



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Participación de CatSper y de la proteína cinasa dependiente de AMPc
(PKA) en la quimiotaxis del espermatozoide de erizo de mar**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

José Daniel Ángeles Salazar

DIRECTOR

Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez
Instituto de Biotecnología-UNAM

Sinodales

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM

M. C. Héctor Vicente Ramírez Gómez
Instituto de Biotecnología-UNAM

M.C. Yoloxóchitl Sánchez Guevara
Instituto de Biotecnología-UNAM

Biol. Hugo Suárez Contreras
Facultad de Ciencias Biológicas

CUERNAVACA, MORELOS

Febrero, 2021

El presente trabajo se realizó en el Consorcio de Fisiología del Espermatozoide del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Mor.

Financiamiento

Para la realización de esta tesis de licenciatura se contó con el apoyo económico de los donativos PAPIIT-UNAM IN206016 e IN215519 otorgados a la Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez. José Daniel Ángeles Salazar tuvo beca del donativo IN215519 y de CONACyT como ayudante de Investigador SNI III (Dr. A. Darszon).

Agradecimientos:

A mi directora de tesis la Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez, a quien respeto y admiro por sus conocimientos, la paciencia y la devoción a su trabajo que siempre la caracterizo desde que la conocí, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A los miembros del comité: Dra. María del Rayo Sánchez Carbente, M en C. Héctor Ramírez Gómez y Biol. Hugo Suarez Contreras quien, por todo su apoyo, observaciones y disposición durante el desarrollo de este proyecto, así como por formar parte de mi jurado de tesis al igual que la M.C. Yoloxochitl Sánchez Guevara.

Al Dr. Alberto Darszon Israel quien me dio la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación. Por su apoyo y disponibilidad.

Al M en C. Héctor Ramírez Gómez y a la Dra. Ana Laura Gonzales Cota, quienes me ayudaron durante la realización de los experimentos de quimiotaxis.

A la M.C. Yoloxochitl Sánchez Guevara, el Biol. José Luis de la Vega Beltrán y Paulina Torres Rodríguez por su disponibilidad y el apoyo técnico durante el desarrollo del proyecto.

A los Drs. Ignacio López Gonzales quien me enseñó el uso y cuidado del osmómetro y Julio Cesar Chávez Zamora, por apoyarme con el uso de las plataformas virtuales del grupo del laboratorio.

Al Sr. Antonio blancas por el cuidado de los acuarios para los erizos.

A los integrantes de la Unidad de Computo del Instituto de Biotecnología. Arturo Ocadiz Ramírez, Juan Manuel Hurtado Ramírez, Servando Aguirre Cruz, Roberto Pablo Rodríguez Bahena y David Santiago Castañeda Carreón

A mis compañeros de laboratorio; principalmente al Ing. Hiram Pacheco Castillo y a la Biol. Erika Zagal Huerta por aclarar mis dudas y brindarme su amistad.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme ser parte de la institución y darme los conocimientos fundamentales para mi desarrollo como estudiante, así como a su planta de docentes por las clases recibidas.

Dedicatoria:

A mi familia, para mi primo Emanuel Salazar Venegas, quien ha sido más que mi primo, un hermano que me ha acompañado a lo largo de mi juventud, para mi padre José Santos Ángeles Chimal, quien, aunque no siempre podía estar en todo momento, en los momentos importantes estuvo presente, para mi hermana Mariela Ángeles Salazar, quien ha sido la persona que más me ha enseñado durante mi crecimiento, me ha escuchado y comprendido a lo largo de mi vida y para mi madre Leonor Salazar Jayer, quien es la persona que me ha dado todo de si para poder llegar hasta donde estoy impidiendo la carencia en nuestro hogar resultado de su esfuerzo y siempre dándonos su amor y apoyo a mí y a mi hermana en todo momento, los amo.

A mis amigos, quienes me ayudaron en momentos difíciles, me dieron su compañía y apoyo de manera incondicional a lo largo de la carrera aun cuando pensara que ya no había nada más por hacer los considero parte importante en esta etapa de mi vida pues me ayudaron a madurar como un mejor estudiante y con ello una mejor persona por lo que los considero mis hermanos: Fernando Aranda Lozano, Javier Hernández Rodríguez, Carlos Alberto Hernández Orta, Clara Itzel Gómez Guerrero, Dania Stephanie Brito Beltrán.

Índice

Abreviaturas	viii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
La fecundación	1
Los erizos de mar	2
El espermatozoide de erizo de mar	4
La motilidad del espermatozoide de erizo de mar	4
La quimiotaxis del espermatozoide de erizo de mar	6
Los canales iónicos del espermatozoide de erizo de mar	7
La cascada de señalización disparada por el speract	8
El canal catiónico específico del espermatozoide CatSper	10
La fosforilación de proteínas	13
-Las proteínas cinasas	13
-La cinasa dependiente de AMPc (PKA)	14
-La proteína cinasa C (PKC)	15
El índice quimiotáctico	16
ANTECEDENTES	19
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Análisis <i>in silico</i> para la predicción de los sitios de fosforilación por PKA y PKC ...	22
Obtención de espermatozoides de erizo de mar	23
Experimentos de quimiotaxis	24
Protocolo de captura de imágenes	25
Análisis de trayectorias de espermatozoides de erizo de mar	26
Análisis estadístico de las respuestas quimiotácticas de los eem	27
RESULTADOS	28
Análisis <i>in silico</i> de los sitios de fosforilación por PKA y por PKC en CatSper de <i>S. purpuratus</i> y <i>M. musculus</i>	28
Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides a diferentes concentraciones de speract	30
CatSper participa en la quimiotaxis	32
PKA participa en la respuesta quimiotáctica	32

La participación de AMPc en la quimiotaxis	33
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	37
PERSPECTIVAS.....	37
REFERENCIAS	38
MATERIAL SUPLEMENTARIO	x

Figuras

Figura 1. Anatomía de la estructura general interna del erizo de mar	3
Figura 2. Los modelos de erizos de mar utilizados en este estudio	3
Figura 3. Esquema del espermatozoide de erizo de mar (eem)	4
Figura 4. Modelo de cascada de señalización activada por speract	10
Figura 5. Modelo del canal iónico CatSper.....	12
Figura 6. Índice quimiotáctico	19
Figura 7. Obtención de gametos	23
Figura 8. Estrategia experimental para la determinación de quimiotaxis en eem.....	25
Figura 9. Ejemplos de los movimientos de los espermatozoides experimentando quimiotaxis positiva (A), nula (B) y negativa (C)	27
Figura 10. Análisis de trayectorias y estadístico de los eem	28
Figura 11. CatSper y PKA participan en la quimiotaxis de los eem	34

Tablas

Tabla I. Comparación de sitios predichos (probabilidad ≥ 0.8) de fosforilación por PKA, PKC y otras cinasas en las subunidades de CatSper de <i>M. musculus</i> (mCatSper, en letras rojas) y <i>S. purpuratus</i> (SpCatSper, en letras negras) excluyendo las regiones transmembranales	30
Tabla II. Experimentos de quimiotaxis con diferentes concentraciones de speract .	31
Tabla III. Análisis estadístico entre poblaciones representativas de las condiciones experimentales.....	34

Tablas suplementarias

Tabla SI. Alineamiento de secuencias de CatSper1 de erizo (XP_011664201), ratón (NP_647462.1) y humano (NP_444282.3).....	x
Tabla SII. Alineamiento de secuencias de CatSper2 de erizo (XP_011679404.1), ratón (A2ARP9.2) y humano (NP_742093.1).....	xii
Tabla SIII. Alineamiento de secuencias de CatSper3 de erizo (XP_011666090), ratón (NP_001239416.1) y humano (NP_821138.1).....	xiii
Tabla SIV. Alineamiento de secuencias de CatSper4 de erizo (XP_011682209.1), ratón (NP_808534.1) y humano (NP_937770.1).....	xiv

Tabla SV. Alineamiento de secuencias de CatSperβ de erizo (XP_011679115.1), ratón (NP_766611.2) y humano (NP_079040.2)	xv
Tabla SVI. Alineamiento de secuencias de CatSperγ de erizo (XP_011679048.1), ratón (XP_006540153.1) y humano (NP_067008.3)	xvii
Tabla SVII. Alineamiento de secuencias de CatSperδ de erizo (XP_011683737.1), ratón (NP_780559.2) y humano (NP_689997.3)	xx
Tabla SVIII. Alineamiento de secuencias de CatSperϵ de erizo (XP_011664202.2), ratón (P0DP43.1) y humano (NP_001124429.1)	xxii
Tabla SIX. Alineamiento de secuencias de CatSperϵ de erizo (XP_030855090.1), ratón (P0DP43.1) y humano (NP_001124429.1)	xxiv
Tabla SX. Alineamiento de secuencias de CatSper EFCAB9 de erizo (XP_003728906.1), ratón (NP_081307.2) y humano (NP_001164654.1)	xxvi
Tabla SXI. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de <i>M. musculus</i>	xxvii
Tabla SXII. Resumen de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de <i>M. musculus</i>	xxxv
Tabla SXIII. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de <i>S. purpuratus</i>	xxxvi
Tabla SXIV. Resumen de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de <i>S. purpuratus</i>	xxxix
Tabla SXV. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de <i>S. purpuratus</i> sin considerar las regiones transmembranales	xl
Tabla SXVI. Resumen de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC (probabilidad ≥ 0.8) en las subunidades de CatSper de <i>S. purpuratus</i> sin considerar las regiones transmembranales	xliv
Tabla SXVII. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de <i>M. musculus</i> sin considerar las regiones transmembranales	xliv
Tabla SXVIII. Resumen de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC (probabilidad ≥ 0.8) en las subunidades de CatSper de <i>M. musculus</i> sin considerar las regiones transmembranales	li
Tabla SXIX. Análisis estadístico de experimentos de quimiotaxis	lii
Tabla SXX. Análisis estadístico entre poblaciones representativas de todas las condiciones experimentales	lii

Abreviaturas

[Ca²⁺]_i, concentración de calcio intracelular.

ACtm, adenilil ciclase transmembranal.

AMA, agua de mar artificial.

AMA0Ca, agua de mar artificial sin calcio.

AMA40K, agua de mar artificial con 40 mM de KCl.

AMPc, adenosina monofosfato cíclico.

ATP, adenosina trifosfato.

CatSper, canal catiónico de calcio específico de espermatozoide.

Ca²⁺, calcio.

CI, índice quimiotáctico.

C1, dominio conservado de PKC en este dominio se encuentra el sitio de unión para ésteres de forbol y DAG.

C2, dominio conservado de PKC contiene el sitio de reconocimiento para los ácidos grasos, y el sitio de unión para el calcio.

°C, grado centígrado.

DAG, diacilglicerol.

Em, potencial de membrana

eem, espermatozoide de erizo de mar.

GMPc, Guanilil monofosfato cíclico.

HC-056456, Inhibidor de CatSper.

KCl, cloruro de potasio.

K⁺, potasio.

IBMX 3-isobutil-1-metilxantina. Inhibidor de fosfodiesterasas.

LECI, Índice quimiotáctico de la ecuación lineal.

M, molar.

mM, milimolar.

ml, mililitro.

nM, nanomolar.

Na⁺, Sodio.

NNC, NNC-55-0396. Inhibidor de CatSper.

FDEs, fosfodiesterasas.

pH_i, pH intracelular.

PKA, proteína cinasa dependiente de AMPc.

PKC, proteína cinasa activada por fosfatidilserina, DAG y Ca²⁺.

PKI, inhibidor de cinasa PKA.

S, serina.

sAC, adenilil ciclase soluble.

Sp, *Strongylocentrotus purpuratus*

SpHCN, Canal de sodio activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos de *Strongylocentrotus purpuratus*.

TRPC, canal catiónico del receptor del potencial transitorio.

T, treonina.

UV, luz ultravioleta.

µm, micrómetro.

µM, micromol.

RESUMEN

CatSper, es un canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide que se activa por cambios en el pH intracelular (pH_i) y en el potencial de membrana (despolarización) (Hwang *et al.*, 2019), y en ratón, por fosforilación mediada por la cinasa dependiente de AMPc (PKA; Orta, *et al.*, 2018), entre otros. El canal está constituido por diez subunidades que forman un complejo heteromérico y, tanto ratones macho como hombres con mutaciones en los genes de CatSper presentan infertilidad. En los mamíferos como en los erizos de mar, CatSper es el responsable principal del aumento de Ca^{2+} citosólico indispensable para las funciones necesarias en la fecundación, por lo que se ha propuesto como un blanco excelente para anticonceptivos para hombres. Hay evidencias de que en los espermatozoides de erizo de mar (eem), CatSper participa en la quimiotaxis (Seifert *et al.*, 2015; Velázquez-Pérez *et al.*, 2016) y en la vía de señalización del speract (decapéptido presente en la cubierta del óvulo) cuyo receptor está en el flagelo. En este modelo, la motilidad se regula por AMPc, Ca^{2+} y por fosforilación mediada por PKA y por PKC (cinasa modulada por fosfatidilserina, diacilglicerol y Ca^{2+}). Anteriormente mediante el uso de mibefradil y NNC-55-0396 (ambos bloqueadores de CatSper) en espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*, se inhibió la acumulación de los espermatozoides hacia el speract lo cual sugiere la participación de CatSper en la quimiotaxis (Velázquez-Pérez, *et al.*, 2016). En este trabajo corroboramos que CatSper participa en la quimiotaxis de espermatozoides de erizo de mar utilizando HC-056456, otro bloqueador de CatSper y un nuevo índice quimiotáctico. Dado que las secuencias de las subunidades de CatSper de *S. purpuratus* son diferentes a las de ratón, realizamos un análisis *in silico* de los sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC. Lo que encontramos es que CatSper de *S. purpuratus* tiene 7 sitios con una probabilidad de fosforilación cercana a 0.8 por PKA y 25 por PKC. Contra lo esperado, cuando evaluamos el efecto de PKI (inhibidor de PKA) y de queleritina (inhibidor de PKC) en la quimiotaxis de los espermatozoides, encontramos que la inhibición de PKA afecta la quimiotaxis y que la inhibición de PKC no tiene efecto. Estos resultados sugieren que CatSper y PKA participan en la quimiotaxis de espermatozoides. Nuestros resultados al aumentar los niveles de AMPc con 3-isobutil-1-metilxantina (Beltrán *et al.*, 1996), muestran que dicho compuesto aumenta el diámetro de la trayectoria del nado circular de los

espermatozoides, lo cual imposibilitó la evaluación de la participación del efector de la PKA (AMPc) en la quimiotaxis.

