

© 2024 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 27: 1-13, 2024.

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

Canal catiónico específico del espermatozoide: CatSper

José Edwin Mendoza-Sánchez¹, Julio C. Chávez-Zamora²,
Ahiezer Rodríguez-Tobón¹, Adriana Morales Ota³ y Edith Arenas-Ríos^{1*}

¹Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco # 186, Leyes de Reforma 1ra. Sección, Alcaldía Iztapalapa, 09340, Ciudad de México, México. ²Consortio de Fisiología del Espermatozoide, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, 62210, Morelos, México. ³Área de Neurociencias, Depto. de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana, Alcaldía Iztapalapa, 09340, Ciudad de México, México. E-mail: *editharenas2000@yahoo.com.mx

RESUMEN

El canal catiónico específico del espermatozoide (CatSper) es un canal conductor de calcio esencial para regular la movilidad hiperactivada y, en última instancia, la promoción de la fertilidad en los espermatozoides. Este canal se localiza en el flagelo del espermatozoide y está regulado por la alcalinización, el voltaje y diferentes moléculas presentes en el tracto reproductivo femenino. CatSper está compuesto por un complejo tetramérico de proteínas formadoras de poros, seis subunidades auxiliares y tres proteínas adicionales: C2CD6, SLCO6C1 y TEM249. La eliminación de cualquiera de estas subunidades impacta negativamente en la fertilidad masculina, ya que conduce a la pérdida o disminución de la actividad del canal. A pesar de su importancia, la incapacidad de expresar este canal iónico en sistemas heterólogos ha impedido una comprensión completa de su función y regulación. Sin embargo, el uso de diferentes técnicas y herramientas bioinformáticas han permitido avances en el estudio de su estructura y su conservación evolutiva. Estos estudios han revelado que la distribución filogenética de CatSper refleja adaptaciones en las subunidades que lo componen, al posibilitar que los espermatozoides experimenten diferentes estados fisiológicos, críticos para la fertilización del ovocito. El objetivo de esta revisión es analizar detalladamente la estructura, la localización, la función, los mecanismos de activación y la conservación filogenética de CatSper, para proporcionar un panorama integral de su papel en la fertilidad masculina y su evolución a través del reino animal.

Palabras clave: canal iónico, CatSper, espermatozoide, canal de calcio, estructura de las proteínas, filogenética.

Sperm-specific cation channel: CatSper

ABSTRACT

The sperm-specific cation channel (CatSper) is an essential calcium-conducting channel responsible for regulating hyperactivated motility and promoting sperm fertility. Located on the sperm flagellum, CatSper is regulated by alkalinization, voltage, and various molecules present in the female reproductive tract. CatSper forms a tetrameric complex composed of pore-forming proteins, six auxiliary subunits, and three additional proteins: C2CD6, SLCO6C1, and TEM249. The removal of any of these subunits affects male fertility due to the absence or reduced activity of the channel. The inability to express this ion channel in heterologous systems has hindered a complete understanding of its function and regulation. However, various techniques and bioinformatic tools have allowed for the study of the function and conservation of the channel across different groups within the animal kingdom. These studies suggest that the phylogenetic distribution of CatSper may represent an adaptation of its subunits, enabling sperm to exhibit different physiological states for oocyte fertilization. This review aims to analyze the structure, localization, function, activation mechanisms, and phylogenetic conservation of CatSper.

Keywords: ion channel, CatSper, sperm, calcium channel, protein structure, phylogenetics.

INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis es un proceso fisiológico que implica la síntesis y diferenciación de los espermatozoides en el testículo (Griswold, 2016; Griswold & Hogarth, 2018). Este proceso se caracteriza por la proliferación de las espermatogonias por mitosis; la división de los espermatocitos genera células haploides por meiosis y la diferenciación morfológica de las espermátidas en los espermatozoides (Griswold, 2016; Holt, Stanger, Nixon & McLaughlin, 2016; Ni, Hao & Yang, 2019). Posteriormente, los espermatozoides son liberados al lumen de los túbulos seminíferos para ser transportados a través de los conductos eferentes hasta el epidídimo (Griswold, 2016). Durante su tránsito por el epidídimo, los espermatozoides presentan modificaciones bioquímicas, morfológicas y fisiológicas que favorecen el potencial fecundante de los gametos (Gervasi & Visconti, 2017). Sin embargo, los espermatozoides eyaculados aún no son capaces de fecundar un ovocito; esta capacidad se adquiere durante el tránsito por el tracto reproductor femenino, en el que ocurren una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos, descritos como capacitación espermática (Austin, 1952; Chang, 1951). Es en el tracto en donde el espermatozoide desarrolla una movilidad hiperactiva (patrón de movilidad asimétrica, es decir, fuerte batido flagelar asimétrico de alta amplitud y baja frecuencia), proceso que se requiere para liberar al espermatozoide adherido al epitelio del oviducto (Gervasi & Visconti, 2016; Stival *et al.*, 2016; Suarez & Ho, 2003). Finalmente, después de la capacitación, ocurre la liberación de las enzimas proteolíticas contenidas en el acrosoma de los gametos [la reacción acrosómica (RA)]; evento que se cree que es desencadenado por la unión del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP) del ovocito (Buffone, 2016). Sin embargo, ahora se sabe que la RA ocurre por estimulación de moléculas sintetizadas por las células del cúmulo antes de llegar a la ZP (Hirohashi, Gerton & Buffone, 2011; Jin *et al.*, 2011; Okabe, 2016).

Los procesos fisiológicos que ocurren en los espermatozoides como la hiperactivación, la capacitación y la RA, están relacionados con el cambio en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). En los mamíferos, se ha descrito que el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ se debe a su liberación desde depósitos internos como el acrosoma y la envoltura nuclear redundante (ENR), y a su captación desde el medio extracelular a través de canales iónicos y transportadores presentes en la membrana plasmática y en la membrana de los depósitos internos (Costello *et al.*, 2009; Jin & Yang, 2017). Exclusivamente en los espermatozoides se ha descrito el canal de cationes implicado en el transporte de Ca^{2+} , conocido como CatSper, que es uno de los principales canales involucrados en el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ (Brown *et al.*, 2017). La actividad de este canal se ha asociado con la fertilidad masculina al regular procesos fisiológicos como la hiperactivación dependiente de $[Ca^{2+}]_i$ en humanos y en ratones, así como la quimiotaxis en

los erizos de mar. Sin embargo, la participación de CatSper en la RA aún no está clara.

Este canal se encuentra en la membrana plasmática de la pieza principal del flagelo y fue identificado en espermatozoides de ratón en el año 2001 mediante la clonación de su gen (Ren *et al.*, 2001). CatSper contiene el mayor número de subunidades en comparación con cualquier canal iónico conocido (Lin, Ke, Zhang, Yan & Wu, 2021). Se ha reportado que los defectos en el gen que codifica CatSper o cualquiera de sus subunidades alteran la hiperactivación del espermatozoide, lo que impide su llegada al ovocito, la penetración a través de las células circundantes y la fertilización, impactando negativamente en la fertilidad masculina (Chung, Navarro, Krapivinsky & Clapham, 2011; Liu, Xia, Cho, Clapham & Ren, 2007; Qi *et al.*, 2007; Singh & Rajender, 2015; Wang, Liu, Cho & Ren, 2009). Además, para aclarar la participación de CatSper en la fisiología espermática, se han realizado estudios generando modelos knockout para: anticuerpos específicos (Singh & Rajender, 2015; Ren *et al.*, 2001), inhibidores de canales de Ca^{2+} (Lishko, Botchkina & Kirichok, 2011; Strünker *et al.*, 2011) y patch-clamp (Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011). En esta revisión abordaremos la estructura, funciones, mecanismos de activación y conservación filogenética de CatSper.

CATSPER

Estructura de CatSper

El canal CatSper está formado por al menos 10 subunidades que en conjunto forman un complejo heteromérico (Lin *et al.*, 2021; Rahban & Nef, 2020). Tiene cuatro subunidades alfa (α), (CatSper1-4) que participan en la formación de poros y seis subunidades auxiliares CatSper beta (β), CatSper delta (δ), CatSper gamma (γ), CatSper épsilon (ϵ), CatSper zeta (ζ) y EFCAB9 (proteína similar a la calmodulina que actúa como sensor dual del Ca^{2+} y del pH), ubicadas en la membrana plasmática de la pieza principal del flagelo (Figura 1), (Chung *et al.*, 2017; Darszon, Nishigaki, Beltrám & Treviño, 2011; Rahban & Nef, 2020). Además, se han identificado proteínas adicionales a este complejo: C2CD6, (CatSper τ), (Yang *et al.*, 2021), SLCO6C1 y TEM249 (Lin *et al.*, 2021).

