

Participación de los canales de Ca^{2+} en la capacitación espermática

José E. Mendoza-Sánchez¹, Edith Arenas-Ríos², Julio C. Chávez-Zamora⁴,
Miguel A. León-Galván³ y Ahiezer Rodríguez-Tobón³

Maestría en Biología de la Reproducción Animal¹, Departamento de Biología de la Reproducción²,
Departamento de Biología³, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular⁴
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa^{1,2,3}, Universidad Nacional Autónoma de México⁴
Ciudad de México, CDMX^{1,2,3}; Cuernavaca, Morelos⁴; México
jesmendoza57@gmail.com, julio.chavez@mail.ibt.unam.mx, leon@xaum.uam.mx,
[editharenas2000 y ahizzerrod]@yahoo.com.mx

Abstract—During sperm capacitation in the female reproductive tract, sperm undergo a series of physiological and biochemical changes, where a change in ionic flow is described that modulates intracellular pH, intracellular calcium, and membrane potential, regulating the physiology of sperm. Changes in intracellular calcium concentrations are regulated by the activity of ion channels that form a pore in the plasma membrane through which ions pass, causing changes in the flagellar motility of spermatozoa. This review aims to examine the involvement of the main calcium channels in sperm during sperm capacitation, an essential study to understand how sperm acquires fertilizing potential.

Keyword—Sperm, Ion channels, Calcium, Sperm capacitation.

Resumen— Durante la capacitación espermática en el tracto reproductor femenino, los espermatozoides experimentan una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos, en donde se describe, un cambio en el flujo iónico que modula el pH intracelular, calcio intracelular y potencial de la membrana, regulando la fisiología de los espermatozoides. Los cambios en las concentraciones intracelulares de calcio son regulados por la actividad de canales iónicos que forman un poro en la membrana plasmática a través del cual atraviesan los iones, ocasionando cambios en la movilidad flagelar de los espermatozoides. Esta revisión tiene como objetivo examinar la participación de los principales canales de calcio en los espermatozoides durante la capacitación espermática, un estudio esencial para comprender cómo el espermatozoide adquiere el potencial fertilizante.

Palabras claves—Espermatozoide, Canales iónicos, Calcio, Capacitación espermática.

I. INTRODUCCIÓN

A diferencia de peces y anfibios, donde los espermatozoides son capaces de fertilizar inmediatamente después de ser eyaculados, en los mamíferos, no sucede de esta manera [1-3], pues adquieren esta capacidad después de completar su maduración en el epidídimo y durante el tránsito a través del tracto reproductor femenino, experimentando cambios bioquímicos y fisiológicos, descritos como capacitación espermática [4].

El proceso de capacitación fue descrito por Min Chueh Chang y Colin Russell Austin en espermatozoides de conejo y rata, como los cambios, que ocurren en el tracto genital femenino, necesarios en el gameto masculino para fecundar un ovocito [1]. Entre estos cambios se presenta la remoción de colesterol de la membrana plasmática por albúmina, presente en el tracto reproductor femenino, aumentando la fluidez de la membrana [5-6]. Hay un aumento del potencial de hidrógeno intracelular (pH_i), mediado por el intercambio iónico. El intercambio de iones es regulado por canales iónicos que modulan el potencial de membrana (E_m), resultado del gradiente electroquímico existente entre el medio intra y extracelular del espermatozoide. Durante la capacitación, la permeabilidad de ciertos iones cambia, dando como resultado una hiperpolarización de la membrana plasmática en ciertas especies [7].

También ocurre un incremento en el ingreso de bicarbonato (HCO_3^-) y calcio (Ca^{2+}) al citoplasma asociado a la activación de canales e intercambiadores iónicos [5, 8–10]. El aumento de la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y HCO_3^- estimulan la enzima Adenilato Ciclasa soluble (ACs) responsable de la síntesis de AMPc, activando la vía de señalización de la proteína cinasa A1 (PKA1). La PKA1 por su parte, fosforila algunas proteínas en los residuos de serina, desencadenando adicionalmente la fosforilación en residuos de tirosinas [4-5]. En conjunto, esta serie de cambios en las concentraciones de iones y activación de cascadas de señalización en el interior del espermatozoide, son caracterizados por la hiperactivación de los gametos (patrón asimétrico de movilidad en los espermatozoides), proceso requerido para liberar a los espermatozoides unidos al epitelio oviductal [4-5, 11].