INTRODUCCIÓN

La fecundación

La fecundación es un proceso en el cual se fusionan los gametos haploides tanto masculino como femenino para dar origen a otro organismo genéticamente diferente que será diploide. Es un evento importante para que los organismos dependientes de la reproducción sexual puedan preservar su especie. La fecundación depende de la comunicación entre los gametos y el ambiente que los rodea. Al liberarse, los gametos se deben encontrar para que la fecundación se lleve a cabo en escasos minutos u horas, de lo contrario mueren. Dicho evento consta de varios procesos secuenciales: tras el contacto y el reconocimiento de los gametos, empieza la entrada de los espermatozoides al óvulo, la fusión del material genético y la activación del cigoto para iniciar con el desarrollo (Yanagimachi, 1994). Mediante la reproducción sexual se consigue la combinación de genes derivados de los progenitores, cada célula posee dos juegos cromosomales heredados de cada uno de los padres respectivamente, en los cuales la producción de gametos ocurre en las gónadas (testículos en machos y ovarios en las hembras) (Vacquier, 1998). La reproducción sexual puede ser tanto interna como externa. En la reproducción sexual interna encontramos múltiples procesos consecutivos como: la migración de los espermatozoides a través del tracto genital femenino, la penetración de los espermatozoides a las células del cúmulus, la adhesión a la zona pelúcida, la inducción de la reacción acrosomal (RA) y la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y del óvulo. Después de esta serie de eventos, los espermatozoides pueden fecundar al óvulo. Estos cambios bioquímicos y fisiológicos que le ocurren al espermatozoide para poder fecundar al óvulo homólogo se denominan capacitación. Algunos componentes necesarios para que la capacitación sea completa es la presencia de bicarbonato (HCO_3^-), de albúmina y de Ca^{2+} (Darszon *et al.*, 2011). En invertebrados del filo Echinodermata se ha estudiado ampliamente la fecundación ya que brinda algunas ventajas como generar una gran cantidad de gametos, la facilidad para obtenerlos, el acceso a todo el proceso de fecundación y del desarrollo embrionario (Alberts *et al.*, 2007). Los erizos y las estrellas de mar son los modelos más usados en embriología y a los

cuales se debe la mayor parte de la información sobre la fecundación (Darszon *et al.*, 2008; Espinal Enríquez *et al.*, 2014; Vacquier *et al.*, 2014).

Los erizos de mar

Los erizos de mar (Figura 1), son animales pertenecientes al filo de los Echinodermata palabra del griego que significa “*echino*” espina y “*dermos*” piel. Los equinodermos se originaron a inicios del Precámbrico en hábitats hiperbentónicos, de un deuterostomado excavador ancestral. La mayoría de los arquetipos se habían establecido en el Cámbrico (de donde son los registros fósiles más antiguos) alcanzando su punto máximo a principios y mediados del Paleozoico. Actualmente se reconocen cinco clases en este filo: 1) Asteroideas (Estrellas de mar) 2) Ophiuroidea (Ofiuras, estrellas de cesta) 3) Holothuroidea (Pepinos de mar) 4) Crinoidea (Lirio de mar) y 5) Echinoidea (Erizos de mar). Los integrantes de la clase Echinoidea poseen un cuerpo globoso o discoidal, placas esqueléticas unidas por una matriz de colágeno e interdigitaciones de calcita formando un caparazón duro con espinas móviles que ocupan para desplazarse, canales acuíferos dentro del caparazón, surcos ambulacrales cerrados, aparato masticador interno (linterna de Aristóteles), situado tras la boca y provisto de cinco dientes calcáreos protráctiles que les permiten alimentarse. La clase Echinoidea se divide a su vez en las subclases Cidaroidea (Erizos lápiz) y Euechinoidea (Erizos de mar). Los integrantes de la subclase Euechinoidea mantienen un caparazón globular o discoidal, el número de pies ambulacrales y espinas por placa varía, la disposición del ano va desde aboral a posterior. Los erizos de mar se encuentran en todos los océanos y en todas las profundidades, principalmente son consumidores de algas, detritívoros y en algunos casos depredadores. Son deuterostomados, poseen un celoma bien desarrollado que posee un sistema vascular acuífero compuesto por un conjunto de canales y cámaras derivados del celoma, un endoesqueleto compuesto por osículos calcáreos exclusivos (compuestos de CaCO_3 y MgCO_3) cubierto por la epidermis, y una simetría pentámera con formas larvarias bilaterales. Los erizos regulares poseen cinco gónadas, cada una en el interior de una zona interambulacral. Los gonoporos están situados en las cinco zonas interambulacrales del periprocto.

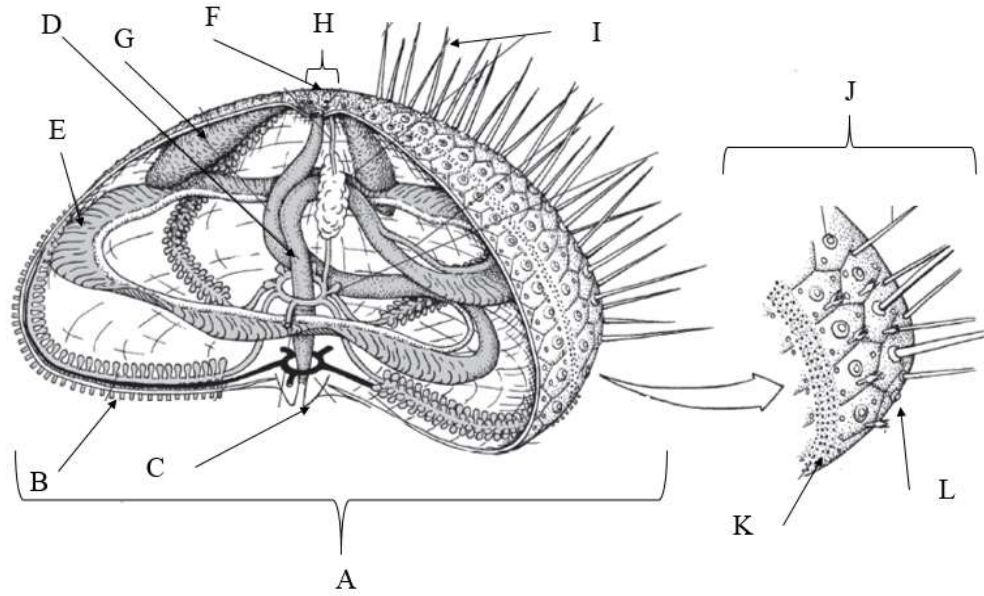


Figura 1. Anatomía de la estructura general interna del erizo de mar. Cuerpo globoso (A), pie ambulacral (B), linterna de Aristóteles (C), esófago (D), estómago (E), ano (F), gónada (G), periprocto (H), espina móvil (I), ampliación de una región del endoesqueleto (J), placas interambulacrales (K) y placa ambulacral (L). Modificado de Calcagno *et al.*, 2014.

El erizo de mar es un organismo de fecundación externa que se ha usado como modelo de estudio de la fecundación por más de 110 años. Es un organismo dioico, posee sexos separados. Estos organismos al no poseer dimorfismo sexual solo se pueden diferenciar tras la liberación de los gametos, los espermatozoides presentan un color blanco y los óvulos un color naranja (Vacquier 1986; Brusca & Brusca, 2003; Darszon *et al.*, 2011). Los erizos de mar empleados en este estudio son las especies *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus* (Figura 2).

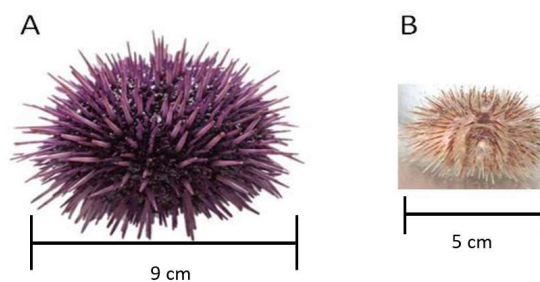


Figura 2. Los modelos de erizos de mar utilizados en este estudio. A) *Strongylocentrotus purpuratus* y B) *Lytechinus pictus*

El espermatozoide de erizo de mar

Es una célula haploide altamente polarizada la cual tiene como función fecundar al óvulo. Los espermatozoides de erizo de mar (eem) se pueden obtener en grandes cantidades siendo de hasta 40,000 millones de espermatozoides en un mililitro por un erizo al inyectarle KCl 0.5 M en la cavidad intracelómica. En *S. purpuratus* se pueden obtener hasta 5 ml de semen. El eem (Figura 3) se divide en: cabeza, cuya dimensión es $\sim 3 \times 1 \mu\text{m}$ con $2 \mu\text{m}$ de largo la cual contiene al acrosoma, el núcleo y una mitocondria, y en el flagelo con una dimensión de $\sim 0.2 \times 50 \mu\text{m}$ (Vacquier, 1986; Vacquier *et al.*, 2014; Darszon *et al.*, 2011).

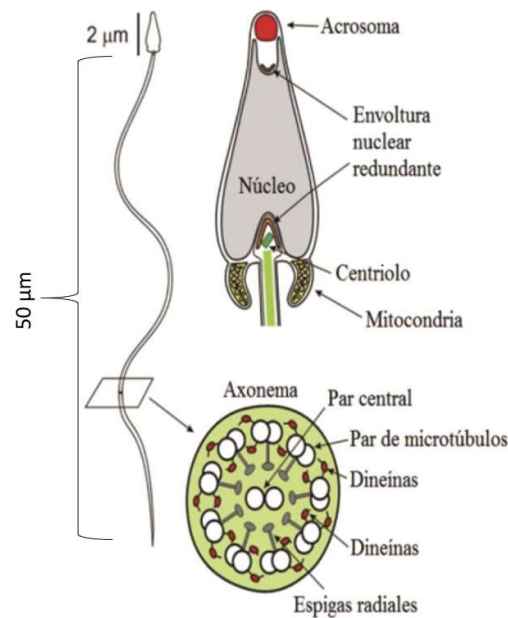


Figura 3. Esquema del espermatozoide de erizo de mar (eem). La parte superior muestra la cabeza con los organelos que la integran, y en la parte inferior una sección transversal del flagelo compuesto principalmente por el axonema, el aparato motor del flagelo. Modificada de Darszon *et al.*, 2011.

La motilidad del espermatozoide de erizo de mar

El espermatozoide en el interior de la gónada permanece inmóvil por la alta concentración de CO_2 y un bajo pH intracelular ($\text{pH}_i = 7.2$). La motilidad se inicia a un pH mayor como el del agua de mar, de 8.0 (Johnson *et al.*, 1983). Posteriormente hay un flujo rápido de H^+ , que eleva el pH_i de 7.2 a 7.6 (Lee *et al.*, 1983). El aumento del pH_i activa las dineínas del axonema, las cuales son ATPasas

dependientes de pH que se activan por alcalinización del pH_i de 7.5 a 8.0 (Christen *et al.*, 1983). La mitocondria es el principal productor de ATP, y las dineínas sus principales consumidoras. La respiración mitocondrial y la motilidad de los espermatozoides se encuentran ligadas y reguladas por el pH_i (Christen *et al.*, 1982; Shapiro *et al.*, 1985). El pH_i del espermatozoide y su motilidad dependen de la composición iónica externa del medio (concentración de sales). La alcalinización artificial del espermatozoide con NH_4Cl , ha permitido probar que el aumento del pH_i participa directamente en la motilidad del espermatozoide (Lee *et al.*, 1983). Manipular la $[Ca^{2+}]_i$ a la que se exponen los espermatozoides permeabilizados o desmembrados de invertebrados (o de mamíferos) altera la asimetría del movimiento flagelar. Además, la alta $[Ca^{2+}]_i$ inhibe la motilidad flagelar (Brokaw 1979; Tash & Means, 1982). La regulación de la motilidad del eem también está influenciada por el AMPc (Vacquier *et al.*, 2014; Beltrán, 2019), el cual es sintetizado por las Adenilil ciclasas (ACs), la Adenilil ciclase soluble (sAC), y ACtm las Adenilil ciclasas Transmembranales (ACtm) (Garbers & Kopf, 1980; Hanoune & Defer, 2001; Cooper, 2003; Cooper & Crossthwaite, 2006; Beltrán *et al.*, 2007; Vacquier *et al.*, 2014). Experimentos de inmunofluorescencia y microscopía de epifluorescencia mostraron que inicialmente, que la sAC está en el flagelo del espermatozoide (Bookbinder *et al.*, 1990) y posteriormente mediante microscopía confocal, se mostró que también está en la región de la cabeza (Beltrán *et al.*, 2007). Además, el nado basal de los eem se altera en presencia de inhibidores de la sAC como el 2-OHE y KH7 (Loza-Huerta, 2013), y se sabe que ~94% del AMPc del eem proviene de la sAC (Vacquier, *et al.*, 2014). En eem también se inmunolocalizaron de manera diferencial cinco ACtms; ACtm1 (área del acrosoma en la cabeza), ACtm2 y ACtm9 (cabeza y flagelo), ACtm5 (áreas del acrosoma y mitocondria en la cabeza) (Beltrán *et al.*, 2007, Vacquier *et al.*, 2014). Adicionalmente, el hecho de que un inhibidor de las ACtm (SQ22536), disminuyera la velocidad de nado basal de los eem ~30%, confirma la presencia de dichas ACtms en las células (Loza-Huerta, 2013). Existe evidencia de la participación de la fosforilación (Inaba, 2003), de PKA, de la cinasa dependiente de lípidos (PKC) (White *et al.*, 2007; Loza-Huerta *et al.*, 2013) y de los sustratos fosforilados por ambas enzimas (pPKAs, pPKCs) (Loza-Huerta *et al.*, 2021), en la motilidad de eem. Además, en los eem hay una comunicación cruzada entre PKA y PKC involucrada en la regulación de su motilidad (Loza-Huerta *et al.*, 2021).

La quimiotaxis del espermatozoide de erizo de mar

La quimiotaxis es el movimiento dirigido de una célula hacia un gradiente químico, y al agente químico que lo causa se llama quimioatrayente. En 1884, Pfeffer demostró por primera vez la quimiotaxis de los gametos masculinos de helecho (Revisado en Kaupp, 2012; Miller, 1985) y hace más de 100 años Lillie lo hizo en espermatozoides de *Arbacia punctulata* (Lillie, 1912). La quimiotaxis en espermatozoides como respuesta a un ligando fue demostrada en *A. punctulata* utilizando el péptido activador del espermatozoide resact purificado (SAP; CVTGAPGCVGGGRL-NH₂) (Ward *et al.*, 1985). Mientras que, en los erizos de mar *Hemicentrotus pulcherrimus* (Suzuki., 1995) y *S. purpuratus*, se purificó e identificó al speract (Hansbrough & Garbers, 1981). Se han desarrollado derivados fotoactivables del speract, denominado “speract enjaulado”. Estos compuestos permitieron caracterizar los patrones de nado generados por un gradiente químico en las especies *L. pictus* y *S. purpuratus* (Tatsu *et al.*, 2002). La trayectoria del nado del espermatozoide de varias especies de invertebrados se caracterizó por la alternancia de vueltas pronunciadas y nado recto (Kaupp *et al.*, 2003), siendo el nado recto el que se observa en presencia de un quimioatrayente, mientras que las vueltas pronunciadas se presentan en su ausencia (Miller., 1977; Guerrero *et al.* 2010a; 2010b). La unión del speract a su receptor en la membrana flagelar dispara un tren de oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$, que genera el nado recto y las vueltas pronunciadas (Wood *et al.*, 2007). El movimiento de giros y vueltas pronunciadas permiten al espermatozoide exponerse a diferentes concentraciones del gradiente del quimioatrayente. Esto genera un cambio en la asimetría del batido flagelar desencadenando fluctuaciones de Ca^{2+} , lo que permite un cambio en el patrón de nado (Kaupp *et al.*, 2003).

