATION. *Reproduction*, 23(1), 193-196. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0230193>
- Yang, F., Gracia Gervasi, M., Orta, G., Tourzani, D. A., De La Vega-Beltrán, J. L., Ruthel, G., Darszon, A., Visconti, P. E., & Wang, P. J. (2022). C2CD6 regulates targeting and organization of the CatSper calcium channel complex in sperm flagella. *Development*, 149(2), dev199988. <https://doi.org/10.1242/dev.199988>
- Yang, Y., Yang, L., Han, X., Wu, K., Mei, G., Wu, B., & Cheng, Y. (2024). The regulation role of calcium channels in mammalian sperm function: A narrative review with a focus on humans and mice. *PeerJ*, 12, e18429. <https://doi.org/10.7717/peerj.18429>

- Young, S., Schiffer, C., Wagner, A., Patz, J., Potapenko, A., Herrmann, L., Nordhoff, V., Pock, T., Krallmann, C., Stallmeyer, B., Röpke, A., Kierzek, M., Biagioni, C., Wang, T., Haaleck, L., Deuster, D., Hansen, J. N., Wachten, D., Risse, B., ... Strünker, T. (2024). Human fertilization in vivo and in vitro requires the CatSper channel to initiate sperm hyperactivation. *Journal of Clinical Investigation*, 134(1), e173564. <https://doi.org/10.1172/JCI173564>
- Zarei, A. A., Keshtgar, S., Haghani, M., Firouzabadi, N., & Nasr-Esfahani, M. H. (2025). Comparison between Inhibition of CatSper and KSper Channels with NNC 55-0396 and Quinidine on Human Sperm Function. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 50(3), 187-196. <https://doi.org/10.30476/ijms.2024.102383.3528>
- Zeng, X.-H., Yang, C., Kim, S. T., Lingle, C. J., & Xia, X.-M. (2011). Deletion of the *Slo3* gene abolishes alkalization-activated K^+ current in mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5879-5884. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100240108>
- Zhong, O., Liao, B., Wang, J., Liu, K., Lei, X., & Hu, L. (2022). Effects of Sleep Disorders and Circadian Rhythm Changes on Male Reproductive Health: A Systematic Review and Meta-analysis. *Frontiers in Physiology*, 13, 913369. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.913369>