La reacción del acrosoma es un evento exocitótico, dependiente de Ca^{2+} , desencadenado por la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida del ovocito, en el cual la membrana externa del acrosoma se fusiona en múltiples puntos con la membrana plasmática, liberando las moléculas presentes en la membrana acrosómica interna [11-12].

Se ha demostrado que el transporte de iones mediado por canales iónicos ubicados en la membrana plasmática del espermatozoide regula la movilidad del espermatozoide (principalmente por Ca^{2+}) durante la capacitación [5, 7]. En esta revisión se busca, analizar la estructura y función de los canales iónicos de Ca^{2+} , necesarios para que el espermatozoide sea capaz de adquirir el potencial fertilizante.

II. TRANSPORTE IÓNICO EN EL ESPERMATOZOIDE

El flujo iónico a través de la membrana plasmática es regulado por canales y transportadores iónicos (proteínas transmembranales) [13-14]. En las células, los iones fluyen por transporte pasivo, es decir, a favor de un gradiente electroquímico (combinación del gradiente de concentración con el potencial eléctrico). Sin embargo, existe un sistema de transporte activo que requiere de energía metabólica (Adenosín trifosfato: ATP) para el transporte de iones. El transporte activo permite el movimiento de solutos contra un gradiente de concentración (de baja a alta concentración). Existen dos tipos de transporte activo: transporte directo (gasto de ATP) y transporte indirecto o cotransporte que implica el flujo de dos moléculas distintas (simporte, en la misma dirección; antiporte, en direcciones opuestas) [13].

Por otra parte, el transporte pasivo comprende el movimiento de moléculas a lo largo del gradiente de concentración (de una mayor a menor concentración); por lo tanto, no requiere energía. Dentro de los tipos de transporte pasivo, la difusión facilitada permite el flujo de moléculas a través de proteínas transportadoras y canales [13].

Los canales iónicos poseen un poro hidrofílico que permite el flujo de iones (Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+}) a favor de gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática, poseen una alta selectividad y eficiencia en el paso de los iones [14]. Bajo estimulación, cambian su conformación para permitir su activación (apertura y cierre) [13-14]. Dependiendo del tipo de canal iónico pueden activarse en respuesta a: cambios de voltaje o potencial de membrana, alcalinización, unión de ligandos (hormonas, neurotransmisores y iones) y fuerzas mecánicas [13].

En el espermatozoide, la función de los canales iónicos se asocia a la capacitación y reacción acrosomal [15]. Sin embargo, los espermatozoides son considerados transcripcionalmente silenciosos, esto significa que, los canales iónicos que encontramos en los gametos masculinos se sintetizan desde células espermatogénicas, durante la espermatogénesis [16]. Además, durante el tránsito por el epidídimo, los espermatozoides experimentan cambios en su contenido de proteínas, las cuales son sintetizadas por el epitelio epididimario e incorporadas a los espermatozoides. Se incluyen proteínas de membrana como canales iónicos y de reconocimiento con el ovocito [17].

A medida que los espermatozoides transitan por el epidídimo y el tracto reproductor femenino, se encontrarán con diferentes concentraciones iónicas en el medio extracelular que afectará las concentraciones iónicas al interior de esta célula, favorecido por la permeabilidad de la membrana plasmática a iones Ca^{2+} , HCO_3^- , Na^+ y K^+ , principalmente [5, 11]. Es decir, la concentración externa de K^+ puede cambiar de 39 a 5–8 mM, la de Cl^- de 27 a 130 mM y la concentración externa de Na^+ de 38 a 140 mM en la cauda del epidídimo y oviducto, respectivamente [18]. El flujo de iones durante la capacitación espermática modula el pH_i , el potencial de membrana (E_m) y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de importancia para la fertilización de los espermatozoides [19]. En consecuencia, los canales iónicos de Ca^{2+} son elementos críticos en los espermatozoides en la señalización celular, movilidad, capacitación y reacción del acrosoma [16].