También se ha demostrado que la cantidad de receptores en el flagelo de los espermatozoides resulta crucial para la respuesta natatoria del espermatozoide, ya que en modelos predictivos sobre la detección del quimioatrayente, *A. punctulata* tienen mejor detección que *L. pictus* y éste último mejor que *S. purpuratus*. Aunque lo anterior correlaciona muy bien con el número de receptores que tiene el espermatozoide de cada una de esas especies ($\sim 3 \times 10^5$, 6.3×10^4 y 2×10^4 , respectivamente), la pendiente en la concentración del campo de quimioatrayente

resulta ser de vital importancia para una respuesta quimiotáctica en el espermatozoide (Ramírez-Gómez *et al.*, 2020).

Los canales iónicos del espermatozoide de erizo de mar

Los canales iónicos son proteínas de membrana que transportan de manera eficiente iones a través de la bicapa lipídica no conductora. Solo algunos de estos canales son suficientes para activar, en milisegundos, cambios sustanciales de electricidad y concentración en una célula pequeña como el espermatozoide. Los canales iónicos están involucrados en la comunicación entre el espermatozoide con su entorno y el óvulo. La forma en que los espermatozoides nadan, encuentran el óvulo y lo fecundan depende de los cambios de permeabilidad a los iones modulados por las señales ambientales y los componentes de la capa externa del óvulo (Darszon *et al.*, 2006). Un canal de Ca^{2+} localizado en la cabeza de los eem es el receptor de IP₃, una proteína generalmente asociada con la liberación de Ca^{2+} de las reservas internas de Ca^{2+} (Zapata *et al.*, 1997). Durante la quimiotaxis el espermatozoide detecta el gradiente de speract mientras éste se va uniendo a los receptores en el flagelo. Se ha planteado la posible participación de canales de iones Cl^- y K^+ regulados por Ca^{2+} (CaCC y CaCK, respectivamente) (Figura 4), los cuales contribuyen con los eventos de hiperpolarización y despolarización que promueven la remoción de la inactivación y la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v), relacionados con las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del eem en la quimiotaxis (Wood *et al.*, 2003, 2007; Guerrero *et al.*, 2010b, 2013; Espinal-Enríquez *et al.*, 2011). Un modelo de red, validado con los resultados de análisis proteómico de una fracción enriquecida con proteínas integrales de membrana obtenida extrayendo membranas aisladas de flagelos de eem *S. purpuratus* con Triton X-114, predice que CatSper es el canal principal de Ca^{2+} en la motilidad del eem (Espinal-Enríquez *et al.*, 2017). Los canales catiónicos del receptor del potencial transitorio (TRPC) son detectores celulares multifacéticos capaces de participar en diversas funciones como la visión, el gusto, la audición, el tacto, el olfato, la percepción térmica y la nocicepción (Latorre *et al.* 2009; Wu *et al.* 2010). Mediante experimentos de inmunocitoquímica en el eem *S. purpuratus* se identificaron las proteínas TRPC3, TRPC5 Y TRPC6 en la cabeza y en los flagelos

de los eem (Darszon *et al.*, 2012). Otro canal perteneciente a la familia de los TRP en eem es el complejo TRPP1/TRPP2 conformado por las proteínas policistina1 como receptor y policistina2 como canal iónico conocido como suREJ (por sus siglas en inglés: “sea urchin Receptor for Egg Jelly”; Neill *et al.*, 2004). Los canales SpHCN1 y SpHCN2 son canales activados por hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos, inmunolocalizados en el flagelo, y se encuentran involucrados en la vía de señalización del speract (Figura 4), permitiendo la entrada de iones Na^+ ayudando a la repolarización del potencial de membrana (E_m) (Gauss *et al.*, 1998; Galindo *et al.*, 2005). Finalmente, como ya mencionamos, cuando el speract se une a su receptor aumenta la concentración de GMPc, que se une al canal de K^+ tetra-KCNG, el cual es responsable de la hiperpolarización inicial que dispara la unión del speract a su receptor en el flagelo del eem (Galindo *et al.*, 2000).

La cascada de señalización disparada por el speract

Se propone que la cascada de señalización del speract inicia con la unión del regulador de la motilidad speract (de la capa externa del óvulo) a su receptor (SpR) en la membrana del flagelo del espermatozoide, junto con la guanilil ciclasa (GC), elevan los niveles de GMPc que activan a la fosfodiesterasa 5 (FDE5; Rybalkin *et al.* 2003; Su & Vacquier 2006). Con ello se abre el canal de iones K^+ (Tetra-KCNG) produciendo un flujo de salida de K^+ y una disminución transitoria en el potencial de membrana (hiperpolarización), que a su vez activa un intercambiador de Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE). Al elevarse el pH intracelular (pH_i) se estimula a la adenilil ciclasa soluble (sAC; Vacquier *et al.* 2014), aumentan los niveles de AMPc, activa a las ATPasas dineínas, y al canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide, CatSper (Chung *et al.* 2017; Espinal-Enríquez *et al.* 2017; Ren *et al.* 2001; Seifert *et al.* 2015; Hwang *et al.*, 2019) y la carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I; asociada con la membrana externa mitocondrial) que regula el metabolismo mitocondrial para producir ATP (García-Rincón *et al.* 2016). La hiperpolarización inicial provocada por el speract y el aumento de los niveles de AMPc abren el canal de Na^+ , SpHCN, lo que permite la entrada de Na^+ y una despolarización de los espermatozoides. Esta despolarización, junto con el aumento de pH_i y AMPc, activan el canal CatSper que induce oscilaciones de Ca^{2+} en el flagelo de la célula.

El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) cambia el batido flagelar, lo que hace que el espermatozoide gire. Un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependiente de K^+ (NCKX; Su & Vacquier, 2002), y probablemente una bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática (CaP; Gunaratne *et al.* 2006), restablecen los niveles de Ca^{2+} en el reposo. Posiblemente, el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ también abre canales de Cl^- regulados por Ca^{2+} (CaCC) y / o canales K^+ regulados por Ca^{2+} (CaKC), que luego contribuyen a hiperpolarizar nuevamente el Em, eliminando la inactivación de los canales Ca^{2+} activados por voltaje (Cav) y abriendo canales de SpHCN. Este mecanismo se repite cíclicamente para generar un tren de aumentos de Ca^{2+} . La secuencia continúa hasta que uno o más de los componentes moleculares en la ruta se regulan negativamente. Además, el AMPc activa una vía de entrada de Ca^{2+} poco caracterizada, que puede contribuir a un aumento tónico en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Finalmente, las dineínas hidrolizan ATP en concierto con las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para regular el nado de los espermatozoides (basado en Darszon *et al.* 2011; Espinal-Enríquez *et al.* 2017; González-Cota *et al.* 2015; Guerrero *et al.* 2010b; Nishigaki *et al.*, 2014). El aumento en el pHi disparado por la unión del speract a su receptor, también desfosforila (inactiva) a la GC (Ward *et al.* 1985). Es posible que además del aumento de pHi y de la despolarización que regulan a CatSper, la estimulación del canal por la elevación en los niveles de AMPc esté mediada por PKA (como en espermatozoides de ratón; Orta *et al.*, 2018) y/o por PKC.

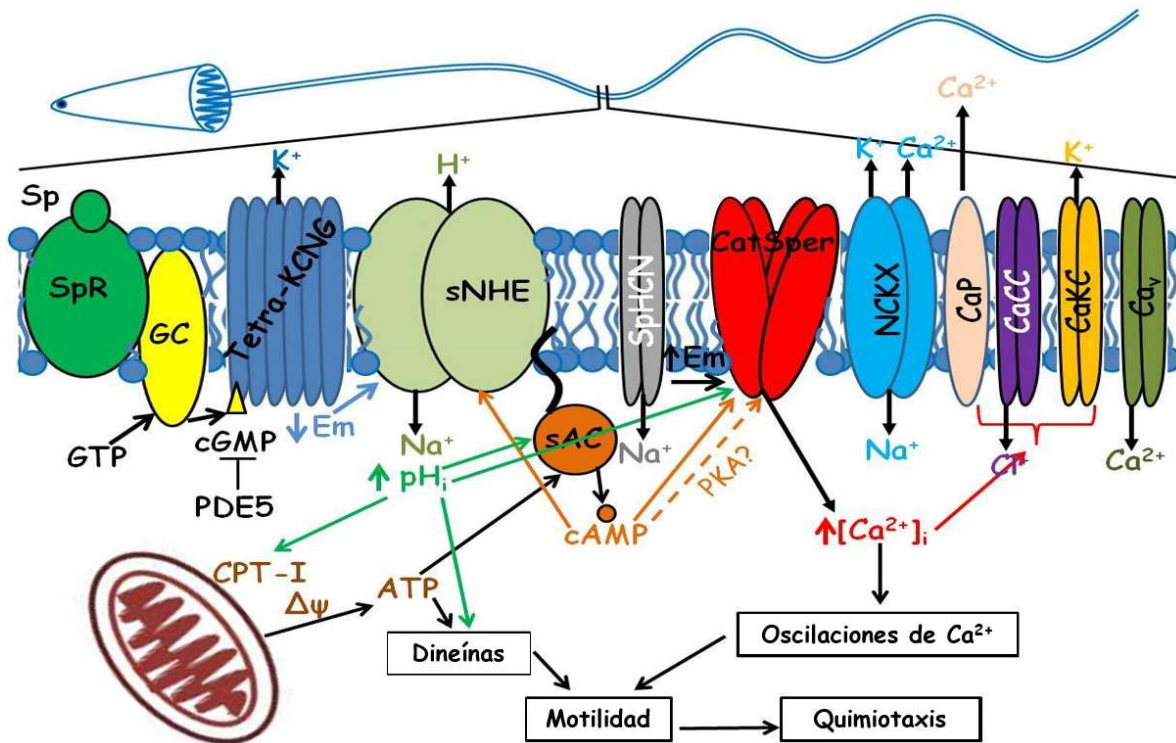


Figura 4. Modelo de cascada de señalización activada por speract. Ver descripción en sección “La cascada de señalización disparada por speract”. Guerrero *et al.*, 2020.

El canal catiónico específico del espermatozoide CatSper

CatSper (Figura 5) pertenece a una clase de canales de Ca^{2+} , cuya expresión se limita a los testículos y es el principal canal mediante el cual el Ca^{2+} entra al flagelo del espermatozoide (Espinal-Enríquez, *et al.*, 2017; Lishko & Mannowetz, 2018). El canal CatSper es débilmente dependiente de voltaje, selectivo para Ca^{2+} , sensible a pH y a Ca^{2+} , tanto en primates como en humanos se regula por progesterona (Lishko *et al.*, 2011, 2012; Strunker *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2019; Rahban *et al.*, 2020). En espermatozoides de mamíferos, su actividad sirve para la hiperactivación y la fertilidad masculina (Lishko *et al.*, 2011; Nishigaki *et al.* 2014; Singh & Rajender, 2014). El canal CatSper está codificado por al menos 10 genes y el poro se encuentra formado por un heterotetrámero de cuatro subunidades α (CatSper 1-4). CatSper1 tiene un dominio N-terminal rico en histidinas (que inicialmente se pensaba era responsable de la sensibilidad a pH (Kirichok *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2001)), CatSper2 tiene residuos cargados positivamente en el cuarto segmento transmembranal en cada cuarta posición, mientras que las subunidades 3 y 4 solo

tienen dos residuos cargados positivamente lo que explica su poca dependencia al voltaje (Quill *et al.*, 2001). Además, hay otras seis subunidades accesorias CatSper β , CatSper γ , CatSper δ , CatSper ϵ , CatSper ζ y EFCAB9 (EF-Hand Calcium Binding Domain 9) (Chung *et al.*, 2017; Hwang *et al.*, 2019). Dada su complejidad, CatSper no se ha podido expresar en sistemas heterólogos (Sun *et al.*, 2017). Los ratones macho que carecen de alguno de los genes que codifican para las subunidades α o δ (Chung *et al.*, 2011), son infértiles debido a la pérdida de la función del canal y a la falta de hiperactivación (Carlson *et al.*, 2003, 2005; Quill *et al.*, 2003, Qi *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2001), al igual que en varones, que presentan pérdida de la función (Avenarius *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2013). Los espermatozoides de ratón carentes (nulos) de la subunidad CatSper δ reducen la expresión de la subunidad α formadora del poro CatSper1, lo que indica que CatSper δ es esencial para la expresión correcta y funcional del complejo CatSper (Chung *et al.*, 2011). Además del hecho de que los espermatozoides de ratones nulos en la subunidad CatSper1 no expresan CatSper2 y viceversa (Babcock, 2007; Qi *et al.*, 2007), así como las subunidades accesorias CatSper β y CatSper γ (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009), indica que para el ensamblaje correcto del canal CatSper se requiere de todas sus subunidades accesorias (Chung *et al.*, 2011). Los espermatozoides de humano con mutaciones en CatSper ϵ presentan una motilidad normal pero no pueden realizar la fecundación in vitro ya que no presentan hiperactivación (Williams *et al.*, 2015; Brown *et al.*, 2018). CatSper ζ solo se ha encontrado en mamíferos sugiriendo que este mecanismo es específico de estos, y los ratones carentes de CatSper ζ se ven afectados en la disposición cuadrilateral del nanodominio de CatSper sin afectar su funcionalidad, (Chung *et al.*, 2017). En 2001 se demostró, tanto mediante experimentos de inmunocitoquímica como de microscopía electrónica, que CatSper se localiza en el flagelo del espermatozoide de ratón (Ren *et al.*, 2001), y en 2014 se mostró mediante STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*, por sus siglas en inglés) y fosfoproteómica, que CatSper se requiere para la formación de cuatro dominios de Ca²⁺ lineales que organizan proteínas de señalización como la calmodulina cinasa II (CaMKII), la fosfatasa 2B-A γ (PP2B-A γ) y la caveolina-1 (marcadora de microdominios de membrana), a lo largo del flagelo tanto en humanos como en ratones (Chung *et al.*, 2014, 2017). El uso de los bloqueadores para CatSper NNC y Mibefradil permitieron evidenciar su actividad en espermatozoides de humano y de ratón (Strünker *et al.*, 2011; Lishko

et al., 2011) y mediante experimentos de *patch-clamp* en espermatozoides de humano, se mostró que 2 μM de NNC bloquea la corriente de CatSper en espermatozoides estimulados con progesterona (Lishko *et al.*, 2011). Además, en espermatozoides de ratón se sabe que en ausencia de CatSper no hay influjo de Ca^{2+} mediado por AMPc (Ren *et al.*, 2001) y que el AMPc regula la actividad de CatSper mediante fosforilación por la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) (Orta *et al.*, 2018).