Mediante microscopía de alta resolución, observaron que el canal CatSper forma cuatro compartimentos lineales en la membrana flagelar, lo que forma un nanodominio de señalización en los cuadrantes flagelares. La importancia de la organización de los nanodominios flagelares es esencial para regular el movimiento ondulatorio del batido flagelar y, por tanto, la movilidad espermática (Zhao *et al.*, 2021). La estructura y distribución de las subunidades de CatSper son esenciales para el funcionamiento del canal (Qi *et al.*, 2007). Los estudios sobre este concluyen que la ausencia del canal iónico o la deficiencia de alguna de sus subunidades afecta a la fertilidad masculina, impidiendo que el espermatozoide llegue a la zona de reconocimiento con el ovocito y lo fecunde (Pereira, Sá, Barros & Sousa, 2017).

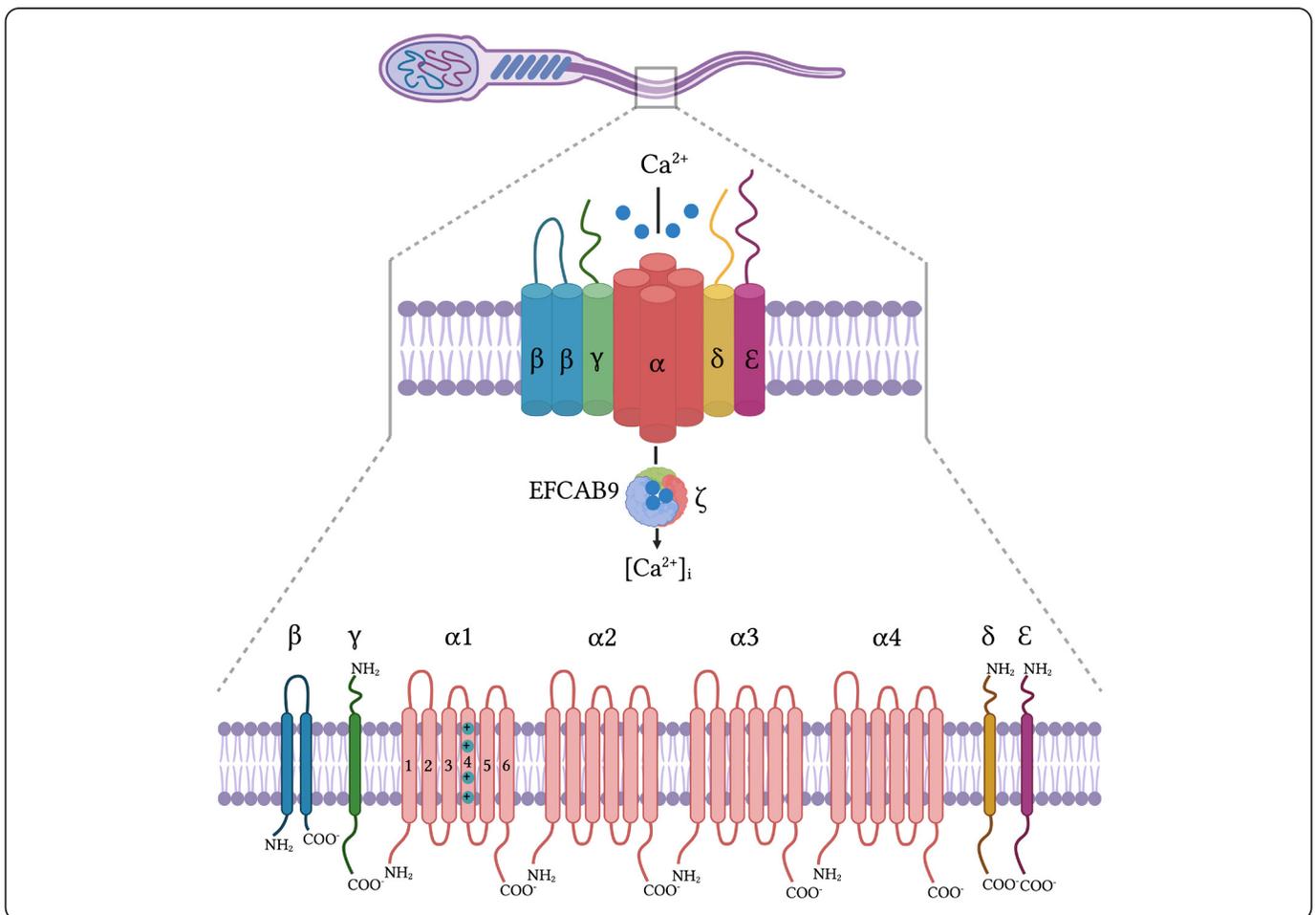


Figura 1. CatSper. El canal, ubicado en la pieza principal del flagelo del espermatozoide, forma un complejo heteromérico que consta de cuatro subunidades α que forman un poro y seis subunidades auxiliares: CatSper β (beta), CatSper δ (delta), CatSper γ (gamma), CatSper ϵ (épsilon), CatSper ζ (zeta); y EFCAB9 (proteína similar a la calmodulina que actúa como un sensor dual para Ca^{2+} y pH). Cada subunidad α está formada por seis segmentos transmembrana (S1-6), de los cuales S4 detecta el voltaje a través de los aminoácidos cargados positivamente (lisina/arginina) y S5-6 forman el poro del canal (Rahban & Nef, 2020).

CatSper α

La primera estructura de CatSper que identificaron fue la de las subunidades α , CatSper1, mediante la clonación putativa del gen que codifica a la subunidad (Ren *et al.*, 2001). CatSper1 es diferente de las otras tres subunidades α (CatSper2-CatSper4), ya que tiene un dominio terminal citoplasmático rico en histidinas que funciona como un sensor de pH (alcalinización), [83 histidinas en 446 aminoácidos que componen el amino-terminal (N-terminal)], (Ren *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2011; Darszon *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2021). Además, un conjunto de estudios realizados por Ren *et al.* (2001) la localizaron en el espermatozoide y atribuyeron a CatSper como una proteína necesaria para la movilidad normal de los gametos masculinos y su penetración en la ZP que rodea al ovocito. En el mismo año, CatSper2 fue identificada en un espermatozoide de ratón, de rata y de humano, mostrando un 21% de homología y un 40% de similitud de la región transmembranal al compararla

con CatSper1 (Quill, Ren, Clapham & Garbers, 2001). Así mismo, Lobley, Pierron, Reynolds, Allen & Michalovich (2003), mediante identificación génica *in silico*, obtuvieron las secuencias de CatSper3 y CatSper4 en ratones y en humanos. Además, describieron dominios de interacción proteína-proteína en el grupo carboxilo terminal (C-terminal) de cada una de las subunidades α de CatSper y sugerir que CatSper1-4 interactúa directa o indirectamente para formar un tetrámero funcional (Lobley *et al.*, 2003; Babcock, 2007). Al igual que con CatSper 1 y 2, se demostraron que las subunidades CatSper3 y 4 se localizan en la pieza principal del flagelo y que la alteración genética de cualquiera de las cuatro subunidades afecta a los espermatozoides al modificar la actividad del canal CatSper, lo que, conduce a la pérdida de la movilidad hiperactivada (Quill *et al.*, 2001; Quill, Sugden, Rossi, Doolittle, Hamer & Garbers, 2003; Qi *et al.*, 2007).

Cada subunidad α tiene seis segmentos transmembranales (TMS); los primeros cuatro TMS (S1-4) contienen un sensor de voltaje y los dos últimos (S5 y S6) unidos por una estructura cíclica hidrofóbica forman el poro del canal (Figura 1), (Lin *et al.*, 2021; Singh & Rajender, 2015). Cuatro residuos de glutamina/aspartato (Asp536, Asp295, Asp227 y Asp237) se repiten en la región del poro, lo que proporciona selectividad de Ca^{2+} en el canal (Singh & Rajende, 2015; Navarro, Kirichok, Chung & Clapham, 2008; Lin *et al.*, 2021). Los S1-4 están unidos por una estructura cíclica corta, donde los aminoácidos con carga positiva (lisina/arginina) están presentes en la región transmembranal S4 para detectar el voltaje y activar el canal. La cantidad de residuos cargados positivamente en S4 varía según la subunidad α ; siete en CatSper1, cuatro en CatSper2 y dos en CatSper3 (Lin *et al.*, 2021).