III. CANALES IÓNICOS DE CALCIO EN EL ESPERMATOZOIDE

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es importante para la actividad de los espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino, además de ser importante para la supervivencia y fertilidad de estas células [19]. El Ca^{2+} es un ion y segundo mensajero de importancia en el espermatozoide para la activación de la vía de señalización de PKA, la movilidad (al regular el deslizamiento de los microtúbulos del flagelo impulsados por dineína), la hiperactivación y la reacción del acrosoma [4, 20]. A bajas $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el flagelo bate simétricamente, cuando los niveles aumentan se presentan cambios en el patrón de movilidad del espermatozoide, el cual varía entre especies (fuerte latido flagelar asimétrico de alta amplitud y frecuencia baja), hiperactivando al espermatozoide, con el objetivo de penetrar las células de la granulosa y zona pelúcida que rodean al ovocito [21].

Existen dos maneras por las cuales la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ incrementa: 1) a través de canales y transportadores iónicos en la membrana plasmática que importan y exportan iones Ca^{2+} , respectivamente, regulando su concentración intracelular y 2) por las pozas internas (orgánulos que pueden almacenar y liberar Ca^{2+} al citoplasma, como el acrosoma y retículo endoplasmático) [4].

Las pozas internas liberan el Ca^{2+} a través de canales intracelulares como el receptor a inositol-3-fosfato (IP3R) y receptores de rianodina (RyR), ubicados en el retículo endoplasmático [16]. Por otro lado, los principales tipos de canales de Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática de los espermatozoides incluyen canales volumétricos (Cav), canales específicos de espermatozoides (CatSper), canales controlados por nucleótidos cíclicos (CNG), la ATPasa Ca^{2+} (PMCA4) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) [4, 16].

A. Intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (NCX)

El NCX es un transportador bidireccional de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (3:1), está presente en la membrana plasmática de los espermatozoides de mamíferos, específicamente en el acrosoma y la pieza media. Este intercambiador es de gran importancia para la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} , y su función principal es bombear Ca^{2+} a través de la membrana, utilizando el gradiente de concentración de Na^+ [22].

La estructura del NCX presenta 9 segmentos transmembrana (STM) y un asa intracelular, y el primer segmento extracelular está glicosilado. También contiene dos regiones de homología intramolecular implicados en el transporte de iones y un sitio de unión a Ca^{2+} (Fig 1) [23].

Tal y como demostró Krasznai [22], la inhibición farmacológica (con bepridil) de NCX provoca un aumento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y una reducción significativa de la movilidad de los espermatozoides humanos.

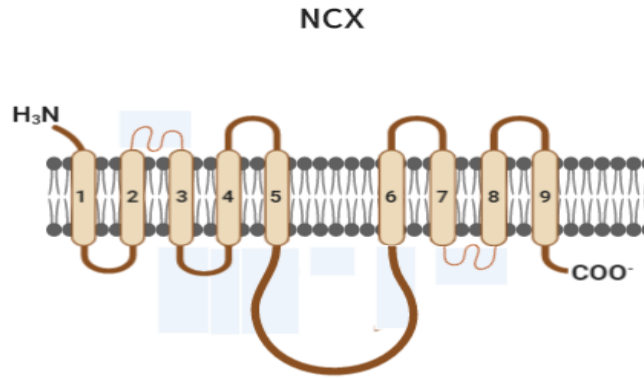


Fig 1. Estructura del transportador de Na⁺/Ca²⁺ (NCX). Presenta 9 segmentos transmembrana (1-9) y un asa intracelular. Modificado de: Philipson *et al.*, 2002.

B. Bomba de Ca²⁺ de la membrana plasmática (PMCA)

La PMCA es una enzima de 120-140 kDa, miembro de las bombas de eflujo de Ca²⁺ tipo P, responsable de mantener un gradiente de Ca²⁺ a través de la membrana de los espermatozoides, regulando la homeostasis de este ion [24]. En los mamíferos, se expresa una familia de cuatro isoformas distintas, PMCA1-PMCA4 (generadas por el corte y empalme de exones), cada una codificada por un gen diferente [25]. PMCA1 y 4 se expresan de forma ubicua, PMCA2 y 3 están restringidos a un número limitado de tejidos [26]. Sin embargo, PMCA4 es la isoforma principal en el espermatozoide. Se expresa específicamente en la pieza principal del flagelo y es requerida para la movilidad hiperactivada desencadenada en la capacitación espermática, necesaria para atravesar el tracto reproductor femenino [25].