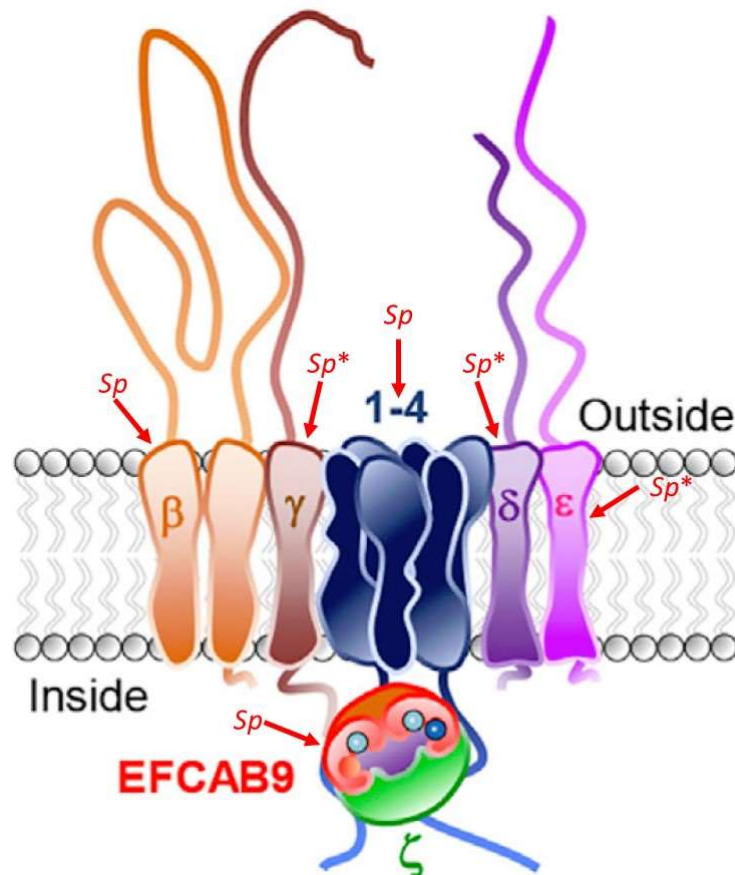


Figura 5. Modelo del canal iónico CatSper. La caricatura ilustra la interacción y la topología predicha de las 10 subunidades del complejo de canales CatSper de mamíferos (Hwang *et al.*, 2019). Las flechas sólidas indican las subunidades detectadas mediante análisis proteómico en espermatozoides de *S. purpuratus* (*Sp*; CatSper1 (XP_011664201.1), CatSper2 (XP_011679404.1), CatSper4 (XP_011682209.1), CatSper β (XP_011679115.1), CatSper δ (XP_011664202.1), CatSper γ (XP_011679048.1; Espinal-Enrriquez *et al.*, 2017), CatSper ϵ (XP_011664202.2 y XP_030855090.1) y EFCAB9 (XP_003728906.1) (C. Beltrán, no publicado). Es importante mencionar que las subunidades *CatSper δ , *CatSper γ y *CatSper ϵ de *S. purpuratus*, carecen de región transmembranal y que, aunque CatSper3 (XP_011666090) está en el genoma de *S. purpuratus*, no se ha detectado por análisis proteómico en eem (Figura modificada de Hwang *et al.*, 2019).

La fosforilación de proteínas

La mayoría de las enzimas, sus rutas metabólicas y de señalización asociadas están reguladas mediante fosforilación reversible. Las proteínas cinasas son enzimas que dependen de ATP que añaden un grupo fosforilo al grupo –OH de una tirosina, serina o treonina (Tyr, Ser o Thr) en alguna proteína. Este proceso se hace reversible mediante una segunda clase de enzimas denominadas fosfatasas que hidrolizan los ésteres de fosfato resultantes de la cadena lateral, liberando P_i . Durante la fosforilación, el grupo terminal fosfato (γ) del ATP se transfiere a residuos de serina o treonina por una clase de cinasas de las familias AGC y CaMK, o a residuos específicos de otro tipo de cinasas de la familia de las PTK. La reacción de fosforilación suele llevarse a cabo en el citoplasma celular, donde el ATP es más abundante. Las fosfatasas revierten el efecto de las cinasas al remover el grupo fosfato unido a la proteína blanco. La frecuencia entre el estado fosforilado y defosforilado dependen de la actividad relativa de las cinasas y las fosfatasas, y no en todos los casos es reversible (Mathews *et al.*, 2014).

-Las proteínas cinasas

Las cinasas eucarióticas comprenden una de las superfamilias más grandes de proteínas y genes homólogos. Dentro de esta superfamilia hay cientos de miembros con secuencias conocidas. Las cinasas conforman más del 1% de todas las proteínas codificadas en el genoma humano; aproximadamente una de cada tres proteínas en células de mamíferos se fosforila (Hanks & Hunter, 1995; Hunter, 1987). Todas las cinasas conservan un motivo en su secuencia que da la evidencia de cómo pueden transferir el grupo fosfato- γ del ATP o GTP a un grupo hidroxilo de una serina, treonina o tirosina de la proteína sustrato. La comparación de la secuencia de aminoácidos en el fragmento catalítico 250-300 de las cinasas se utilizó para organizar estas enzimas en árboles filogenéticos y agruparlos en subfamilias con funciones similares. La actividad catalítica de las cinasas está designada por su dominio cinasa, al cual se le atribuyen tres funciones: i) la orientación y unión del donador del fosfato- γ del ATP o GTP, como un complejo con cationes divalentes generalmente Mg^{2+} o Mn^{2+} ii) la unión y orientación de la

proteína sustrato e iii) la transferencia del fosfato y del ATP o GTP al residuo hidroxilo en la proteína sustrato.

-La cinasa dependiente de AMPc (PKA)

La PKA es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades regulatorias R y dos subunidades catalíticas C, con cuatro tipos diferentes de subunidades R (RI α , RI β , RII α y RII β) y cuatro tipos diferentes de subunidades C (C α , C β , C γ y PrKK) (Taylor *et al.*, 2004; Zimmermann, 1999). Las subunidades regulatorias pueden formar homodímeros o heterodímeros y de esta forma contribuir a la diversidad molecular de la PKA. La holoenzima R₂C₂ es inactiva debido a que la subunidad catalítica inhibe la unión del AMPc al sitio de unión del fosfato en la subunidad regulatoria. El AMPc se une a los sitios A y B, de la subunidad regulatoria. Sólo el sitio B se encuentra expuesto para la unión del AMPc en la holoenzima inactiva, después de la unión del AMPc al sitio B se induce la unión del AMPc al sitio A (Francis *et al.*, 2002). La unión de las cuatro moléculas de AMPc en la holoenzima R₂C₂ inactiva (dos moléculas de AMPc en cada una de las subunidades regulatorias), conduce a un cambio conformacional y la disociación del dímero de la subunidad regulatoria y dos monómeros de la subunidad catalítica, el cual convierte a la PKA en una enzima catalíticamente activa (Francis *et al.*, 2002; Kopperud *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2004). La subunidad catalítica reconoce los residuos de serina o de treonina de las secuencias de aminoácidos, RRXS o RXXT (R es arginina; S, serina; T, treonina y X cualquier aminoácido) de las proteínas. El asa de activación es una de las regiones más dinámicas de la estructura de las cinasas debido a que contiene sitios de fosforilación críticos para su función. Al no haber fosforilación, el asa obtiene una estructura irregular en una conformación no óptima para llevar a cabo la catálisis (Johnson, *et al.*, 1996). La actividad de muchas cinasas se regula por el estado de fosforilación de esta asa de activación. Regularmente la subunidad catalítica de la PKA se encuentra ensamblada como una enzima activa con su asa de activación fosforilada (Shoji, *et al.*, 1979). En el asa de activación de la subunidad catalítica se sabe que existe un mecanismo regulatorio *in vivo* que involucra la fosforilación y la defosforilación de la treonina 197 (Thr-197). La fosforilación es un evento necesario para la maduración y actividad biológica óptima de la PKA (Steinberg *et*

al., 1993). Aunque la subunidad catalítica se fosforila también en la serina 338 y en otras serinas de la PKA, tanto en bacterias como en células de mamífero; estas fosforilaciones no afectan la actividad de la subunidad y tienen sólo efectos menores en la movilidad de la proteína en geles de poliacrilamida desnaturizante (PAGE) (Shoji *et al.*, 1979; Steinberg *et al.*, 1993; Yonemoto, *et al.*, 1993). La Thr-197 se encuentra dentro del subdominio VIII que está asociado con sitios de fosforilación en muchas otras cinasas de la familia AGC incluyendo CDC2K, MAPK, MAPKK y muchas otras cinasas de tirosinas (Hank & Hunter, 1995; Yonemoto *et al.*, 1993). La secuencia de esta región está altamente conservada en las subunidades catalíticas de los mamíferos en las isoformas C α , C β y C γ (Beebe *et al.*, 1990). La vía de PKA dependiente AMPc es importante para la regulación de la motilidad de los espermatozoides de ratón ya que los ratones deficientes en sAC son infértiles, mediante el uso de HCO₃ este entra al espermatozoide y activa a la sAC aumentando los niveles de AMPc (Jaiswal & Conti., 2003; Xie *et al.*, 2006).

-La proteína cinasa C (PKC)

La PKC es una familia de proteínas cinasas del grupo de cinasas AGC activadas principalmente por la hidrólisis de lípidos (fosfatidilserina, DAG) y Ca²⁺ (Nishizuka, 1984). PKC participa en la regulación de la función de otras proteínas mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina (Kennelly & Krebs, 1991). Se identificó por primera vez en cerebros de rata y se definió como una enzima con actividad de cinasa de histonas (Inoue, *et al.*, 1977). Los miembros de la familia de la PKC poseen un polipéptido formado por una región regulatoria en el amino terminal (20-40 kDa) y una región catalítica en el carboxilo terminal (~45 kDa) separados por una bisagra que se proteoliza cuando la PKC se une a la membrana plasmática (Newton, 1993). La PKC se divide en cuatro dominios conservados: C1, C2, C3 y C4 (Coussens *et al.*, 1986). La función de cada uno de estos dominios se estableció por análisis bioquímicos y por mutaciones. El dominio C1 es un motivo rico en cisteínas, duplicado en algunas isoformas, además en este dominio se encuentra el sitio de unión para ésteres de forbol y DAG. Previo al dominio C1 se encuentra una secuencia denominada "pseudosustrato". El dominio C2 contiene el sitio de reconocimiento para los ácidos grasos y el sitio de unión para el Ca²⁺. Los dominios

C3 y C4 forman la región catalítica donde se unen el ATP y el sustrato, respectivamente. La superfamilia de PKCs se divide en tres subfamilias con base en su estructura y formas de regulación: convencionales, nuevas y atípicas (Nishizuka, 1995). Las convencionales: son las que se descubrieron primero y las mejor caracterizadas, comprenden las isoformas α , β I, BII y γ . Esta subfamilia se caracteriza por ser reguladas por DAG y Ca^{2+} . Además, son blanco para ésteres de forbol los cuales activan a la PKC, eliminando el requerimiento de DAG y disminuyendo la concentración de Ca^{2+} necesaria para su activación (Castagna, *et al.*, 1982). Entre las nuevas isoformas están η , ϵ , δ y θ . Estas son estructuralmente similares a las convencionales, excepto que son insensibles al Ca^{2+} porque el dominio C2 aunque mantiene su estructura, no tiene el grupo funcional de unión a Ca^{2+} . Además, siguen siendo sensibles a DAG y ésteres de forbol. Las formas atípicas son las menos estudiadas y comprenden las isoformas λ , ι y ζ . Estas son sensibles a Ca^{2+} y no responden a DAG ni a ésteres de forbol (Ono *et al.*, 1989) ya que no tienen el dominio C2 ni el dominio C1 y solo tienen un motivo rico en cisteínas en vez de dos. En el quimoma de *S. purpuratus* se cuenta con cuatro diferentes genes de PKC los cuales son: β (perteneciente al grupo de las PKCs convencionales), ι (perteneciente al grupo de las PKCs atípicas), δ y ϵ (pertenecientes al grupo de las PKCs nuevas) (Newton *et al.*, 1993; Bradham *et al.* 2006).

El índice quimiotáctico

La quimiotaxis de los espermatozoides se ha estudiado ampliamente en los invertebrados marinos debido a que dependen de respuestas quimiotácticas perdurables en un medio sometido a cambios como lo es el mar (Ralt *et al.*, 1994). El estudio de la quimiotaxis de los espermatozoides se ha abordado en distintos niveles, como el análisis cualitativo de las respuestas de la población o a la evaluación cuantitativa de los parámetros de motilidad del nado de los espermatozoides en respuesta al estímulo (Ramírez-Gómez *et al.*, 2020).

Algunas medidas indirectas de los cambios de natación de los espermatozoides son la curvatura y la asimetría, sin embargo, estas medidas no determinan si la posición

del espermatozoide está a una distancia cercana o lejana del óvulo (Böhmer *et al.*, 2005; Cosson *et al.*, 1984; Fukuda *et al.*, 2004; Guerrero *et al.*, 2010a; Miller, 1982; Shiba *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2002). Para el estudio del comportamiento quimiotáctico del espermatozoide se emplea el ángulo de orientación con respecto a la fuente del quimioatrayente como parámetro de natación, para saber así la orientación del espermatozoide.

En el año 2002 Riffel y su grupo implementaron un vector de longitud media. Este se refiere al desplazamiento que incorpora información sobre los ángulos de orientación y calcula un vector unitario que refleja el comportamiento quimiotáctico, mostrando un valor de 1 cuando hay quimiotaxis y un valor de 0 cuando no la hay. En el mismo año, Yoshida y su grupo propusieron el índice quimiotáctico de la ecuación lineal (LECI) para poder estudiar la respuesta a extractos de gelatina de óvulos de especies de ascidias en la motilidad de los espermatozoides (Yoshida *et al.*, 2002). Esto determina que cuando se aproxima una célula espermática a la fuente del quimioatrayente tendrá un valor positivo, por el contrario, si el espermatozoide se aleja del punto de origen del quimioatrayente mostrará un valor de LECI negativo. Si el valor de LECI fuese 0 significa que no se vio alterado el nado del espermatozoide que continuó nadando en círculos concéntricos en la misma posición. Uno de los problemas con el uso de LECI para cuantificar la quimiotaxis del espermatozoide es que no considera el comportamiento previo a la estimulación del quimioatrayente, y después de llegar a la fuente del quimioatrayente puede presentar un valor de 0 $\mu\text{m/s}$ al no desplazarse progresivamente.