Por otra parte, Ren y colaboradores determinaron que el ARNm y la proteína CatSper1-3 sólo están presentes en el testículo, diferente a CatSper4 que se expresa en los tejidos testicular, placentario y pulmonar (Ren *et al.*, 2001). En el análisis de microarreglos encontraron: el ARNm de CatSper2 en los espermatoцитos en la etapa de paquiteno a los 12 días posparto en testículos de ratón, y a CatSper1 en las espermátidas redondas el día 20 posparto (Schultz, Hamra & Garbers, 2003), así como a CatSper 3 y CatSper 4 (Jin, O'Doherty, Wang, Zheng, Sanders & Yan, 2005).

CatSper β

Tras identificar las cuatro proteínas (CatSper1-4) implicadas en el ensamblaje de CatSper, la primera subunidad auxiliar en ser identificada fue CatSper β , a partir de búsquedas en las bases de datos y uso del PCR de transcripción inversa (Liu *et al.*, 2007). En ratón, CatSper β está formada por dos dominios transmembranales de 1,109 aminoácidos con un peso de 126 kDa; un dominio extracelular de (1,060-1,076 aminoácidos) y un dominio intracelular de (6-22 aminoácidos),

(Lin *et al.*, 2021). La expresión de ARNm se llevó a cabo en espermatoцитos y espermátidas, pero no en espermatoгонias (Liu *et al.*, 2007).

La búsqueda en las bases de datos indica que CatSper β es de función desconocida. Además, esta subunidad se conserva entre humanos y ratones con una identidad del 56% (Liu *et al.*, 2007).

CatSper γ

Wang *et al.* (2009) identificaron la segunda subunidad auxiliar, CatSper γ , en ratones con 1,145 aminoácidos y un peso molecular de 131 kDa. La estructura de CatSper γ se limita a un segmento transmembranal con un dominio extracelular de (1,000 aminoácidos) y un dominio intracelular de (58 aminoácidos). También detectaron ARNm en testículos, específicamente en los espermatoцитos y en las espermátidas de ratón (Wang *et al.*, 2009), como se describió para las subunidades α (Babcock, 2007) y β (Liu *et al.*, 2007). CatSper γ en el espermatozoide se encuentra en la pieza principal (Wang *et al.*, 2009). Cabe destacar que CatSper γ está presente en los genomas de animales en los que este se localiza, incluidos el de ratón, el de humanos y el de erizo de mar con un 55% de identidad entre el ser humano y el ratón (Wang *et al.*, 2009). Sin embargo, está ausente en el genoma de animales como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (Wang *et al.*, 2009).

CatSper δ

Mediante un análisis proteómico de purificación por afinidad seguido de espectrometría de masas, se identificó que el gen *Tmem146* codifica la subunidad auxiliar CatSper δ que tiene un supuesto dominio transmembranal (Lin *et al.*, 2021). El ARNm de CatSper δ se detectó en espermatoцитos y espermátidas en diferentes etapas de la espermatogénesis, como se encontró previamente para CatSper1-4, CatSper β y CatSper γ . CatSper δ tiene 805 aminoácidos de longitud con un peso molecular de 91 kDa. En el ratón, esta subunidad tiene un dominio extracelular de 699 aminoácidos seguido de un dominio transmembranal que termina en una cola intracelular de 60 aminoácidos (Chung *et al.*, 2011).

Las subunidades α , β y γ de CatSper tienen el mismo patrón evolutivo; sus ortólogos están presentes en los genomas de mamíferos, así como en el de las ascidias (*Ciona intestinalis*) y en el de los erizos de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*), (Cai & Clapham, 2008). Los ortólogos de CatSper δ los encontraron sólo en mamíferos y en un reptil (*Anolis carolinensis*), lo que implica que CatSper δ imparte una función específica de la especie y muestra signos de cambio evolutivo rápido debido a que la identidad de secuencia entre CatSper δ humano y de ratón es baja (51%), (Chung *et al.*, 2011). CatSper δ es necesario para la estabilidad de la formación del complejo CatSper, ya que se encontró que la ausencia de esta subunidad en el ratón disminuye el flujo de Ca^{2+} y la movilidad hiperactivada (Chung *et al.*, 2011).

Gen	Humano	Ratón
CatSper1	11q13.1	19A
CatSper2	15q15.3	2E5
CatSper3	5q31.1	13B1
CatSper4	1p36.11	4D3

Figura 2. Localización genética de las subunidades CatSper α (1-4) en humanos y en ratones. Modificado de: Singh & Rajender, 2015.

CatSper ϵ and ζ

En el año 2017, se dio a conocer que los genes *Gm7068* y *Tex40* codifican las subunidades transmembranales CatSper ϵ y CatSper ζ , respectivamente. Al igual que las otras subunidades auxiliares de CatSper, los ARNm de CatSper ϵ y CatSper ζ se expresan específicamente en las células germinales (Chung *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2018). Además, en el espermatozoide de humano y de ratón, estas proteínas se encuentran en la pieza principal del flagelo (Chung *et al.*, 2017). A diferencia de CatSper ϵ , la subunidad ζ no contiene dominios transmembranales, es un componente citoplasmático de CatSper (Chung *et al.*, 2017), que se compone principalmente de hélices α .

CatSper ϵ y CatSper ζ en humanos y ratones muestran un cambio evolutivo rápido con un 50% y 40% de identidad de secuencia de aminoácidos, respectivamente. Se demostró que CatSper ζ se conserva sólo en mamíferos, esto sugiere que la adaptación de esta proteína está involucrada en la reotaxis espermática dentro del tracto reproductivo femenino, ya que observaron que la alteración genética CatSper ζ reduce la corriente CatSper y la flexibilidad del flagelo afectando la movilidad hiperactivada y la reotaxis espermática, cuyo resultado es la subfertilidad. Es decir, los espermatozoides de ratones nulos CatSper ζ logran un 20% de fertilización (Chung *et al.*, 2017).

Mediante un análisis bioinformático, determinaron una alta homología entre las subunidades CatSper ϵ y CatSper δ (52% de aminoácidos idénticos/similares) al alinear las secuencias extracelulares de estas proteínas, lo que sugiere que CatSper ϵ cumple la función de estabilizar el ensamblaje del complejo CatSper (Chung *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2018).

EFCAB9

En un análisis proteómico y genómico comparativo, identificaron la proteína 9 que contiene un dominio EF de unión a Ca^{2+} (EFCAB9), que modula la actividad y organización de CatSper (Hwang *et al.*, 2019). Confirmaron que el gen *Efcab9* se expresa sólo en el testículo y se conserva evolutivamente a partir de los eucariotas unicelulares flagelados como otras subunidades transmembranales de CatSper y está intracelularmente en el cuerpo principal del espermatozoide. A diferencia de las subunidades auxiliares descritas previamente, EFCAB9 tiene tres motivos de unión al Ca^{2+} , que son las cadenas laterales de ácido aspártico y glutámico ubicadas en cada bucle (Hwang *et al.*, 2019). Además, tiene dos cadenas que contienen el dominio EF, que es una proteína similar a la calmodulina (Hwang *et al.*, 2019).

Estudios *in vivo* determinaron la función de la subunidad EFCAB9 a nivel molecular, celular, bioquímico y electrofisiológico. La describieron como un sensor de Ca^{2+} dependiente del pH, en enlace directo con la subunidad ζ de CatSper. Ambas subunidades activan el canal CatSper en respuesta a cambios en el pH intracelular y el Ca^{2+} en los espermatozoides (Hwang *et al.*,

2019). La interacción que depende del Ca^{2+} entre EFCAB9 y CatSper ζ es necesaria para desarrollar una movilidad hiperactivada en los espermatozoides (Chung *et al.*, 2017; Hwang *et al.*, 2019). CatSper ζ en humanos y ratones contiene un motivo conservado esencial para la interacción con EFCAB9 (Hwang, Maziarz, Wagner & Chung, 2021).

La ausencia de EFCAB9, a pesar de la morfología y concentración de espermatozoides normales, tanto la tasa de fertilización como el tamaño de la camada en ratón fueron menores, lo que sugiere subfertilidad (Hwang *et al.*, 2019). Además, la ausencia del complejo EFCAB9 – CatSper ζ afecta la disposición, alineación y longitud de los nanodominios del canal CatSper en la membrana flagelar (Zhao *et al.*, 2021).