La PMCA está compuesta por una única cadena peptídica de 10 hélices transmembrana. Se reconocen 3 dominios principales; N (al cual se une el ATP), P (sitio de autofosforilación) y COO-terminal (sitio de unión a calmodulina) (Fig 2) [27]. PMCA experimenta cambios conformacionales durante la unión de ATP formando un acilfosfato, el cual permite el paso de Ca²⁺ contra gradiente iónico [27].

En ratones, la ausencia de PMCA4, incrementa los niveles de Ca²⁺ conduciendo a la pérdida de la movilidad progresiva e hiperactivación de los espermatozoides, lo que resulta en infertilidad [25, 28].

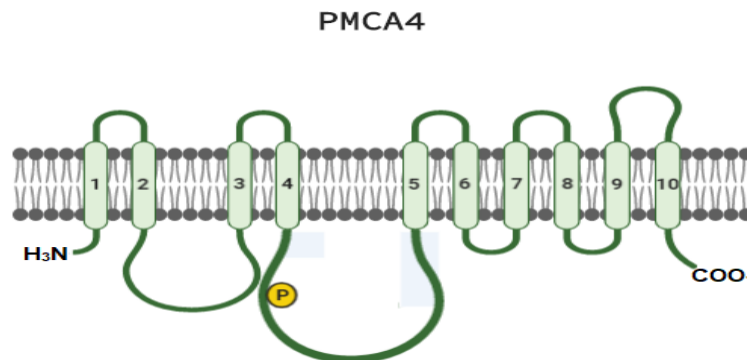


Fig 1. Estructura de PMCA4, compuesta por 10 hélices transmembrana (1-10). Modificado de: Padányi *et al.*, 2015.

C. *CatSper*

En mamíferos se expresa un canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide (*CatSper*), localizado en la pieza principal del flagelo, conduce a un aumento en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$, lo que facilita la hiperactivación del espermatozoide y fertilidad masculina [29-30].

CatSper es activado por voltaje, alcalinización y diversos ligandos como la progesterona. Este canal se compone de cuatro subunidades formadoras de poros (*CatSper*1-4 o α 1- α 4) y cinco subunidades auxiliares adicionales; gamma (γ), beta (β), delta (δ), épsilon (ϵ) y zeta (ζ). Cada subunidad tiene seis STM. Los primeros cuatro STM sirven como sensores de voltaje y los dos últimos forman el poro del canal (Fig 3) [31]. En la región del poro se encuentran repetidos cuatro residuos de glutamina/aspartato que dan la selectividad a Ca^{2+} en el canal [31].

La especificidad de este canal por Ca^{2+} está determinada por la región consenso del poro dada por aminoácidos cargados negativamente ([Treonina/Serina] x [Aspartato/Ácido Glutámico] x Triptófano) [32]. Los aminoácidos cargados positivamente (lisina/arginina) están presentes en la región transmembranal S4 para censar el voltaje y activar el canal. *CatSper*1 difiere de *CatSper* (2-4) por presentar un dominio rico en residuos de histidina en el N-terminal, el cual funciona como un sensor del pH_i (alcalinización) [16].

Estudios sobre *CatSper*, concluyen que la ausencia de este canal iónico o deficiencia de cualquiera de sus subunidades afecta la hiperactivación espermática, por lo tanto, la fertilidad masculina, impidiendo que el espermatozoide llegue a la zona de reconocimiento con el ovocito [21]. Además de los iones involucrados en la estimulación de *CatSper* durante la capacitación, también se ha encontrado que las hormonas esteroides se involucran en este proceso [29, 30]. Una de las hormonas más estudiadas es la progesterona (P4), sintetizada y liberada por las células de la granulosa del folículo [33].

Los espermatozoides al ser depositados en el tracto reproductor femenino están expuestos a P4 y diversas moléculas antes de que entren en contacto con el ovocito, en donde concentraciones nanomolares de P4 pueden activar el canal de dos formas: La progesterona se une directamente al canal logrando su activación, o mediante la unión a una serina hidrolasa ABHD2 (dominio α/β hidrolasa, proteína 2; 425 aminoácidos). En la membrana plasmática del espermatozoide se produce constantemente endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol (2-AG) para mantener cerrado-inhibido a *CatSper*; se demostró en espermatozoides de humano que ABHD2 se une a la P4 y provoca la degradación de 2-AG al actuar como una hidrolasa lipídica, activando al canal, permitiendo el flujo de Ca^{2+} al interior del espermatozoide [34].