Los métodos previamente establecidos pueden medir las respuestas quimiotácticas robustas del espermatozoide hacia el óvulo, pero es difícil cuantificar las respuestas quimiotácticas marginales, por lo que se debe de emplear otra forma de evaluar la quimiotaxis con mayor precisión. El uso de quimioatrayentes fotoactivados brinda ventajas importantes para estudiar y caracterizar el comportamiento quimiotáctico de espermatozoides individuales. Estos quimioatrayentes modificados se activan con un flash de una longitud de onda determinada, lo cual propicia respuestas quimiotácticas hacia el quimioatrayente. Esto impide la perturbación externa producida por métodos experimentales como el pipeteo o la perfusión del quimioatrayente a la cámara donde se encuentran los espermatozoides. Los espermatozoides de los erizos de mar tienen una respuesta típica de giro y carrera

durante la natación quimiotáctica. Estos espermatozoides muestran un comportamiento tigmotáctico circular de las trayectorias cuando nadan cerca de los límites de un contenedor (Miller, 1985).

Teniendo en cuenta que los diferentes métodos para cuantificar quimiotaxis de espermatozoide en organismos de fecundación externa anteriormente expuestos (Brokaw, 1979; Crenshaw, 1993a, 1993b; Crenshaw & Edelstein-Keshet, 1993c; Miller, 1982; Riffell *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002) no consideran el movimiento de deriva previo al estímulo, el ángulo entre la dirección de deriva, ni la dirección del gradiente al mismo tiempo, se ha propuesto un índice quimiotáctico (CI) que sí incorpore estos parámetros (Ramírez-Gómez *et al.*, 2020).

El CI propuesto elimina el componente circular de una trayectoria común de eem, suavizando la trayectoria original utilizando un filtro de promedio. Para garantizar que sigue la dirección de la trayectoria, se ajusta un modelo lineal a la trayectoria suavizada y la línea correspondiente es forzada a pasar por el punto medio de dicha trayectoria. El CI se define en función del desplazamiento progresivo de los espermatozoides como $CI = (|u|\cos\theta - |v|\cos\Phi) / (|u| + |v|)$, donde Φ y θ son los ángulos de orientación y $|v|$ y $|u|$ la velocidad progresiva antes y después de la fotoactivación del quimioatrayente, respectivamente (Figura 6). El ángulo de orientación se calcula entre el desplazamiento progresivo de los espermatozoides y el vector de referencia (el cual apunta hacia la fuente del quimioatrayente). Los ángulos de orientación pueden tomar valores de 0 a 180, dependiendo del desplazamiento del espermatozoide al quimioatrayente. Para calcular el valor del desplazamiento progresivo, se cambia el sistema de coordenadas de la trayectoria suavizada por el sistema de regresión lineal, cambiando la trayectoria suavizada por un vector a lo largo de la longitud de coordenadas traspuestas, representado por un vector gris y un vector negro antes y después de la fotoactivación del quimioatrayente, respectivamente. La velocidad progresiva se representa como el desplazamiento progresivo del espermatozoide por unidad de tiempo. Para eliminar la posibilidad de calificar un índice quimiotáctico influido por el movimiento de deriva previo al estímulo, se considera el desplazamiento del espermatozoide antes de la activación del quimioatrayente y luego se resta de la respuesta quimiotáctica del espermatozoide posterior al estímulo. Para casos donde el espermatozoide nada en círculos concéntricos con poco movimiento de deriva, el desplazamiento

progresivo del espermatozoide antes de la activación del quimioatrayente no brinda contribución alguna al CI. Sin embargo, influirá considerablemente al valor del CI si el movimiento de deriva previo al estímulo es grande según la respuesta quimiotáctica. Para medir la respuesta quimiotáctica se utilizan valores que van de -1 a 1, representando el valor 0 la nula respuesta quimiotáctica (Ramírez-Gómez *et al.*, 2020).

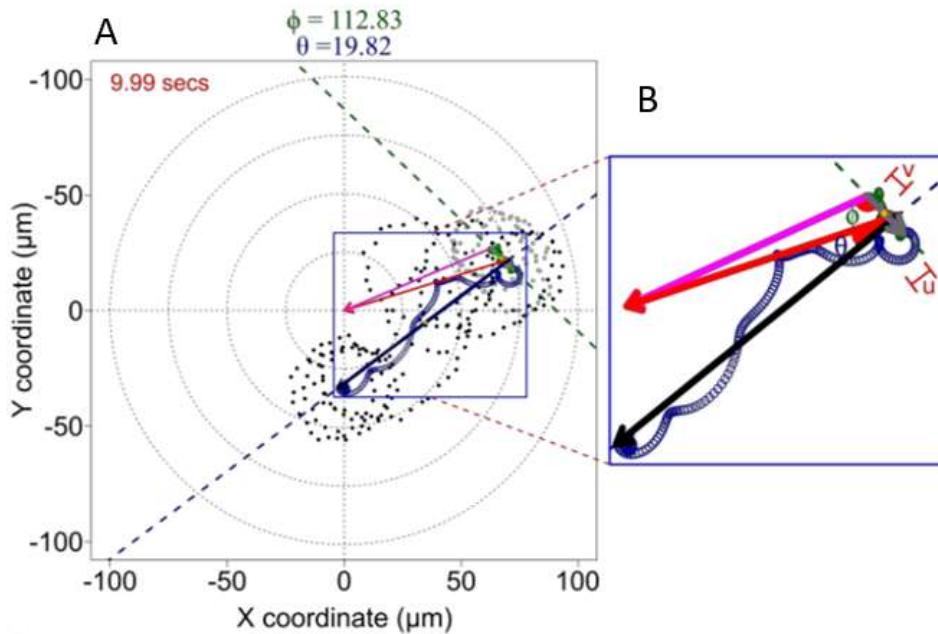


Figura 6. Índice quimiotáctico. (A) Gráfica general de una trayectoria de espermatozoide de erizo de mar quimiotácticamente positivo de un video de 9.99 segundos. (B) Ampliación de los elementos medidos mediante el índice quimiotáctico. Los puntos grises y negros representan las trayectorias del espermatozoide antes y después de la fotoactivación del quimioatrayente, respectivamente. Las espirales en verde y azul indican el suavizado de la trayectoria del espermatozoide antes y después de la fotoactivación, respectivamente. Los vectores en gris (u) y negro (v) indican el desplazamiento progresivo del espermatozoide antes y después de la fotoactivación del quimioatrayente, respectivamente. Los vectores de referencia son representados mediante un color rojo (θ) o magenta (Φ) y apuntando hacia la fuente del quimioatrayente. Los puntos morados representan la trayectoria durante el disparo de luz UV de 200 ms (Modificado de Ramírez-Gómez *et al.*, 2020)

ANTECEDENTES

Está descrito que la motilidad de los espermatozoides de erizo de mar de *S. purpuratus* se regula por AMPc, PKA y la $[Ca^{+2}]_i$ (Tash & Means, 1983; Loza-Huerta *et al.*, 2013b; Darszon *et al.*, 2008) y que la sAC participa de manera importante en dicho proceso (Loza-Huerta, 2007; Loza-Huerta *et al.*, 2013a y 2013b; Vacquier *et*

al., 2014). Además, tanto la motilidad como la respuesta al speract, cambian el patrón de fosforilación por PKA y por PKC de proteínas de solubilizados totales de eem separadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (PAGE) (Bracho, & Tash, 1998; White & Gagnon 2007; Loza-Huerta *et al.* 2013a).

Como mencionamos inicialmente, CatSper es un canal catiónico de Ca^{2+} específico del espermatozoide que se activa por cambios en el pH_i , por despolarización de la membrana y por AMPc (Hwang, *et al.*, 2019) y que los ratones machos carentes de CatSper y hombres con mutaciones en seis de los diez genes de CatSper, son infértiles. Dado que tanto en mamíferos (Hwang *et al.*, 2019) como en erizo de mar (Espinal-Enríquez, *et al.*, 2017) CatSper es el principal responsable de los aumentos de Ca^{2+} citosólicos indispensables para las funciones necesarias para la fecundación, se ha propuesto como un blanco excelente para generar un anticonceptivo masculino, ya que cerca del 15% de los fármacos actúan sobre canales iónicos (García & Kaczorowski, 2016; Wang *et al.*, 2020).

Mediante experimentos de inmunofluorescencia con un anticuerpo generado contra la secuencia predicha de la subunidad CatSper1 (XP_011664201.1) de *S. purpuratus*, en nuestro grupo se demostró que, al igual que en espermatozoides de erizo de mar *A. punctulata* (Seifert, *et al.*, 2015) como en mamífero (Ren *et al.*, 2001), CatSper se expresa en el flagelo del espermatozoide de *S. purpuratus* (Velázquez-Pérez, *et al.*, 2016). Además, el análisis proteómico de una fracción enriquecida en proteínas integrales de membrana obtenida a partir de la solubilización de flagelos de eem de *S. purpuratus* con Triton X-114, reveló la presencia de 6 subunidades (CatSper 1, 2, 4, β , δ , y γ) (Espinal-Enríquez *et al.*, 2017) (Figura 5). En la misma especie, recientemente se identificaron también mediante análisis proteómico de microdominios de membrana de eem, a 2 isoformas de la subunidad ϵ (XP_011664202.2 y XP_030855090.1) y a EFCAB9 (XP_003728906.1) (C. Beltran, no publicado). Es importante mencionar que el genoma de *S. purpuratus*, además contiene a CatSper3 (XP_011666090). Lo anterior indica que en *S. purpuratus* están al menos nueve de los diez genes que codifican para CatSper en mamíferos (Figura 5). El uso de los bloqueadores de CatSper, Mibefradil y NNC en experimentos en poblaciones de eem marcados con un indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4AM), y estimulados con speract (Espinal-Enríquez, *et al.*, 2017) o con 10 mM de NH_4Cl (Loyo-Celis, *et al.*, 2021), permitió

mostrar que CatSper participa en la vía de señalización disparada por el speract. Los dos bloqueadores de CatSper mencionados (Mibefradil y NNC) también inhiben la acumulación de los eem de *L. pictus* y de *S. purpuratus* en respuesta a la activación de speract fotoactivado (Velázquez-Pérez, *et al.*, 2016). Lo anterior corrobora lo observado en *A. punctulata*, donde utilizaron 10 μ M del bloqueador de CatSper, MDL12330A (Seifert, *et al.*, 2015). Aunque en ambos trabajos se propuso que CatSper está involucrado en la quimiotaxis, los resultados de esos experimentos no son suficientes para afirmar que CatSper participa en la quimiotaxis de los espermatozoides, ya que en ambos casos solo miden acumulación y no quimiotaxis (Ramírez-Gómez, *et al.*, 2020).

Con los antecedentes mencionados, además del hecho de que en espermatozoides de ratón PKA modula la actividad de CatSper (Orta *et al.*, 2018), en este proyecto, nos propusimos determinar si CatSper participa en la quimiotaxis y si la fosforilación mediada por la cinasa dependiente de AMPc afecta dicho proceso. Utilizamos eem, -el modelo por excelencia para el entendimiento de la quimiotaxis de espermatozoides- de *S. purpuratus* y/o de *L. pictus*, debido a que son las especies mejor caracterizadas y a que sus etapas de maduración no se sobreponen a lo largo del año. Se utilizó speract fotoactivable (inactivo) para evitar causar perturbaciones en el medio y así evitar afectar el movimiento (y la quimiotaxis) por la adición de este con una pipeta en la cámara durante los registros.

JUSTIFICACIÓN

Investigar sobre la participación de CatSper y de la cinasa dependiente de AMPc (PKA) en la quimiotaxis puede brindar información que nos permita avanzar en el entendimiento de los estímulos, entidades moleculares y su correspondiente correlación en la fecundación.

HIPÓTESIS

CatSper y PKA afectan la quimiotaxis de los espermatozoides de erizo de mar.

OBJETIVOS

- **Objetivo general:**

Determinar si la inhibición de CatSper, de PKA, de PKC y de la sAC, afectan la quimiotaxis del espermatozoide de erizo de mar.

- **Objetivos específicos:**

1. Hacer un análisis *in silico* de los sitios probables de fosforilación por PKA y por PKC en el complejo CatSper.
2. Determinar en la quimiotaxis de los eem:
 - El efecto del bloqueador de CatSper HC-056456.
 - La participación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA).
 - La participación de la proteína cinasa modulada por DAG (PKC).
3. Determinar la participación de la sAC en la quimiotaxis de los eem.
4. Determinar el aumento de la concentración de AMPc intracelular mediante el inhibidor de FDEs, IBMX.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis *in silico* para la predicción de los sitios de fosforilación por PKA y PKC

Se realizó una búsqueda de las secuencias de todas las subunidades que conforman a CatSper, tanto en erizo de mar (*S. purpuratus*) como en ratón (*M. musculus*) y humano (*H. sapiens*). Para ésto se consultaron las bases de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) y BLAST de proteínas (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Una vez obtenidas las secuencias de cada una de las secuencias que conforman a CatSper de humano, ratón y erizo de mar en

formato FASTA, se realizó un alineamiento mediante el programa *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para determinar qué tan diferentes eran. Para analizar los sitios probables de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades del complejo CatSper del genoma de *S. purpuratus* y de *M. musculus* utilizamos la versión 3.1 del servidor NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

Obtención de espermatozoides de erizo de mar

Los espermatozoides de erizo de mar (eem) se obtienen de las especies *L. pictus* (Obtenidos de *South Coast Bio-Marine LLC* en California, USA <https://scbiomarine.com>) y *S. purpuratus* (Javier García Pámares. Ensenada, Baja California, México). Los erizos se mantienen en agua de mar artificial (AMA) compuesta por, en mM: NaCl 485, CaCl₂ 10, KCl 10, MgSO₄ 30, NaHCO₃ 2.5, MgCl₂ 26, HEPES 10 y EDTA 0.1 a ~1000 mOsm y pH 8) a una temperatura de 14-15 °C. Los erizos se inyectaron en la región intracelómica con 0.1-1 ml de KCl 0.5 M para obtener los gametos, los cuales se colectaron con una pipeta Pasteur y se almacenan en tubos Eppendorf en un termo con hielo a 4 °C durante 2-3 días. A estos espermatozoides se les denomina “secos” (Figura 7).