CatSper τ

Los estudios de Yang *et al.* (2021), identificaron la proteína C2CD6 (proteína 6 que contiene el dominio C2 dependiente del Ca^{2+}) como una nueva subunidad del canal CatSper, codificada por un gen específico de los testículos. Investigaciones posteriores mencionan que C2CD6 fue nombrada como CatSper tau (τ), (Hwang, Wang, Lu, Ikawa & Chung, 2022). CatSper τ se localiza en la pieza principal del espermatozoide del ratón y del humano. A diferencia de las otras subunidades, CatSper τ está en niveles bajos de proteína en ausencia de otra subunidad formadora del complejo CatSper (EFCAB9). Sin embargo, la ausencia de CatSper τ disminuye la entrada de Ca^{2+} en los espermatozoides, lo que afecta su movilidad y la fertilidad masculina. Un análisis de la movilidad de los espermatozoides en ratones KO CatSper τ determinó una disminución en la velocidad de natación (velocidad curvilínea y velocidad de trayectoria promedio) y la amplitud de la cabeza, lo que demuestra una pérdida de la hiperactivación de los espermatozoides (Hwang *et al.*, 2022).

La pérdida de CatSper τ afecta la orientación de los nanodominios de señalización del Ca^{2+} organizados en la membrana flagelar, ya que es responsable de regular la distribución lineal, cuadrilateral o continua de los complejos CatSper (Hwang *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2021). En las células germinales esta subunidad se dirige al complejo CatSper ensamblado en las espermátidas tempranas y a través de vesículas portadoras de canales se dirige al flagelo de las espermátidas tardías. Es decir, CatSper τ , regula la localización flagelar de CatSper y es indispensable para formar el complejo de canales a partir de los testículos (Hwang *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2021).

SLCO6C1 y TMEM249

SLCO6C1 es una proteína transportadora de aniones altamente expresada en el testículo. Fue identificada mediante microscopía crioelectrónica en espermatozoides de ratón (Lin *et al.*, 2021) y localizada en la pieza principal del flagelo mediante microscopía de fluorescencia e iluminación estructurada 3D (Zhao *et al.*, 2021). SLCO6C1 contiene un

dominio N, C y Kazal (característico de los inhibidores de la serina proteasa). Además, se identificó un sitio de glicosilación (conservado en ratón, rata y humano) que está asociado con una interacción hidrofóbica con la subunidad CatSper ϵ (Lin *et al.*, 2021).

Lin *et al.* (2021) identificaron a la proteína TMEM249 en la pieza principal del flagelo mediante microscopía electrónica. Huang *et al.* (2023), mediante inmunocitoquímica, confirmaron la presencia de TMEM249 o CatSper theta (CatSper θ) en la pieza principal del flagelo en espermatozoides epididimarios. CatSper θ es una subunidad con cuatro nanodominios lineales. Su papel se atribuye a participar como andamiaje para la subunidad CatSper4 (formadora de poros) y el ensamblaje del complejo CatSper (Huang *et al.*, 2023).

La ausencia de CatSper θ indica inactividad de CatSper pero no afecta la expresión de las otras subunidades del canal. Así mismo, la generación de ratón KO CatSper θ no presentó diferencias en el número y morfología de los espermatozoides epididimarios. Sin embargo, no hubo camada, debido a la incapacidad de los espermatozoides para fecundar los ovocitos.

Por lo tanto, la ausencia de CatSper θ afecta el desarrollo de la movilidad hiperactivada, causando infertilidad (Huang *et al.*, 2023).

Por otra parte, de acuerdo con la expresión de ARNm de los genes de CatSper, *Tmem249* se expresa en el testículo. Además, determinaron a través de estudios de cribado genómico que el gen *Tmem249* exhibe coevolución genómica con los genes de las subunidades Catsper1-4, Catsper β - δ y EFCAB9 (Huang *et al.*, 2023).

DISTRIBUCIÓN FILOGENÉTICA

En los estudios de genómica comparativa y filogenia utilizaron búsquedas BlastP, consistente en comparar la secuencia de aminoácidos contra secuencias almacenadas en estas bases de datos, y Tblastn para comparar una secuencia de proteína con una base de datos de nucleótidos (Cai & Clapham, 2008; Cai, Wang & Clapham, 2014); reportan que el canal CatSper se conserva evolutivamente en el genoma de varios organismos, en los que está amplia pero heterogéneamente distribuido en todos los linajes de eucariotas, desde mamíferos y reptiles hasta invertebrados como equinodermos, cnidarios

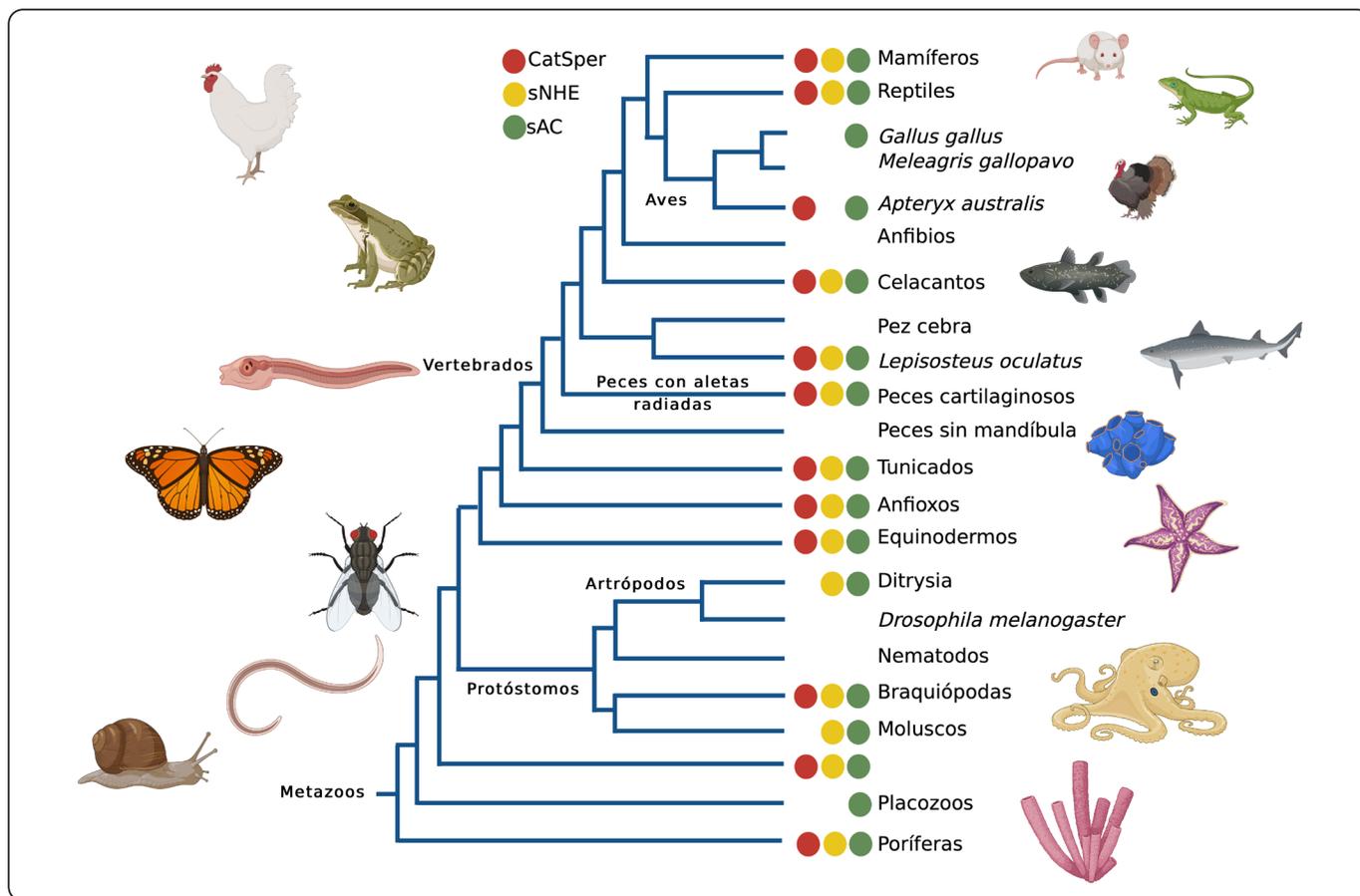


Figura 3. Distribución filogenética de CatSper, sNHE y sAC en mamíferos, reptiles, aves, peces, artrópodos y protóstomos. Cada círculo de color representa la presencia de la proteína: rojo-CatSper, amarillo-sNHE y verde-sAC. Modificado de: Romero & Nishigaki, 2019.

y ctenóforos (Figura 3). Sin embargo, los genes CatSper se pierden en los gusanos redondos, los insectos, los peces, los teleosteos, los anfibios y las aves (Figura 4), (Cai & Clapham, 2008; Cai, Wang & Clapham, 2014; Romero & Nishigaki, 2019). En estos estudios, para determinar qué especies conservan CatSper, consideraron que deben tener al menos las cuatro subunidades α formadoras de poros y utilizaron secuencias de proteínas de diferentes especies, para la consulta en las bases de datos genómicas como la del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), Genómica y Genoma de Ensembl (Romero & Nishigaki, 2019).