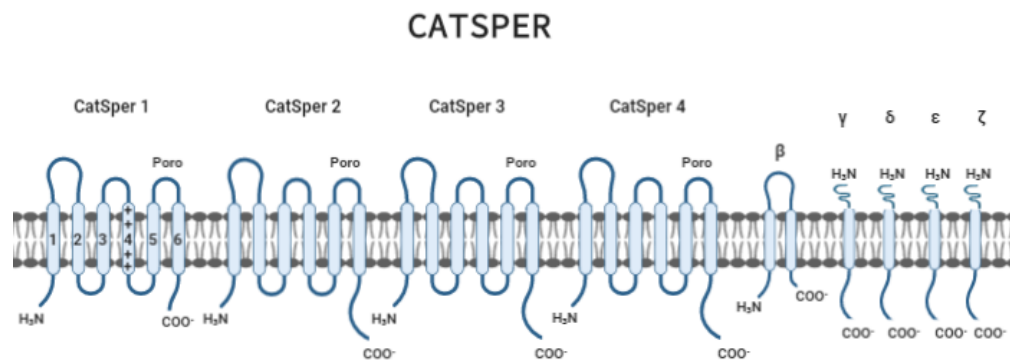


Fig 2. Estructura del canal específico del espermatozoide (*CatSper*). Este canal se compone de cuatro subunidades formadoras de poros (*CatSper*1-4 o α 1- α 4) y cinco subunidades auxiliares adicionales; gamma (γ), beta (β), delta (δ), épsilon (ϵ) y zeta (ζ). Cada subunidad *CatSper* tiene seis segmentos transmembranales (1-6). Modificado de: Nishigaki et al., 2016.

D. Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v)

Se han observado canales Ca_v en los espermatozoides de algunas especies de mamíferos en donde participan regulando la concentración intracelular de Ca^{2+} . Estos canales iónicos responden a los cambios en el flujo y gradiente de iones generando como resultado un potencial eléctrico, conocido como potencial de membrana (E_m) [36]. Además, se regulan por proteínas G de manera directa, a través del contacto entre la proteína G y las subunidades que conforman al canal o indirectamente a través de la participación de segundos mensajeros y/o proteínas cinasas [16, 35].

Los canales Ca_v están distribuidos a lo largo del flagelo de los espermatozoides, por lo que posiblemente participan en la movilidad de estas células [8, 16]. Es difícil estudiar electrofisiológicamente este tipo de canales en espermatozoides debido a su morfología (tamaño de cabeza y rigidez de membrana). Por lo tanto, se han empleado en células espermatogénicas, moléculas fluorescentes y anticuerpos específicos para determinar la expresión y ubicación de estos canales de Ca^{2+} , considerando la síntesis de proteínas durante la espermatogénesis.

Los canales Ca_v , se pueden catalogar en varias clases funcionales, activados por alto voltaje (HVA) o tipo L y canales activados por bajo voltaje (LVA) o tipo T [16, 35]. Los canales HVA requieren de fuertes despolarizaciones para abrirse, mientras que los canales LVA necesitan despolarizaciones débiles [16].

El poro conductor de iones de los canales Ca_v está formado por la subunidad 1 de 200 kDa, que se codificó por una familia de 10 genes agrupados en tres subfamilias: 1) Ca_v1 con cuatro miembros ($Ca_v1.1$ - $Ca_v1.4$) todos conduciendo corrientes de tipo L, 2) Ca_v2 con tres miembros ($Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$), y 3) Ca_v3 con tres miembros ($Ca_v3.1$ - $Ca_v3.3$). La subunidad 1 consta de cuatro dominios (I-IV), los cuales contienen seis STM rodeando el poro (Fig 4) [16].