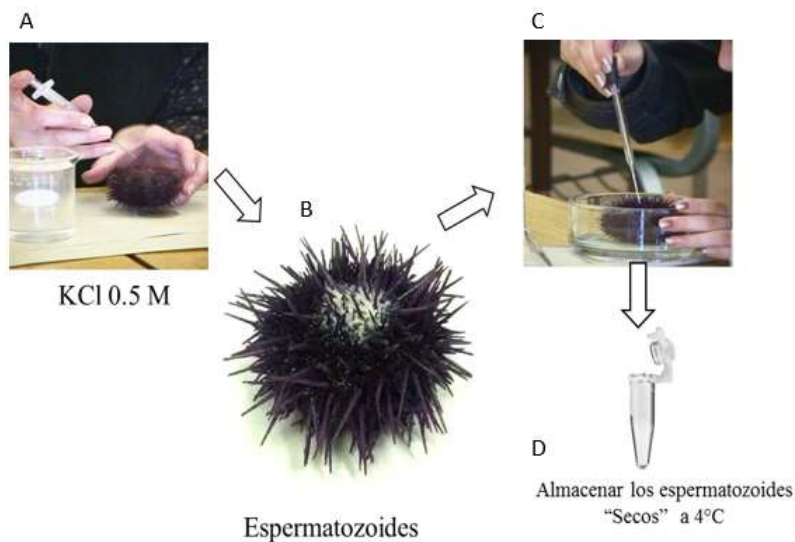


Figura 7. Obtención de gametos. Los erizos son inyectados con KCl 0.5 M en la región intracelómica (A). Posteriormente los erizos liberan sus gametos en el gonoporo (B) de donde son

recolectados por medio de una pipeta Pasteur (C) y almacenados en refrigeración (D). Modificado de Galindo, 2000.

Experimentos de quimiotaxis

Para los experimentos de quimiotaxis los espermatozoides “secos” se tocan con una punta para micropipeta (2-200 μ l), y se transfieren a 500 μ l de Agua de Mar Artificial en que contiene speract fotoactivable 100 nM a pH 7.2 para *L. pictus* y pH 7.8 para *S. purpuratus* en la cámara de registro. Al AMA se le agregan 10 μ M del bloqueador del canal CatSper HC-056456 (Cat. No.531948 *Medkoo Bioscience*), o los inhibidores de PKA (PKI 10 μ M; Cat. No. 2546 *Tocris*), de PKC (Quelerritrina 2.5 μ M; Cat. No. C-400 *Alomone*), de FDEs, (IBMX 150 μ M; Cat. No. I-5879 *Sigma-Aldrich*), de la sAC, (KH7 1 μ M; Cat. No. K3394 *Sigma-Aldrich*), o Dimetilsulfóxido (DMSO Cat. No. D2650 *Sigma-Aldrich*) en volúmenes equivalentes del disolvente de HC e IBMX 10 y 150 μ M respectivamente. Como controles negativos se emplearon AMA, AMA0Ca (AMA al cual no se le adiciona CaCl_2 , para inhibir la quimiotaxis) y AMA40K (AMA conteniendo 40 mM de KCl que despolariza la célula e inhibe la cascada de señalización que dispara el speract) al pH correspondiente según la especie. Se dejaron incubar los espermatozoides en la cámara durante 5 minutos a 14°C antes de comenzar con el registro. Para el registro se utilizaron cubreobjetos redondos (25 mm de diámetro; marca VWR) pretratados con poli-HEMA (Cat. No. P3932 *Sigma-Aldrich*) a una concentración de 1 mg/ml disuelta en etanol al 95%. Dichos cubreobjetos se colocaron en cámaras de registro circulares para microscopio. Para eliminar el exceso de poli-HEMA, partículas de polvo y evitar que los espermatozoides se peguen al vidrio, la cámara circular se enjuagó con 500 μ l agua destilada tres a cuatro veces y se realizó un lavado final con AMA, AMA0Ca o AMA40K, dependiendo de la condición experimental. La cámara de registro se posicionó en la platina de un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse TE 300. Para enfocar los espermatozoides se utilizó el objetivo de 40X y se tomaron imágenes con la cámara AndoriXon con el programa Andor iQ2. Para activar el speract enjaulado se utilizó un disparador (*Kinetic trigger device, Kinetic Imaging*) y una lámpara de UV (UVICO-UV *Rapp Optoelectronic*) conectados al microscopio mediante una fibra óptica de 2,000 μ m de diámetro (F2000 plateada). Se usa la

misma fibra en ambas especies de erizo de mar. Esta fibra se alineó en el área del centro de la imagen para generar la fuente del quimioatrayente en el centro del campo (Guerrero *et al.*, 2010b; Ramírez-Gómez *et al.*, 2020) (Figura 8).

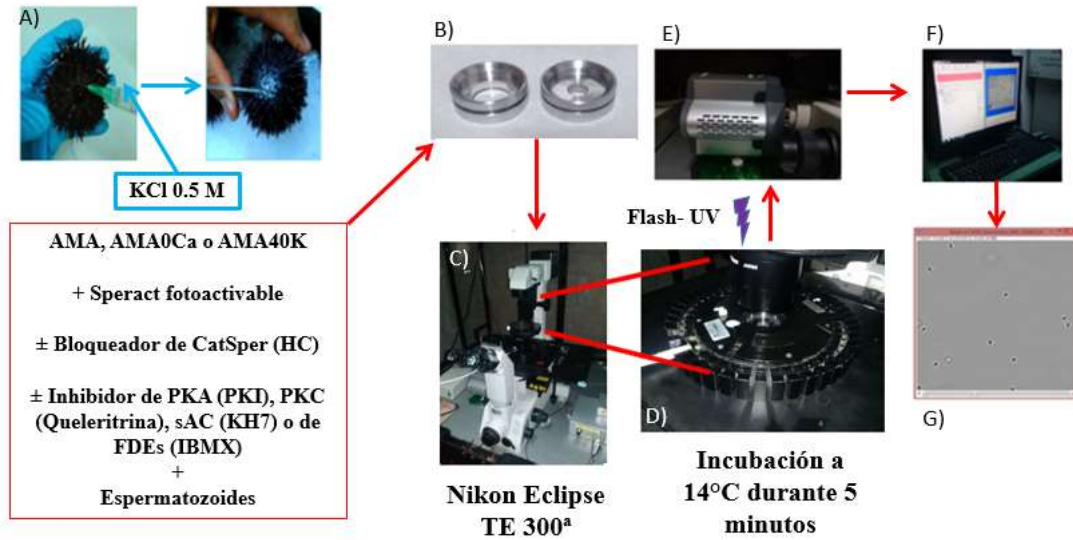


Figura 8. Estrategia experimental para la determinación de quimiotaxis en eem. Los espermatozoides “secos” colectados de erizo de mar (A), se depositan en una cámara de registro (B) en Agua de Mar Artificial (AMA), sin Ca^{2+} (AMA0Ca) o conteniendo 40 mM de KCl (AMA40K). Para la condición experimental se utilizó AMA en presencia o ausencia del bloqueador de CatSper HC-056456 o de inhibidores de las cinasas PKA (PKI) y PKC (Quelerritrina), inhibidor de la sAC (KH7) o inhibidor de las FDEs (IBMX) con speract fotoactivable 100 nM. La cámara de registro (B) se coloca en un microscopio Nikon Eclipse TE 300 (C) sobre un regulador de temperatura a 14°C dejando incubar durante 5 minutos (D), donde se registra el nado de los espermatozoides antes y después del flash de luz UV mediante una cámara Andor iQ2 (E) que envía las imágenes captadas a una computadora mediante el programa Andor iQ2 (F) que genera un video de 15 segundos compuesto de 430 imágenes para hacer posteriormente, un análisis de trayectorias (G).

Protocolo de captura de imágenes

Se utilizó el programa Andor iQ2 para crear los protocolos y obtener archivos de video (.tif) para el análisis de las trayectorias. El protocolo se programó para grabar un video de 15 segundos dividido en 430 imágenes, donde los primeros 5 segundos son el control de nado sin estímulo, y del segundo ~5 al 5.2 la irradiación con luz UV que fotoactiva el speract enjaulado. Los 10 segundos restantes se utilizan para ver la respuesta de los espermatozoides al speract fotoactivado.

Análisis de trayectorias de espermatozoides de erizo de mar

Mediante el programa *ImageJ* se analizan los videos obtenidos del programa Andor iQ2 restándoles la fracción inmóvil mediante un algoritmo que calcula una proyección de intensidad media de los 15 segundos que dura el video. Mediante el *plugin* MTrackJ se rastrearon las trayectorias de cada uno de los espermatozoides y generaron archivos de Excel (.xls). Se utilizó el lenguaje de programación R para realizar análisis estadísticos, en el cual se generó un código (*script*) que genera un archivo de texto (.txt) con una lista de los valores de los índices quimiotácticos obtenidos de cada una de las diferentes condiciones (diferentes concentraciones de speract y control negativo). Si el valor del CI generado era $CI > 0$ la trayectoria analizada era quimiotácticamente positiva, si el $CI = 0$ se considera que es nula y si $CI < 0$ presentaba una respuesta quimiotáctica negativa (Figura 9).

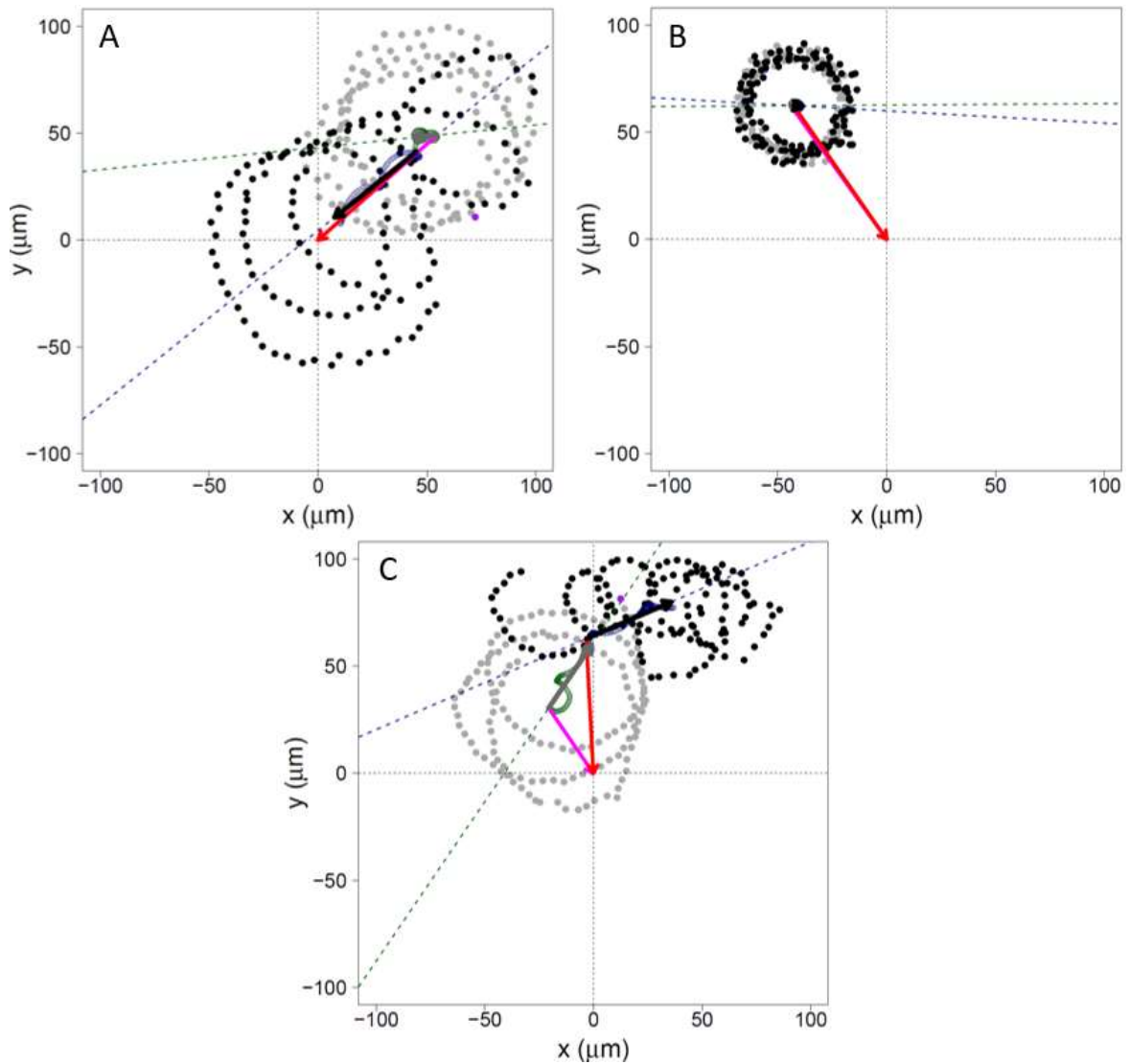


Figura 9. Ejemplos de los movimientos de los espermatozoides experimentando quimiotaxis positiva (A), nula (B) y negativa (C). El experimento se realizó con una concentración de 100 nM de speract. Los puntos grises y negros representan las trayectorias del espermatozoide antes y después de la fotoactivación del quimioatractivo, respectivamente. Las espirales en verde y azul indican la trayectoria del espermatozoide antes y después de la fotoactivación, respectivamente. Los vectores en gris y negro indican el desplazamiento progresivo del espermatozoide antes y después de la fotoactivación del quimioatractivo, respectivamente. Los vectores de referencia son representados mediante un color magenta o rojo y apuntando hacia la fuente del quimioatractivo. Los puntos morados representan la trayectoria durante el disparo de luz UV de 200 ms.

Análisis estadístico de las respuestas quimiotácticas de los eem

Posteriormente con el mismo *script* se realizó una prueba de normalidad (*Shapiro test*) sobre la distribución de los índices quimiotácticos de cada condición para determinar qué tipo de análisis estadístico se debía realizar en cada población. Al

no tratarse de una distribución normal ($p>0.05$) se realizó un análisis estadístico no paramétrico (*Wilcoxon-test*) ($p<0.05$). El valor de p entre la comparación de dos distribuciones determinó si estas poseen o no diferencia significativa siendo $p<0.05$ significativamente diferente y $p>0.05$ sin diferencia significativa. Una vez determinados los valores mediante la comparación de poblaciones de cada condición, el *script* generó una gráfica de cajas de cada una de ellas (Figura 10).