Cai & Clapham (2008) informan de un pseudogén *Catsper*. En otras palabras, el gen que codifica a CatSper ha sido inactivado durante la evolución debido a mutaciones en su secuencia, lo que ha provocado su pérdida en varias especies. La divergencia entre CatSper1-4 sugiere que las variantes evolutivas se han adquirido a través de restricciones funcionales alteradas después de la replicación ancestral.

La distribución filogenética de CatSper se ha correlacionado con otras proteínas involucradas en la movilidad espermática como: El intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE), proteína transmembranal encargada de regular el pH intracelular (pHi), (Wang, King, Quill, Doolittle & Garbers, 2003); el adenilato ciclasa soluble (ACs), es el responsable de la síntesis del monofosfato de la adenosina cíclico (AMPc) y la activación de la proteína quinasa A (PKA), (Xie *et al.*, 2006). Al reportar que las especies de metazoos que conservan CatSper también conservan sNHE y ACs, sugieren una coevolución entre las tres proteínas (Figura 3).

ACTIVACIÓN

Se ha informado que CatSper está moderado débilmente por el voltaje, la alcalinización intracelular, moléculas presentes en el tracto reproductivo femenino y las vías de señalización que incluyen cAMP/PKA (Kirichok, Navarro & Clapham, 2006; Lishko, Botchkina, Fedorenko & Kirichok, 2011; Orta, de la Vega, Martín-Hidalgo, Santi, Visconti & Darszon, 2018; Strünker *et al.*, 2011), e indirectamente por hormonas

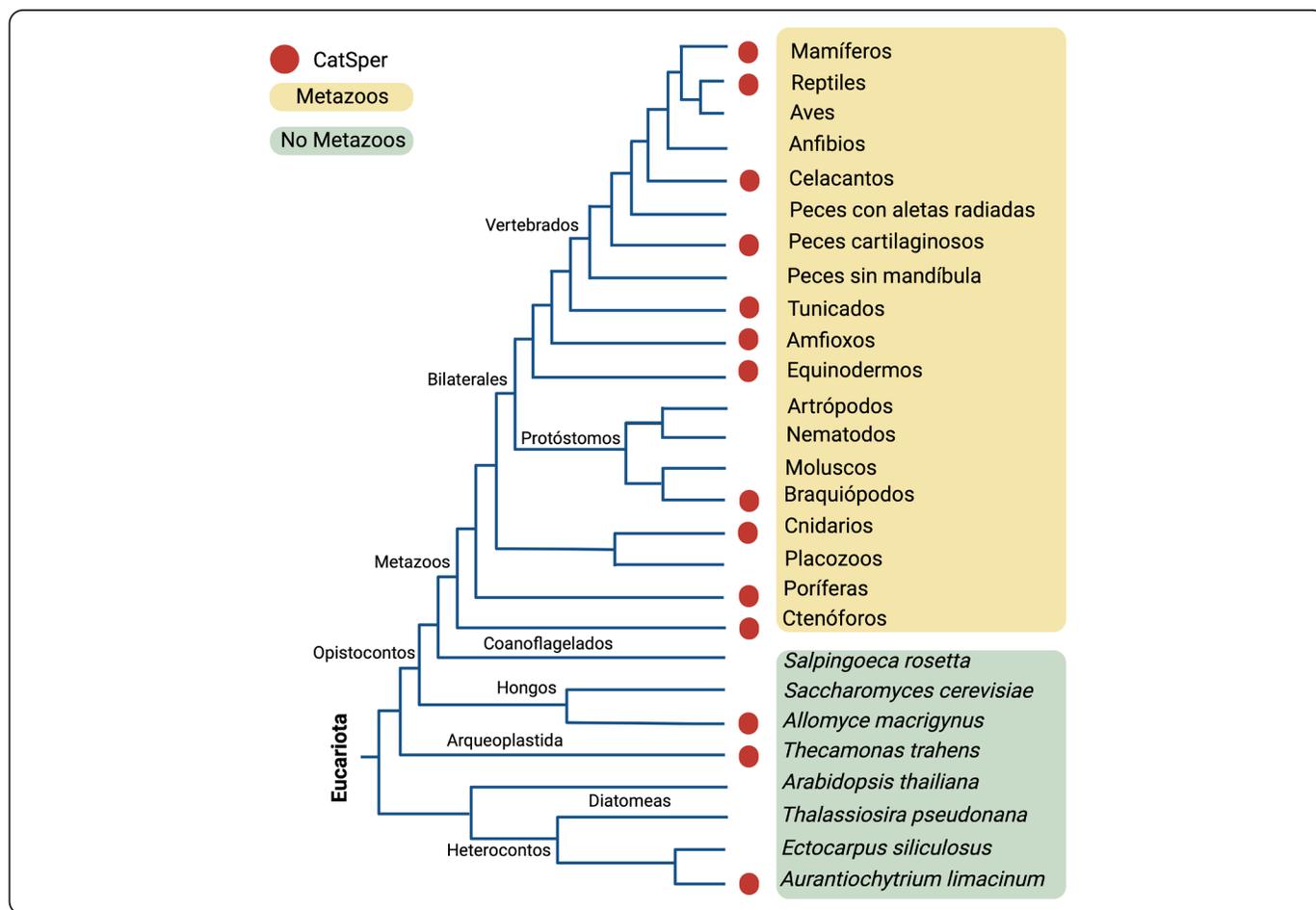


Figura 4. Distribución genética del canal CatSper entre los grupos taxonómicos de metazoos (amarillo) y de especies no metazoarias (verde). Modificado de: Romero & Nishigaki, 2019.

como la progesterona y las prostaglandinas. Además, hay informes que indican que CatSper sirve como un sensor polimodal para algunas sustancias químicas que ayudan a los espermatozoides durante su ruta a través del tracto femenino (Brenker *et al.*, 2012).

Voltaje

CatSper es un canal débil que depende del voltaje. Es decir, su sensibilidad al voltaje regula la actividad del canal, como lo demuestra la electrofisiología, donde la activación de la corriente de CatSper es débil en comparación con canales iónicos de Ca^{2+} (Ca_v) fuertemente sensibles al voltaje (Kirichok *et al.*, 2006).

Progesterona

Se ha descubierto que CatSper puede ser estimulado por las hormonas esteroides, la más estudiada es la progesterona (P_4) (Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011). Los espermatozoides depositados en el tracto reproductivo femenino están expuestos a P_4 , que es sintetizada y liberada por las células del cúmulo que rodean al ovocito (Brown *et al.*, 2017). Se ha demostrado que P_4 induce un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides de ratón (Romarowski *et al.*, 2016) y de humanos (Brown *et al.*, 2017), al desencadenar respuestas fisiológicas como la movilidad hiperactivada (Achikanu, Pendekanti, Teague & Publicover, 2018), quimiotaxis (Oren-Benaroya, Orvieto, Gakamsky, Pinchasov & Eisanbach, 2008) y RA (Romarowski *et al.*, 2016).

El aumento espacio-temporal de $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide promovido por P_4 ocurre desde el flagelo hasta la cabeza en cinco patrones diferentes: gradual, oscilatorio, transitorio tardío, transitorio inmediato y sostenido (Romarowski *et al.*, 2016).

Lishko *et al.* (2011), determinaron mediante patch-clamp que P_4 activa el canal CatSper en espermatozoides de humanos y observaron que la amplitud de la corriente monovalente del canal aumenta a concentraciones nanomolares de P_4 . A diferencia de los espermatozoides de ratón, la sensibilidad a P_4 es reducida, ya que sólo se activa a concentraciones de 50-100 μM (Lishko *et al.*, 2011; Romarowski *et al.*, 2016). Sin embargo, la concentración de P_4 necesaria para estimular la capacitación y/o RA varía según la especie, generalmente se encuentra en el rango micromolar (Gatica *et al.*, 2013). Recientemente, Mendoza-Sánchez *et al.* (2023) describieron que en los Chiroptera (murciélagos) las concentraciones nanomolares de P_4 activan CatSper, semejante a la respuesta de los espermatozoides de humanos.