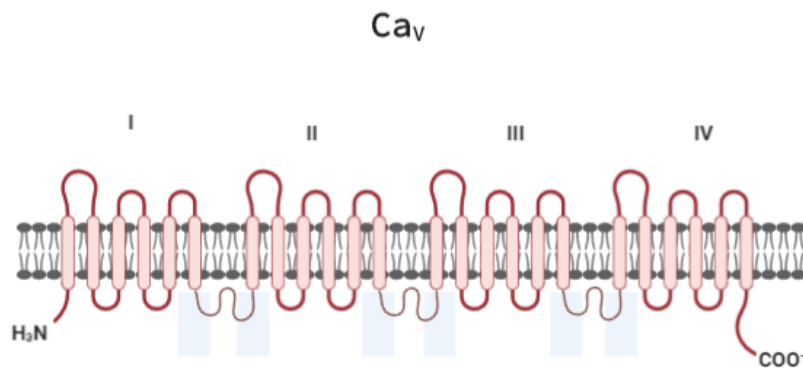


Fig 3. Estructura del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje (Ca_v). Modificado de: Nishigaki *et al.*, 2016.

RECONOCIMIENTOS

A la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCIAS

- [1] C. Austin, "The 'capacitation' of the mammalian sperm," *Nature*, vol. 170, no. 4321, pp. 326, 1952.
- [2] M. Gervasi and P. E. Visconti, "Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation," *Andrology*, vol. 5, no. 2, pp. 204–218, 2017.
- [3] B. Robaire, B. T. Hinton, and M.-C. Orgebin-Crist, "The epididymis". In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*, Elsevier. pp. 1071–1148, 2006.
- [4] S.-K. Jin and W.-X. Yang, "Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated?," *Oncotarget*, vol. 8, no. 2, pp. 3600, 2017.
- [5] M. G. Gervasi and P. E. Visconti, "Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 83, no. 10, pp. 860–874, 2016.
- [6] J. L. Bailey, "Factors regulating sperm capacitation," *Systems Biology in Reproductive Medicine*, vol. 56, no. 5, pp. 334–348, 2010.
- [7] J. C. Chávez et al., "Ion Permeabilities in Mouse Sperm Reveal an External Trigger for SLO3-Dependent Hyperpolarization," *Plos One*, vol. 8, no. 4, pp. 1–13, 2013.
- [8] A. Darszon, "Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo," *Biotecnología*, vol. 14, pp. 31–33, 2007.
- [9] I. A., Boerke, A., Tsai, P., y Gadella, B. M. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology*, vol. 52, no. 6, pp. 473–480, 2004.
- [10] M. Olivera, T. Ruiz, A. Tarazona, and C. Giraldo, "El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización," *Rev. Colomb. Ciencias Pecu.*, vol. 19, no. 4, pp. 426–436, 2006.
- [11] C. Stival, L. del C. P. Molina, B. Paudel, M. G. Buffone, P. E. Visconti, and D. Krapf, "Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm," in *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*, Springer. pp. 93–106, 2016.
- [12] M. Okabe, "The acrosome reaction: a historical perspective," in *Sperm acrosome biogenesis and function during fertilization*, Springer. pp. 1–13, 2016.
- [13] J. Kulbacka, A. Choromańska, J. Rossowska, J. Weźgowiec, J. Saczko, and M.-P. Rols, "Cell membrane transport mechanisms: Ion channels and electrical properties of cell membranes," in *Transport Across Natural and Modified Biological Membranes and its Implications in Physiology and Therapy*, Springer. pp. 39–58, 2017.
- [14] K. K. Shukla, A. A. Mahdi, and S. Rajender, "Ion channels in sperm physiology and male fertility and infertility," *J. Androl.*, vol. 33, no. 5, pp. 777–788, 2012.
- [15] Y. L. Shi, J.-P. Bai, and W.-P. Wang, "Ion-channels in human sperm membrane and contraceptive mechanisms of male antifertility compounds derived from Chinese traditional medicine," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 24, no. 1, pp. 22–30, 2003.
- [16] A. Darszon, T. Nishigaki, C. Beltran, and C. L. Trevino, "Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa," *Physiological Reviews*, vol. 91, no. 4, pp. 1305–1355, 2011.
- [17] M. G. Gervasi and P. E. Visconti, "Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation," *Andrology*, vol. 5, no. 2, pp. 204–218, 2017.
- [18] E. Knobil, *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, vol. 2. Gulf Professional Publishing, 2006.
- [19] M. R. Miller, S. A. Mansell, S. A. Meyers, and P. V Lishko, "Flagellar ion channels of sperm: similarities and differences between species," *Cell Calcium*, vol. 58, no. 1, pp. 105–113, 2015.
- [20] L. C. Puga Molina, G. M. Luque, P. A. Balestrini, C. I. Marín-Briggiler, A. Romarowski, and M. G. Buffone, "Molecular basis of human sperm capacitation," *Frontiers in cell and Developmental Biology*, vol. 6, p. 72, 2018.
- [21] R. Pereira, R. Sá, A. Barros, and M. Sousa, "Major regulatory mechanisms involved in sperm motility," *Asian J. Andrology*, vol. 19, no. 1, p. 5, 2017.