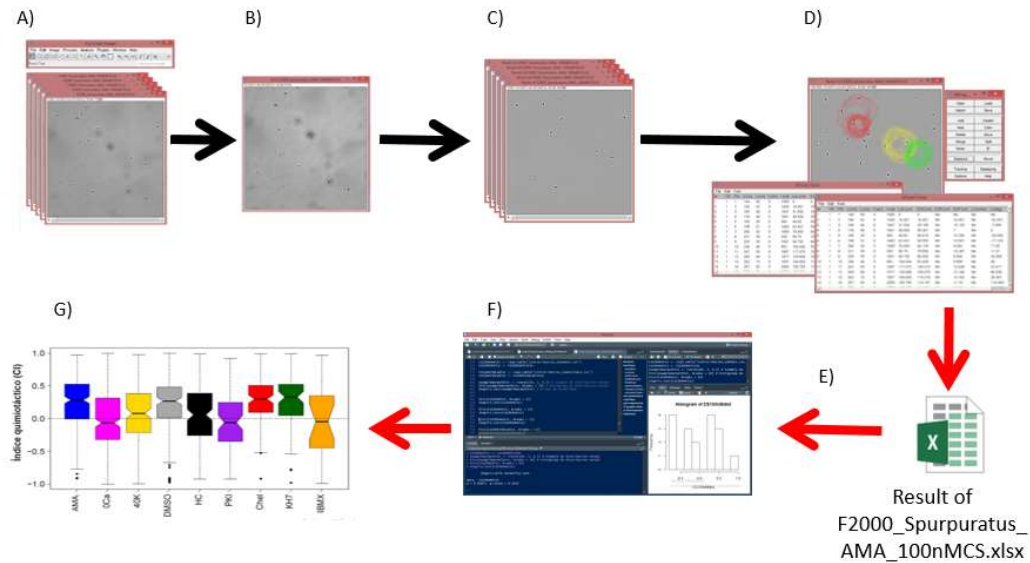


Figura 10. Análisis de trayectorias y estadístico de los eem. El análisis de trayectorias de espermatozoides con el programa *ImageJ* está representado en los paneles de A-D. La sección con una flecha roja (a partir del panel E) representa el análisis estadístico en el lenguaje de programación R. La transición para generar el archivo al que se restó la fracción inmóvil se representa del panel A al panel C, la transición del panel D al E muestra el análisis de trayectorias que genera el archivo de Excel con las coordenadas de cada espermatozoide rastreado. La transición del panel E al F muestra la lectura del archivo generado de Excel con el lenguaje de programación R, a partir del cual se realiza el análisis estadístico y que genera una gráfica de cajas. En el panel G en base a los valores del índice quimiotáctico obtenidos por condición experimental.

RESULTADOS

Análisis *in silico* de los sitios de fosforilación por PKA y por PKC en CatSper de *S. purpuratus* y *M. musculus*

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si CatSper participa en la quimiotaxis del espermatozoide de erizo de mar. Aunque está reportado que en

espermatozoides de ratón la actividad de CatSper se regula por PKA (Orta *et al.*, 2018), es posible que en erizo de mar no sea así.

Se sabe que existen diferencias en las propiedades de CatSper de ratón y de humano y que en el genoma de *S. purpuratus* las subunidades ϵ y ζ del canal, están ausentes. Debido a lo anterior, decidimos hacer un alineamiento con las secuencias del canal de erizo de mar (*S. purpuratus*), de ratón y de humano utilizando el programa *Clustal Omega*. Las tablas SI-SX muestran que las secuencias de las subunidades de CatSper de *S. purpuratus* son diferentes a las de ratón y de humano, lo cual sugiere que su regulación por fosforilación podría ser diferente. Utilizando la versión 3.1 del servidor *NetPhos*, analizamos los sitios probables de fosforilación por PKA, PKC y por otra cinasa (PKB) en las subunidades del complejo CatSper del genoma de *S. purpuratus* y de *M. musculus* de los cuales se seleccionaron solo aquellos que tuvieran un puntaje ≥ 0.8 donde el máximo es de 1 (Tabla I). En la sección de material suplementario se muestran las tablas con el total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC (con una probabilidad de ser fosforiladas ≥ 0.5) en las subunidades de CatSper de *M. musculus* (Tablas SXI-SXII), de *S. purpuratus* (Tablas SXIII-SXIIIc) y las tablas correspondientes con el resumen donde se muestra solo el número de sitios que fosforilan las enzimas PKA y PKC en las dos especies (*M. musculus*, Tabla SXII y *S. purpuratus*, Tabla SXIV). Dado que las cinasas solo fosforilan los sitios accesibles en las proteínas, también se muestran las tablas con los sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC de las subunidades de CatSper, donde se excluyen las regiones transmembranales (*S. purpuratus* Tabla SXV-SXVd y *M. musculus*, Tabla SVII-SVIIg) así como aquellas con los resúmenes correspondientes (*S. purpuratus*, Tabla SXVI y *M. musculus*, Tabla SXVIII). Es interesante que, aunque CatSper de ratón posee 43 sitios predichos de fosforilación por PKC y solo 8 por PKA (Tabla I), es ésta última enzima la que participa en la regulación de CatSper (Orta *et al.*, 2018). De manera similar, el canal de *S. purpuratus* también posee más sitios predichos probables de fosforilarse por PKC (25 sitios) que por PKA (solo 7) (Tabla I).

Tabla I. Comparación de sitios predichos (probabilidad ≥ 0.8) de fosforilación por PKA, PKC y otras cinasas en las subunidades de CatSper de *M. musculus* (mCatSper, en letras rojas) y *S. purpuratus* (SpCatSper, en letras negras) excluyendo las regiones transmembranales

Subunidad	No. Identificación	No. sitios de fosforilación		
		Por PKA	Por PKC	Otras cinasas
mCatSper1	NP_647462.1	0	7	0
SpCatSper1	XP_011664201	0	0	0
mCatSper2	A2ARP9.2	2	1	0
SpCatSper2	XP_011679404.1	2	2	0
mCatSper3	NP_001239416.1	1	2	0
SpCatSper3	XP_011666090	0	0	0
mCatSper4	NP_808534.1	0	1	0
SpCatSper4	XP_011682209.1	1	1	0
mCatSper β	NP_766611.2	1	4	PKB
SpCatSper β	XP_011679115.1	1	6	0
mCatSper γ	XP_006540153.1	1	8	0
SpCatSper γ	XP_011679048.1	0	5	0
mCatSper δ	NP_780559.2	0	5	0
SpCatSper δ	XP_011683737.1	1	3	0
mCatSper ϵ	NP_780559.2	1	10	0
SpCatsper ϵ	XP_011664202.2	1	5	0
SpCatsper ϵ	XP_003728906.1	0	3	0
mCatSper ζ	NP_001034583.1	2	3	PKB
Ausente	—————	0	0	0
mEFCAB9	NP_081307.2	0	2	0
SpEFCAB9	XP_003728906.1	1	0	0
Total de sitios de fosforilación en <i>M. musculus</i>		8	43	2
Total de sitios de fosforilación en <i>S. purpuratus</i>		7	25	0

Subunidad de *M. musculus*; subunidad de *S. purpuratus*; No aplica (NA)
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides a diferentes concentraciones de speract

Se realizaron experimentos de quimiotaxis con los espermatozoides de erizos *S. purpuratus* (Spur) y de *L. pictus* (Lpictus) (Tabla II) de los cuales se analizaron 126

trayectorias en 50 videos. Estos experimentos se hicieron usando agua de mar artificial (AMA) conteniendo diferentes concentraciones de speract fotoactivable (10, 100 y 1000 nM). En la Tabla II mayor porcentaje de espermatozoides que presentaron quimiotaxis (CI>0) en *S. purpuratus* fue de 31% en espermatozoides en el control negativo en ausencia de Ca²⁺ (AMA0Ca) con speract 10 nM. En los espermatozoides de *L. pictus* a una concentración de speract de 1000 nM en AMA solo el 15% de los espermatozoides experimentó quimiotaxis, en cambio los espermatozoides tratados con 100 nM de speract en el mismo medio presentaron una respuesta quimiotáctica del 55%. Los valores de quimiotaxis de *S. purpuratus*, son comparables a los obtenidos en AMA0Ca en ambas especies. Cabe aclarar que las fechas en las cuales realizamos los experimentos (abril-mayo, ver Tabla SXVII) corresponden al final de la temporada reproductiva de *S. purpuratus* e inicio de la de *L. pictus* (en las cuales ni los erizos ni sus espermatozoides están en las mejores condiciones), contribuyeron a que no se observara quimiotaxis después de desenjaular el speract. Una complicación adicional fue que el cubo de emisión que tenía el microscopio usado para los experimentos sólo permitía el paso de un 20% del flash de luz UV. Sin embargo, estos experimentos ayudaron a establecer las condiciones para los experimentos subsecuentes en *L. pictus*, donde se empleó una concentración de 100 nM de speract.

Tabla II. Experimentos de quimiotaxis con diferentes concentraciones de speract

Experimento (pH)	[Speract] nM	N	n	Quimiotaxis		Normalidad p-value	Wilcoxon
				CI>0	% CI>0		
Spur (7.8)	10	24	19	4	21	No	n.s.
	100		17	1	5.8	No	n.s.
	1000		23	6	26	No	n.s.
	10 (AMA0Ca)		16	5	31.2	No	n.s.
Lpictus (7.4)	10	26	7	3	42.8	No	n.s.
	100		9	5	55.5	No	n.s.
	1000		20	3	15	No	n.s.
	10 (AMA0Ca)		15	3	20	No	n.s.

N: número de videos analizados; n: número de trayectorias analizadas; CI: índice de quimiotaxis; CI>0: número de espermatozoides con respuesta quimiotáctica positiva; %CI>0: % de espermatozoides con respuesta quimiotáctica positiva; p-value >0.05: determina que "No" hay una distribución normal. La prueba de Wilcoxon muestra que no hay diferencia significativa (n.s., p-value>0.05) entre las diferentes concentraciones de speract.

CatSper participa en la quimiotaxis

Como se mencionó previamente, hay evidencias que sugieren la participación de CatSper en la quimiotaxis de espermatozoides de erizo de mar. En *A. punctulata* se demostró que el bloqueador de CatSper MDL12330A, inhibe el aumento de Ca^{2+} inducido por GMPc (similar a lo que se observa cuando el speract se une a su receptor; Figura 4) y por alcalinización con 30 mM de NH_4Cl , así como la acumulación de los espermatozoides hacia el péptido quimioatrayente resact (Seifert *et al.*, 2015). De manera similar se demostró, en espermatozoides de *S. purpuratus*, que los bloqueadores de CatSper, NNC-55-0396 y Mibefradil, también inhiben tanto el aumento de Ca^{2+} inducido por el péptido quimioatrayente speract, como la acumulación de los espermatozoides, tanto en *S. purpuratus* como en *L. pictus* (Velázquez-Pérez *et al.*, 2016). Sin embargo, en ninguno de los trabajos mencionados se calculó el índice quimiotáctico (CI) que determina con certeza si la acumulación de los espermatozoides hacia una fuente de quimioatrayente, es o no quimiotaxis. En este trabajo, utilizamos el bloqueador de CatSper HC-056456 (HC) 10 μM , el cual inhibe la corriente de Ca^{2+} registrada en experimentos de *patch clamp*, el aumento de Ca^{2+} inducido por la despolarización debida a KCl y la hiperactivación en los espermatozoides de ratón (Carlson *et al.*, 2009). La Figura 11 muestra la quimiotaxis de espermatozoides de *L. pictus* en AMA (control positivo), y que tanto en ausencia de Ca^{2+} como en presencia de 40 Mm de KCl (controles negativos) y del bloqueador HC, se inhibe su quimiotaxis. Estos resultados confirman la participación de CatSper en la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de erizo de mar como se había propuesto anteriormente (Seifert *et al.*, 2015; Velázquez-Pérez *et al.*, 2016).

PKA participa en la respuesta quimiotáctica

Como se mencionó arriba, de acuerdo con los programas predictores de fosforilación, CatSper tiene más sitios de fosforilación por PKC que por PKA (Tabla I). Sin embargo, la Figura 11 muestra que el inhibidor de la PKC (Quelerritrina 2.5 μM), no afectó la quimiotaxis de los eem, en tanto que el inhibidor de PKA (10 μM

de PKI), sí inhibió la quimiotaxis de manera significativa. Lo anterior sugiere que la PKA participa en la quimiotaxis de espermatozoides de erizo de mar como se reportó para los espermatozoides de ratón (Orta *et al.*, 2018).

La participación de AMPc en la quimiotaxis

Como ya mencionamos anteriormente, la quimiotaxis depende de Ca^{2+} y la despolarización de los espermatozoides con KCl 40 Mm, inhibe la cascada de señalización que dispara la unión del speract a su receptor en el flagelo de los espermatozoides. Además, se sabe que en los eem el 94% del AMPc es producido por la sAC y que el blanco principal del AMPc es la PKA (Vacquier *et al.*, 2014). Con la idea de evaluar la participación de la sAC en la quimiotaxis de los eem, se evaluó el efecto de KH7 (el mejor inhibidor de la sAC) a una concentración de 1 μ M (que no afecta el nado de eem (Vacquier *et al.*, 2014)). La Figura 11 muestra que la sAC no participa en la quimiotaxis. Como existe la posibilidad de que el AMPc provenga de las Actm, responsables de ~ 6% de la producción de AMPc en los eem (Vacquier *et al.*, 2014), se aumentaron los niveles del nucleótido (AMPc) en los eem mediante el uso de un inhibidor de FDEs (IBMX). Sin embargo, lo anterior no fue posible debido a que en el 90% de los casos, el IBMX 150 μ M (Beltrán *et al.*, 2007a), incremento en el diámetro del patrón de nado circular de los eem antes de la fotoactivación del speract modificado. Lo anterior, provocó que las trayectorias rastreadas salieran del campo visual imposibilitando su rastreo y la determinación de la quimiotaxis en presencia de IBMX y por tanto el efecto del aumento de AMPc en la quimiotaxis.

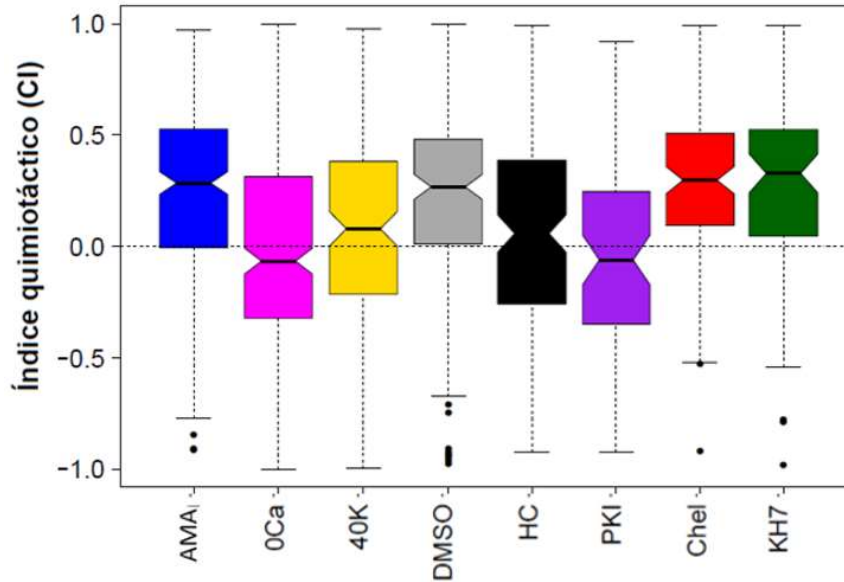


Figura 11. CatSper y PKA participan en la quimiotaxis de los eem. Se determinó la quimiotaxis de los espermatozoides como se describe en la sección de Materiales y Métodos. La gráfica de cajas muestra valores del Índice quimiotáctico (CI, por sus siglas en inglés, siendo $CI > 0$ quimiotaxis positiva) de los espermatozoides preincubados (5 min a 14 °C) en las diferentes condiciones: Agua de mar artificial (AMA; Completa), AMA0Ca (0Ca), AMA40K (40K), dimetilsulfóxido (DMSO al 0.15%, diluyente de HC, Quelerritrina, KH7 e IBMX), Quelerritrina (Chel) 2.5 μM , HC 10 μM , KH7 1 μM , y PKI 10 μM . Las cajas de la gráfica están divididas por el valor de la mediana, las líneas punteadas arriba y debajo de cada caja representa el margen de la distribución de los valores y las muescas de cada caja es la diferencia entre cada población. Si las muescas de cada población coinciden unas con otras significa que no hay diferencia significativa. El número de trayectorias analizadas y el de erizos utilizados para cada condición, así como la prueba de *Wilcoxon* que muestra las diferencias significativas entre las diferentes condiciones se encuentran en la Tabla III.