Los investigadores mencionan que la señalización de las hormonas esteroides en las células somáticas depende de que los receptores nucleares desencadenen una respuesta genómica. Sin embargo, al no tener una actividad transcripcional, sugieren que los espermatozoides responden a P_4 por una vía no genómica a través de receptores en la membrana plasmática. También creen que la activación de CatSper sucede por la unión directa de P_4 al canal, o por la unión de P_4 a una hidrolasa de serina ABHD2 (dominio hidrolasa α/β , proteína 2; 425 aminoácidos) expresada en los espermatozoides. Se determinó la presencia de un endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol (2-AG) en la membrana plasmática del espermatozoide, que se sintetiza a partir del ácido araquidónico y glicerol por medio de la enzima diacilglicerol lipasa. El 2-AG tiene una función desconocida en los espermatozoides, en el tracto reproductor masculino y en el femenino. Sin embargo, se atribuye como inhibidor endógeno del canal CatSper; proponen que la unión de P_4 con ABHD2 es causa de la degradación por hidrólisis de 2-AG, lo que activa el

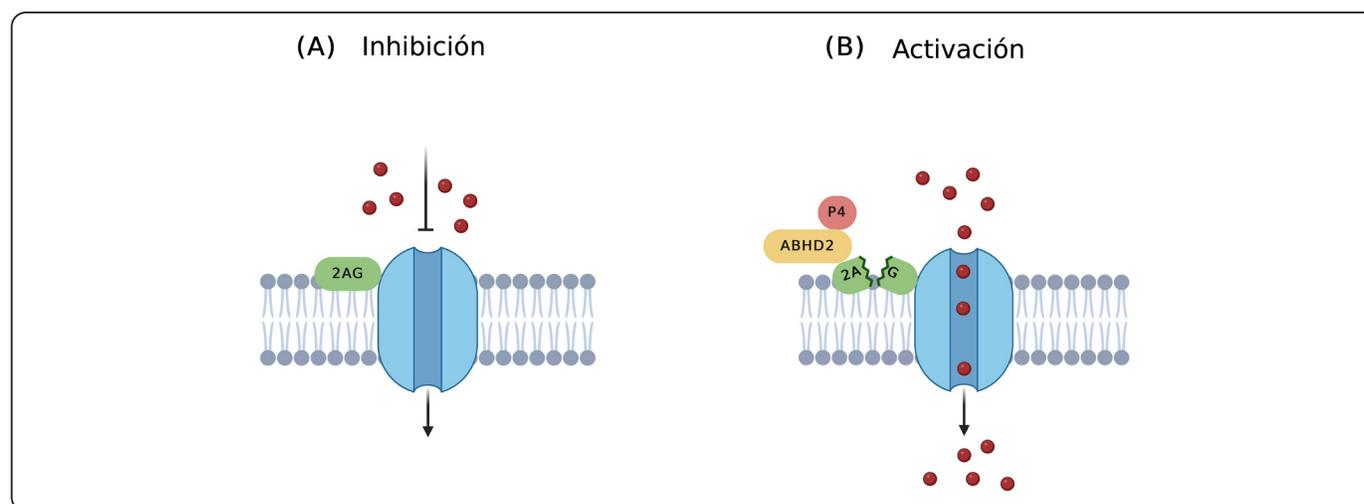


Figura 5. Estimulación del canal CatSper por progesterona. (A) Inhibición de CatSper por el endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol (2-AG). (B) Es posible que la activación del canal sea estimulada por la unión de P_4 a través de una proteína α/β hidrolasa del dominio serina, proteína 2 (ABHD2), lo que promueve la degradación de 2-AG producido en la membrana plasmática del espermatozoide, activa el canal y permite así la entrada de Ca^{2+} al interior del espermatozoide (Miller *et al.*, 2016).

canal y permite el flujo de Ca^{2+} hacia el espermatozoide (Figura 5), (Miller *et al.*, 2016).

Alcalinización

En los mamíferos, los espermatozoides almacenados en el epidídimo se encuentran en un medio intracelular y extracelular con un pH ácido, condición fisiológica que los mantiene en estado de quiescencia, pero en el tracto reproductivo femenino el pH se torna más alcalino hacia el oviducto (Liu, Wang & Chen, 2012). El aumento del pH en los espermatozoides es esencial para la hiperactivación y la RA (Achikanu *et al.*, 2018; Chávez *et al.*, 2017). Se ha reportado que el pH regula la movilidad y el influjo de Ca^{2+} al activar CatSper en espermatozoides de ratones y humanos (Kirichok *et al.*, 2006; Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011). El análisis electrofisiológico en espermatozoides indica que las corrientes de CatSper se potencian por la alcalinización intracelular al permitir la entrada de Ca^{2+} al citosol (Strünker *et al.*, 2011).

En los espermatozoides, el cloruro de amonio (NH_4Cl) se ha utilizado para alcalinizar el citosol, con esto se induce un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sin desencadenar la liberación de Ca^{2+} de los depósitos internos y la reacción acrosómica en los espermatozoides de ratón y en los humanos, por lo tanto, esta base débil se ha utilizado durante el estudio del flujo de Ca^{2+} durante la capacitación espermática (Chávez *et al.*, 2017; Orta *et al.*, 2018). El mecanismo de activación de CatSper por alcalinización se debe a que el extremo amino terminal de la subunidad α -CatSper1 es rico en histidina, que tiene un papel importante en la detección de pH (Kirichok *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2001). Además, la actividad de CatSper está asociada a diferentes canales iónicos que participan en la regulación de pH, incluyendo el canal de protones Hv1 (Lishko *et al.*, 2010).

AMPC/PKA

Entre los cambios que ocurren durante la capacitación espermática se encuentra un aumento en la concentración intracelular de bicarbonato (HCO_3^-), (Puga Molina, Luque, Balestrini, Marín-Briggiler, Romarowski & Buffone, 2018). El HCO_3^- estimula el adenilato ciclasa atípica (Adcy10), que aumenta los niveles de la adenosina monofosfato cíclico (AMPC) y que activa la PKA (Brenker *et al.*, 2012). Sin embargo, existe controversia sobre si CatSper está regulada por la vía de señalización que incluye el aumento de AMPC y la activación de PKA. Orta *et al.* (2018) demostraron mediante el uso de activadores de PKA como 8-Br-AMPC (análogo de AMPC), inhibidores como PKI y H89, y HCO_3^- , que la respuesta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependiente de CatSper está regulada por la actividad de PKA. Es decir, la elevación de AMPC intracelular facilita la entrada de Ca^{2+} vía CatSper a través de la fosforilación dependiente de PKA. Además, se observó en registros electrofisiológicos que la adición de AMPC en

los espermatozoides de ratón activa claramente la corriente CatSper y es inhibida por PKI y H89. Por lo tanto, se sugiere que la actividad de CatSper está regulada por la activación de la vía AMPC/PKA (Orta *et al.*, 2018).

Sin embargo, Wang *et al.* (2020), demostraron mediante registros electrofisiológicos que en humanos el canal CatSper no es activado por AMPC directa o indirectamente a través de la vía AMPC/PKA. Sin embargo, concentraciones no fisiológicas de AMPC y análogos de este nucleótido cíclico (8-Br-cAMP), activan a CatSper desde el exterior a través de un sitio de unión desconocido diferente al de los esteroides. También se demostró que la respuesta de entrada de Ca^{2+} que causa HCO_3^- es causada por la alcalinización intracelular descontrolada de los tampones con HCO_3^- (que activa a CatSper), y no por su relación con la vía AMPC/PKA como se consideró previamente (Wang *et al.*, 2020). Además, se demostró que los inhibidores de PKA se basan en la interacción directa con CatSper y no en la inhibición de PKA, ya que se encontró que la respuesta provocada por estos fármacos se eliminaba en ausencia de CatSper (Wang *et al.*, 2020).

INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA

Durante el estudio de la función de CatSper, se han utilizado varios fármacos que suprimen su actividad, como es el caso del NNC55-0396, que inhibe su corriente eléctrica activada por P_4 en los espermatozoides de ratón (Lishko *et al.*, 2011) y la señal de Ca^{2+} inducida por alcalinización utilizando NH_4Cl en espermatozoides de humanos (Strünker *et al.*, 2011). Aunque el NNC55-0396 fue descrito como un inhibidor de los canales de Ca^{2+} de tipo T, su afinidad por CatSper es al menos diez veces mayor a la de los canales tipo T (Huang *et al.*, 2004; Lishko *et al.*, 2011). Por otro lado, se han probado varios inhibidores del canal Ca_v que suprimen la respuesta de Ca^{2+} , como la Nifedipina, el Verapamilo, el Diltiazem, el Níquel y el Mibefradil. Sin embargo, sólo el Mibefradil inhibe significativamente la respuesta de Ca^{2+} (Strünker *et al.*, 2011), así como MDL12330A suprime la respuesta estimulada por la alcalinización y P_4 en el espermatozoide de humanos (Brenker *et al.*, 2012).