- [22] Z. Krasznai et al., “Role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in calcium homeostasis and human sperm motility regulation,” *Cell Motility and Cytoskeleton*, vol. 63, no. 2, pp. 66–76, 2006.
- [23] K. D. Philipson, Nicoll, D. A., Ottolia, M., Quednau, B. D., Reuter, H., John, S., and Qiu, Z., “The Na⁺/Ca²⁺ exchange molecule: an overview,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 976, no. 1, pp. 1–10, 2002.
- [24] A. A. Al-Dossary, E. E. Strehler, and P. A. Martin-DeLeon, “Expression and secretion of plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm,” *Plos One*, vol. 8, no. 11, 2013.
- [25] G. W. Okunade, M. L. Miller, G. J. Pyne, R. L. Sutliff, K. T. O’Connor and J. C. Neumann, “Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 32, pp. 33742–33750, 2004.
- [26] T. Brandenburger, “Switch of PMCA4 splice variants in bovine epididymis results in altered isoform expression during functional sperm maturation,” *Journal Biological Chemistry*, vol. 286, no. 10, pp. 7938–7946, 2011.
- [27] J. Krebs, “The Plasma Membrane Calcium Pump (PMCA): Regulation of Cytosolic Ca²⁺, Genetic Diversities and Its Role in Sub-plasma Membrane Microdomains,” in *Membrane Dynamics and Calcium Signaling*, Springer. pp. 3–21, 2017.
- [28] K. Schuh and S. Rajender, “Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 27, pp. 28220–28226, 2004.
- [29] T. Strünker, N. Goodwin, C. Brenker, N. D. Kashikar, I. Weyand, R. Seifert and U. Kaupp, “The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm,” *Nature*, vol. 471, no. 7338, pp. 382–386, 2011.
- [30] P. V Lishko, I. L. Botchkina, and Y. Kirichok, “Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm,” *Nature*, vol. 471, no. 7338, pp. 387–391, 2011.
- [31] A. P. Singh and S. Rajender, “CatSper channel, sperm function and male fertility,” *Reproductive Biomedicine Online*, vol. 30, no. 1, pp. 28–38, 2015.
- [32] B. Navarro, Y. Kirichok, J.-J. Chung, and D. E. Clapham, “Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa,” *Int. Journal Developmental Biology*, vol. 52, p. 607, 2008.
- [33] S. G. Brown, S. Costell, M. C. Kelly, M. Ramalingam, E. Drew, S. J. Publicover and S. M Da Silva, “Complex CatSper-dependent and independent [Ca²⁺]_i signalling in human spermatozoa induced by follicular fluid,” *Human Reproduction*, vol. 32, no. 10, pp. 1995–2006, 2017.
- [34] M. R. Miller, N. Mannowetz, A.T. Lavarone, R. Safavi, E. O. Gracheva, J. F. Smith and P.V. Lishko, P, “Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone,” *Science (80)*, vol. 352, no. 6285, pp. 555–559, 2016.
- [35] A. Darszon, P. López-Martínez, J. J. Acevedo, A. Hernández-Cruz, and C. L. Treviño, “T-type Ca²⁺ channels in sperm function,” *Cell Calcium*, vol. 40, no. 2, pp. 241–252, 2006.
- [36] C. Ritagliati, C. B. Graf, C. Stival, and D. Krapf, “Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization,” *Mechanisms of Development.*, vol. 154, pp. 33–43, 2018.