En el año 2018, se informó que el compuesto RU1968 suprimía la señalización de Ca^{2+} al inhibir CatSper en los espermatozoides humanos, en los de ratón y en los de erizo de mar mediante un mecanismo no descrito. El compuesto no muestra efectos tóxicos en los espermatozoides, ni afecta la actividad de otros canales como SLO3 en espermatozoides de ratón y de humanos (Rennhack *et al.*, 2018). Además, en los espermatozoides humanos, RU1968 suprimió la respuesta de movilidad provocada por P_4 y abolió la de quimiotaxis mediada por CatSper en los espermatozoides de erizo de mar (Rennhack *et al.*, 2018; Torrezan-Nitao, Brown, Mata-Martínez, Treviño, Barratt & Publicover, 2021).

CONCLUSIONES

El canal CatSper regula la entrada de Ca^{2+} en los espermatozoides necesaria para la movilidad hiperactivada. Este canal es un complejo formado por al menos 10 subunidades. Se ha demostrado que la ausencia de alguna de las subunidades afecta la actividad del canal de forma parcial o total, perjudicando la fertilidad masculina. Además, el análisis bioinformático sugiere una distribución heterogénea del canal y sus subunidades entre los grupos taxonómicos. También, diversos estudios muestran que la actividad de CatSper está regulada por diversos mecanismos que han dilucidado la función y/o participación del canal en los diferentes procesos fisiológicos de los espermatozoides.

En el futuro, investigaciones comparativas de CatSper en diversas especies de mamíferos y otros taxones contribuirán a esclarecer los mecanismos de activación y regulación de este canal, al proporcionar información valiosa sobre su evolución y diversidad funcional. Estos avances también ofrecen oportunidades para desarrollar anticonceptivos masculinos no hormonales, específicos y seguros, basados en la modulación del canal lo que representaría un hito en la salud reproductiva masculina.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la contribución de los autores J.E.M.-S., J.C.C., A.R.-T. y E.A.-R en la escritura del manuscrito. Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA) (Número de subvención IN218123to J.C.C.), División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa [CD.CBS.481.2021] a (E.A.-R.) y Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) (UAM-PTC- 675 a A.R.-T). J.E.M.-S. fue apoyado por una beca del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) (número de registro CVU 925549).

DECLARACIONES Y AFIRMACIONES

Conflictos de intereses, los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Achikanu, C., Pendekanti, V., Teague, R. & Publicover, S. (2018). Effects of pH manipulation, CatSper stimulation and Ca^{2+} -store mobilization on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and behaviour of human sperm. *Human Reproduction*, **33**(10), 1802–1811. DOI: 10.1093/humrep/dey280.

Austin, C. R. (1952). The 'capacitation' of the mammalian sperm. *Nature*, **170**(4321), 326. DOI: 10.1038/170326a0.

Babcock, D. F. (2007). Wrath of the wraiths of CatSper3 and CatSper4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(4), 1107–1108. DOI: 10.1073/pnas.0610909104

Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N. D., Naruse, M., Krähling, M., Müller, A., Kaupp, U. B. & Strünker, T. (2012). The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *The EMBO Journal*, **31**(7), 1654–1665. DOI: 10.1038/emboj.2012.30.

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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signalling in human spermatozoa induced by follicular fluid. *Human Reproduction*, **32**(10), 1995–2006. DOI: 10.1093/humrep/dex269

Brown, S. G., Miller, M. R., Lishko, P. V., Lester, D. H., Publicover, S. J., Barratt, C. L. R. & Martins Da Silva, S. (2018). Homozygous in-frame deletion in CATSPERE in a man producing spermatozoa with loss of CatSper function and compromised fertilizing capacity. *Human Reproduction*, **33**(10), 1812–1816. DOI: 10.1093/humrep/dey278.

Buffone, M. G. (2016). Sperm acrosome biogenesis and function during fertilization. Edition 1. Buenos Aires, Argentina. Springer Cham

Cai, X. & Clapham, D. E. (2008). Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSper and CatSper β . *PloS One*, **3**(10), e3569. DOI: 10.1371/journal.pone.0003569

Cai, X., Wang, X. & Clapham, D. E. (2014). Early evolution of the eukaryotic Ca^{2+} signaling machinery: conservation of the CatSper channel complex. *Molecular Biology and Evolution*, **31**(10), 2735–2740. DOI: 10.1093/molbev/msu218.

Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, **168**(4277), 697–698. DOI: 10.1038/168697b0.

Chávez, J. C., la Vega-Beltrán, D., José, L., José, O., Torres, P., Nishigaki, T., Treviño, C. L. & Darszon, A. (2017). Acrosomal alkalization triggers Ca^{2+} release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology*, **233**(6), 4735–4747. DOI: 10.1002/jcp.26262.

Chung, J.-J., Miki, K., Kim, D., Shim, S.-H., Shi, H. F., Hwang, J. Y., Cai, X., Iseri, Y., Zhuang, X. & Clapham, D. E. (2017). CatSper ζ regulates the structural continuity of sperm Ca^{2+} signaling domains and is required for normal fertility. *Life*, **6**, e23082. DOI: 10.7554/eLife.23082

Chung, J.-J., Navarro, B., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. (2011). A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nature Communications*, **2**(1), 1–12. DOI: 10.1038/ncomms1153

Costello, S., Michelangeli, F., Nash, K., Lefievre, L., Morris, J., Machado-Oliveira, G., Barratt, C., Kirkman-Brown, J. & Publicover, S. (2009). Ca^{2+} -stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction* (Cambridge, England), **138**(3), 425. DOI: 10.1530/REP-09-0134.

Darszon, A., Nishigaki, T., Beltrán, C. & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and

- function of spermatozoa. *Physiol. Rev.*, **91**(4), 1305–1355. DOI: 10.1152/physrev.00028.2010.
- Gatica, L. V., Guidobaldi, H. A., Montesinos, M. del M., Teves, M. E., Moreno, A. I., Uñates, D. R., Molina, R. I. & Giojalas, L. C. (2013). Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, **19**(9), 559–569. DOI: 10.1093/molehr/gat037.
- Gervasi, M. G. & Visconti, P. E. (2016). Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Molecular Reproduction and Development*, **83**(10), 860–874. DOI: 10.1002/mrd.22663.
- Gervasi, M. G. & Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, **5**(2), 204–218. DOI: 10.1111/andr.12320.
- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*, **96**(1), 1–17. DOI: 10.1152/physrev.00013.2015.
- Griswold, M. D. & Hogarth, C. (2018). Beyond stem cells: Commitment of progenitor cells to meiosis. *Stem Cell Research*, **27**, 169–171. DOI:10.1016/j.scr.2018.01.032
- Hirohashi, N., Gerton, G. L. & Buffone, M. G. (2011). Video imaging of the sperm acrosome reaction during *in vitro* fertilization. *Communicative and Integrative Biology*, **4**(4), 471–476. DOI: 10.4161/cib.4.4.15636
- Holt, J. E., Stanger, S. J., Nixon, B. & McLaughlin, E. A. (2016). Non-coding RNA in spermatogenesis and epididymal maturation. *Non-Coding RNA and the Reproductive System*, 95–120. DOI: 10.1007/978-94-017-7417-8_6.
- Huang, L., Keyser, B. M., Tagmose, T. M., Hansen, J. B., Taylor, J. T., Zhuang, H., Zhang, M., Ragsdale, D. S. & Li, M. (2004). NNC 55-0396 [(1S, 2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl) propyl]-N-methylamino) ethyl)-6-fluoro-1, 2, 3, 4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **309**(1), 193–199. DOI: 10.1124/jpet.103.060814.
- Huang, X., Miyata, H., Wang, H., Mori, G., Iida-Norita, R., Ikawa, M., Percudani, R. & Chung, J.-J. (2023). A CUG-initiated CATSPER θ functions in the CatSper channel assembly and serves as a checkpoint for flagellar trafficking. *BioRxiv*, **120**(39), 2003–2023. DOI: 10.1101/2023.03.17.532952
- Hwang, J. Y., Mannowetz, N., Zhang, Y., Everley, R. A., Gygi, S. P., Bewersdorf, J., Lishko, P. V. & Chung, J.-J. (2019). Dual sensing of physiologic pH and calcium by EFCAB9 regulates sperm motility. *Cell*, **177**(6), 1480–1494. DOI: 10.1016/j.cell.2019.03.047
- Hwang, J. Y., Maziarz, J., Wagner, G. P. & Chung, J.-J. (2021). Molecular Evolution of CatSper in Mammals and Function of Sperm Hyperactivation in Gray Short-Tailed Opossum. *Cells*, **10**(5), 1047. DOI: 10.3390/cells10051047.
- Hwang, J. Y., Wang, H., Lu, Y., Ikawa, M. & Chung, J.-J. (2022). C2cd6-encoded CatSper τ targets sperm calcium channel to Ca²⁺ signaling domains in the flagellar membrane. *Cell Reports*, **38**(3), 110226. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.110226.
- Jin, J.-L., O'Doherty, A. M., Wang, S., Zheng, H., Sanders, K. M. & Yan, W. (2005). Catsper3 and catsper4 encode two cation channel-like proteins exclusively expressed in the testis. *Biology of Reproduction*, **73**(6), 1235–1242. DOI: 10.1095/biolreprod.105.045468.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K. & Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during *in vitro* fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(12), 4892–4896. DOI: 10.1073/pnas.1018202108.
- Jin, S.-K. & Yang, W.-X. (2017). Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget*, **8**(2), 3600. DOI: 10.18632/oncotarget.12274.
- Kirichok, Y., Navarro, B. & Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature*, **439**(7077), 737–740. DOI: 10.1038/nature04417.
- Lin, S., Ke, M., Zhang, Y., Yan, Z. & Wu, J. (2021). Structure of a mammalian sperm cation channel complex. *Nature*, **595**(7869), 746–750. DOI: 10.1038/s41586-021-03742-6.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., Fedorenko, A. & Kirichok, Y. (2010). Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*, **140**(3), 327–337. DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.053.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L. & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, **471**(7338), 387–391. DOI: 10.1038/nature09767.
- Liu, J., Xia, J., Cho, K.-H., Clapham, D. E. & Ren, D. (2007). CatSper β , a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *Journal of Biological Chemistry*, **282**(26), 18945–18952. DOI: 10.1074/jbc.M701083200.
- Liu, Y., Wang, D.-K. & Chen, L.-M. (2012). The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction. *Biology of Reproduction*, **86**(4), 91–99. DOI: 10.1095/biolreprod.111.096826.
- Lobley, A., Pierron, V., Reynolds, L., Allen, L. & Michalovich, D. (2003). Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **1**(1), 1–15. DOI: 10.1186/1477-7827-1-53
- Mendoza-Sánchez, J. E., Rodríguez-Tobón, A., Arenas-Ríos, E., Orta-Salazar, G. J., León-Galván, M. A., Treviño Santa Cruz, C. L. & Chávez, J. C. (2023). Sperm calcium flux and membrane potential hyperpolarization observed in the Mexican big-eared bat *Corynorhinus mexicanus*. *Journal of Experimental Biology*, **226**(2). DOI: 10.1242/jeb.244878
- Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., Hill, R. Z., Bautista, D.

- M., Kirichok, Y. & Lishko, P. V. (2016). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science*, **352**(6285), 555–559. DOI: 10.1126/science.aad6887.
- Navarro, B., Kirichok, Y., Chung, J.-J. & Clapham, D. E. (2008). Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *The International Journal of Developmental Biology*, **52**, 607. DOI: 10.1387/ijdb.072554bn.
- Ni, F.-D., Hao, S.-L. & Yang, W.-X. (2019). Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis. *Cell Death and Disease*, **10**(8), 1–15. DOI: 10.1038/s41419-019-1782-z.
- Okabe, M. (2016). The acrosome reaction: a historical perspective. In *Sperm acrosome biogenesis and function during fertilization* (pp. 1–13). Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-30567-7_1.
- Oren-Benaroya, R., Orvieto, R., Gakamsky, A., Pinchasov, M. & Eisenbach, M. (2008). The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Human Reproduction*, **23**(10), 2339–2345. DOI: 10.1093/humrep/den265.
- 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. DOI: 10.1074/jbc.RA117.001566.
- Pereira, R., Sá, R., Barros, A. & Sousa, M. (2017). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian Journal of Andrology*, **19**(1), 5. DOI: 10.4103/1008-682X.167716
- Puga Molina, L. C., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A. & Buffone, M. G. (2018). Molecular basis of human sperm capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **6**, 72. DOI: 10.3389/fcell.2018.00072
- 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. DOI: 10.1073/pnas.0610286104.
- Quill, T. A., Ren, D., Clapham, D. E. & Garbers, D. L. (2001). A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(22), 12527–12531. DOI: 10.1073/pnas.221454998.
- 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. DOI: 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. DOI: 10.1016/j.mce.2020.110951.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L. & Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, **413**(6856), 603–609. DOI: 10.1038/35098027.
- Rennhack, A., Schiffer, C., Brenker, C., Fridman, D., Nitao, E. T., Cheng, Y., Tamburrino, L., Balbach, M., Stölting, G. & Berger, T. K. (2018). A novel cross-species inhibitor to study the function of CatSper Ca²⁺ channels in sperm. *British Journal of Pharmacology*, **175**(15), 3144–3161. DOI: 10.1111/bph.14355.
- 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), 61–63. DOI: 10.1095/biolreprod.115.136085
- Romero, F. & Nishigaki, T. (2019). Comparative genomic analysis suggests that the sperm-specific sodium/proton exchanger and soluble adenylyl cyclase are key regulators of CatSper among the Metazoa. *Zoological Letters*, **5**(1), 25. DOI: 10.1186/s40851-019-0141-3.
- Schultz, N., Hamra, F. K. & Garbers, D. L. (2003). A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(21), 12201–12206. DOI: 10.1073/pnas.1635054100.
- Singh, A. P. & Rajender, S. (2015). CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reproductive Biomedicine Online*, **30**(1), 28–38. DOI: 10.1016/j.rbmo.2014.09.014.
- Stival, C., Molina, L. del C. P., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E. & Krapf, D. (2016). Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. In *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization* (pp. 93–106). Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-30567-7_5.
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R. & Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature*, **471**(7338), 382–386. DOI: 10.1038/nature09769.
- Suarez, S. S. & Ho, H. C. (2003). Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, **38**(2), 119–124. DOI: 10.1046/j.1439-0531.2003.00397.x.
- Torrezan-Nitao, E., Brown, S. G., Mata-Martínez, E., Treviño, C. L., Barratt, C. & Publicover, S. (2021). [Ca²⁺]_i oscillations in human sperm are triggered in the flagellum by membrane potential-sensitive activity of CatSper. *Human Reproduction*, **36**(2), 293–304. DOI: 10.1093/humrep/deaa302.
- 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 y fertility. *Nature Cell Biology*,

- 5(12)**, 1117–1122. DOI: 10.1038/ncb1072.
- Wang, H., Liu, J., Cho, K.-H. & Ren, D. (2009). A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biology of Reproduction*, **81(3)**, 539–544. DOI: 10.1095/biolreprod.109.077107
- Wang, T., Young, S., Krenz, H., Tüttelmann, F., Röpke, A., Krallmann, C., Kliesch, S., Zeng, X.-H., Brenker, C. & Strünker, T. (2020). The Ca²⁺ channel CatSper is not activated by cAMP/PKA signaling but directly affected by chemicals used to probe the action of cAMP and PKA. *Journal of Biological Chemistry*, **295(38)**, 13181–13193. DOI: 10.1074/jbc.RA120.013218
- Xie, F., Garcia, M. A., Carlson, A. E., Schuh, S. M., Babcock, D. F., Jaiswal, B. S., Gossen, J. A., Esposito, G., van Duin, M. & Conti, M. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Developmental Biology*, **296(2)**, 353–362. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.05.038.
- Yang, F., Gervasi, M. G., Leu, N. A., Orta, G., Tourzani, D. A., de la Vega-Beltrán, D., Luis, J., Ruthel, G., Darszon, A. & Visconti, P. E. (2021). C2CD6 regulates targeting and organization of the CatSper calcium channel complex in sperm flagella. *Development*, **149(2)**, dev199988. DOI: 10.1242/dev.199988.
- Zhao, Y., Wang, H., Wieshoefer, C., Shah, N. B., Reetz, E., Hwang, J. Y., Huang, X., Lishko, P. V., Davies, K. M. & Wennemuth, G. (2021). 3D structure and *in situ* arrangements of CatSper channel in the sperm flagellum. *Nature Communications*, **13(1)**, 3439. DOI: 10.1093/humrep/dey280.