Tabla III. Análisis estadístico entre poblaciones representativas de las condiciones experimentales

Medio	N	n	Normalidad	Diferencia entre poblaciones mediante prueba Wilcoxon								
				AMA	AMA0Ca	AMA40K	DMSO	HC	PKI	Chel	KH7	IBMX
AMA	14	271	F	1	***	***	n.s.	***	***	n.s.	n.s.	*
AMA0Ca	14	296	F	***	1	*	***	n.s.	n.s.	***	***	n.s.
AMA40K	14	147	V	***	*	1	**	n.s.	*	***	**	n.s.
DMSO	6	176	F	n.s.	***	**	1	***	***	n.s.	n.s.	*
HC	3	146	V	***	n.s.	n.s.	***	1	n.s.	***	***	n.s.
PKI	3	70	V	***	n.s.	*	***	n.s.	1	***	***	n.s.
Chel	3	113	F	n.s.	***	***	n.s.	***	***	1	n.s.	**
KH7	3	75	F	n.s.	***	**	n.s.	***	***	n.s.	1	*
IBMX	2	23	V	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	**	*	1

N: número de erizos; n: número de trayectorias (ver pie de Figura 9); V: ($p\text{-value} < 0.05$) si la prueba de *Shapiro-test* tiene distribución normal y F, si no es normal. Se realizó estadística no paramétrica para determinar la diferencia entre poblaciones. "n.s." representa una diferencia no significativa ($p\text{-value} > 0.05$) y 1 si las poblaciones son idénticas; * $p\text{-value} < 0.05$; ** $p\text{-value} < 0.01$; *** $p\text{-value} < 0.001$. Ver Tabla SXVIII para consultar los valores de $p\text{-value}$.

DISCUSIÓN

Como se mencionó, CatSper es un canal de Ca^{2+} que en mamíferos se regula por pH alcalino, por despolarización, por AMPc y por Ca^{2+} , cuya ausencia causa infertilidad (Ren *et al.*, 2001; Carlson *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2019). Como en mamíferos, CatSper se expresa en el flagelo de espermatozoides de erizo de mar, lo cual se ha demostrado mediante experimentos de inmunofluorescencia y por análisis proteómico (Seifert *et al.*, 2015; Velázquez-Pérez *et al.*, 2016; Espinal-Enriquez *et al.*, 2017). Aunque existe evidencia que sugiere que CatSper participa en la quimiotaxis de eem de *A. punctulata* (Seifert *et al.*, 2015) y de *L. pictus* y de *S. purpuratus* (Velázquez-Pérez *et al.*, 2016), en esos trabajos, lo único que se determinó fue una acumulación de los espermatozoides hacia la fuente del quimioatrayente. Cabe hacer notar que recientemente se demostró (opuesto a lo reportado con anterioridad por Guerrero *et al.*, 2010a), que los espermatozoides de *S. purpuratus* también son quimiotácticos (Ramírez-Gómez *et al.*, 2020). En este trabajo se demuestra por primera vez la participación de CatSper en la quimiotaxis de los espermatozoides de *L. pictus* mediante el uso del Índice Quimiotáctico (CI, por sus siglas en inglés) (Figura 11). Mediante registros electrofisiológicos de fijación de voltaje (*patch clamp*) en espermatozoides de ratón se demostró que CatSper se modula por fosforilación mediada por PKA (Orta *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconoce si esto es así en eem. A pesar de que los resultados de un análisis *in silico* de los sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *S. purpuratus* -excluyendo las porciones transmembranales- mostró que el complejo posee 25 sitios con una probabilidad ≥ 0.8 (donde el máximo es 1) de fosforilarse por PKC y 7 sitios para PKA (Tabla I), encontramos -contra lo esperado- que, solo PKA y no PKC participa en la quimiotaxis de los eem. Es interesante ver que también en el caso de ratón, el número de sitios fosforilables (con probabilidad ≥ 0.8) por PKC (43 sitios), es mayor que el de fosforilables por PKA (8 sitios). Es importante recordar que el flagelo del eem posee todas las proteínas de la cascada de señalización que dispara la unión del speract a su receptor, muchas de las cuales se regulan por fosforilación mediada por PKA y/o por PKC (Ward *et al.*, 1986; Hanoune *et al.*, 2001; Su & Vacquier 2006; Darszon, A. *et al.*, 2008; Loza-Huerta *et al.*, 2013; Vacquier *et al.*, 2014). Los resultados que sugieren que sAC no participan en la quimiotaxis de los eem (Figura

11) concuerdan con los obtenidos en los espermatozoides de la ascidia *Ciona savignyi* donde muestran que el Ca^{2+} participa en la quimiotaxis, pero no el AMPc (Yoshida *et al.*, 1994), y en contra de lo reportado en *Ciona intestinalis* (Shiba & Inaba, 2014). En este modelo sugieren que la sAC está involucrada tanto en el aumento de la frecuencia del batido flagelar como en la quimiotaxis dependiente de Ca^{2+} , en tanto que las ACtms participan en la activación de la motilidad mediante la fosforilación de proteínas dependiente de AMPc (PKA) (Shiba & Inaba, 2014). La evaluación de la participación del AMPc en la quimiotaxis, inhibiendo a las FDEs con IBMX, no fue posible, debido a que en el 90% de las trayectorias analizadas, aumentó el diámetro de la velocidad circular de los eem sacándolos del campo visual del microscopio. Dado que en eem de *S. purpuratus*, ~94% del AMPc lo sintetiza la sAC y el resto lo producen las adenilil ciclasas transmembranales (ACtms) (Beltrán *et al.*, 2007a; Vacquier *et al.*, 2014), podría ser que, como en el caso de *Ciona intestinalis*, la sAC y las ACtms tengan funciones diferentes (Shiba & Inaba 2014). En ese sistema encontraron que las ACtms participan principalmente en la activación de la motilidad mediada por PKA, en tanto que como ya mencionamos, la sAC participa en la frecuencia del batido flagelar y en la quimiotaxis de los espermatozoides (Shiba & Inaba 2014). Aunque los resultados de este trabajo sugieren que CatSper podría regularse por fosforilación a través de PKA, no podemos descartar la posibilidad de que dicha modulación sea de manera indirecta. Recientemente se encontró por espectrometría de masas (C. Beltrán, no publicado), que el eem posee dos subunidades de CatSperε (XP_011664202.2 y XP_030855090.1) carentes de región transmembranal. Lo anterior abre la posibilidad de que al menos una de estas subunidades (CatSperε) cumpla con la función de CatSperζ, que en el espermatozoide de mamífero interactúa con EFCAB9 de manera dependiente Ca^{2+} y que se disocia por el aumento de pH. Dado que el genoma de *S. purpuratus* carece de CatSperζ, es posible que alguna de las subunidades del complejo en eem que no tienen regiones transmembranales (δ, ε y γ) interactúe con EFCAB9 para regular la activación de CatSper dependiente de pH y de Ca^{2+} . Un análisis preliminar in silico alineando δ, ε y γ con ζ, mostró que solo ε presenta una secuencia similar con una región de ζ. Aunque es necesario realizar estudios de la interacción de δ, ε y γ con EFCAB9, lo anterior sugiere que ε podría ser la subunidad que sustituye a ζ en eem. Finalmente, es importante mencionar que, por su complejidad, no se ha logrado expresar a CatSper de manera

funcional en sistemas heterólogos, para estudiarlo. Sin embargo en nuestro grupo de trabajo, utilizando la técnica de *patch clamp* y la configuración de célula unida en eem hinchados (diluidos 10 veces en agua de mar artificial (AMA)), se registró un canal permeable a Na^+ , levemente dependiente a voltaje y a pH_i , que se bloquea por Mibefradil, NNC5503-96 y RU1968 (mejor bloqueador del canal reportado hasta ahora; (Carlson *et al.*, 2009; Lishko *et al.*, 2011; Brenker *et al.*, 2012; Rennhack *et al.*, 2018)) con las características de CatSper (Loyo-Celis, *et al.*, 2021). Lo anterior corrobora la presencia de un CatSper funcional en los espermatozoides de erizo de mar y su participación en la quimiotaxis. Los resultados que se obtengan con esta estrategia utilizando inhibidores de PKA y de PKC ayudarán a concluir si CatSper se regula de manera directa por algunas de estas cinasas.

CONCLUSIONES

En espermatozoides de erizo de mar:

- CatSper y PKA participan en la quimiotaxis
- PKC y la sAC no parecen estar involucradas en la quimiotaxis
- La elevación de la concentración de AMPc por IBMX, aumenta el radio de la trayectoria circular del ~ 90% los espermatozoides, lo cual impide evaluar su efecto en la quimiotaxis.

PERSPECTIVAS

Evaluar la quimiotaxis de los espermatozoides de erizo de mar en diferentes condiciones experimentales:

- Usando otro inhibidor de PKA (Rp-Camp) y otro bloqueador de CatSper (RU1968F1).
- Pre-incubados con PKI en ausencia y presencia de los bloqueadores de CatSper HC-056456 y RU1968F1.
- Con el agonista de la sAC, bicarbonato (HCO_3^-).

- Con los inhibidores (SQ22536 y 2' 5' Dideoxiadenosina) para evaluar la participación de las ACtms.

Tabla S1b. Alineamiento de secuencias de CatSper1 de erizo (XP_011664201), ratón (NP_647462.1) y humano (NP_444282.3) (continuación)

Erizo	QLLTLDWFIYSDAVARDPNNFHIIFYLITYIALEYFIFLNLVAVLVDNFQLTLDAAS	373
Ratón	TMLTLDWVSLIYIDNRAQ--GAWYIIPILMIYIVIQYFIFLNLVIAVLVDNFQMALLKGL	588
Humano	TLTLDWVSLIYMDSRAQ--GAWYIIPILVIYIIIQYFIFLNLVITVLVDSFQTALFKGL	682
	:***** ** * *: . ::** *: ** :*****.:*****.* :*	
Erizo	ERDALRKAALKEAEDALFDDGIHTHPLAPKPTLSLSNAHIKMTIDYDEEDYSTSEK	433
Ratón	EKVKLEQAAR--VHEKLLDSDLTLNKAD--ANAQMTEEALKMQLIEGMFGN--MTVKQR	642
Humano	EKAKQERAAR--IQEKLEDSLTELRAAE--PKEVASEGTMLKRLIEKKFGT--MTEKQQ	736
	*: .:** .: *::*: * : : : * : : : * : : : *	
Erizo	KYLSHFLLASIEHNGHILRNQQGTLDKVLLVQDTVDDA---	474
Ratón	VLHFQFLQLVAAVEQHQQKFRSQAYVIDELVDMAFEAGDDDYGK	686
Humano	ELLFHYLQLVASVEQEQKFRSQAVIDEIVDTTFEAGEEDFRN	780
	::**:*::*:. : :*. * .:::** . : : :	

Los alineamientos se hicieron con el programa CLUSTAL O(1.2.4). Fosforilación por PKC Erizo: 3 Ratón: 1 Total: 4. Fosforilación por PKA Erizo: 2 Ratón: 2 Total: 4. Inicio de región fosforilada por una cinasa (PKA o PKC) sobrepuesta sobre otra secuencia fosforilada por la misma cinasa. Inicio de región fosforilada por PKC sobrepuesta sobre el final de la secuencia fosforilada por PKA o viceversa. Región transmembranal. Aminoácido conservado (*); Aminoácido con conservación de grupos débil (.) y Aminoácido con conservación de grupos fuerte (:).

Tabla SII. Alineamiento de secuencias de CatSper2 de erizo (XP_011679404.1), ratón (A2ARP9.2) y humano (NP_742093.1)

Erizo	MARNDADEPNIHSSGIFDELTPLAEIFRSKLIEDFHLLSFDDHGHSDVPKFYSKDLADE	60
Ratón	-----MAQEQQGH--FQLLRADAIKSLIDTFSLIEHLQGLS-QAVPRHTLREILD	48
Humano	MA-----AYQQEEQ--MQLPRADAIKSLIDTFSLIEHLQGLS-QAVPRHTIRELLDP	50
	:.. * :***: * * * : . . * : : * :	
Erizo	ATLDKMLLTNPHGLVKFHAYTRKDNTEVNGSIDRRKNRVRNKNKNPPIDMWAHYLLETS	120
Ratón	SYQQKLMGSDQQLVRFVSIKPRR--MGHITHSRRLSRLVRCSRMPPLSLWAGWVLDSS	106
Humano	SRQKKLVLDGQHQVRFVSIKPRR--IEQISHAQRLSRLHVRCSRMPPLSLWAGWVLECP	108
	: . * : : . * : * : : : * . * : : * : * : * : * : * : * :	
Erizo	YFQNFMLILILANSLSLGLLSEVADRTDPSLAGTRRFLEIFDYCALFLFMVEILLKWVDN	180
Ratón	VFSKFIISLIFLNTFVLMVEIEMESTNTALWPVKLALEVADWFILLSFIVEILLMWLAS	166
Humano	LFKNFIIIFLVFLNTIILMVEIELLESTNTKLWPLKLTLEVAAWFILLIFILEILLKWLNS	168
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : .	
Erizo	FPLFWKNGWNIFDFVVTVASFIPEIIASAAGDLEDLKVIVGNIRVFRIFRALKMVSRFRQ	240
Ratón	FSLFWKDAWNVDFVFTLLSLPELVLLGV--PAHSVWLQLLRVCRVLRSLKLFARFRQ	224
Humano	FSVFWSAWNVDVFTMLSLPEVVVLGV--TGQSVWLQLLRICRVLRSLKLLAQFRQ	226
	* : * * . * : * * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
Erizo	ARMIALAITKAFNAMSFILVFLFLYIFAITGIIFDYSRSMRDDLTHQHSFNNLGNA	300
Ratón	IKVILLALVRLKSMFTLLMLLLIFFYIFAVTGVYFFREYSRSTIEGLEYNMFFSDLLNS	284
Humano	IQIILVLRALKSMFTLLMLLLIFFYIFAVTGVYVFSEYTRSPRQDLEYHVFFSDLPNS	286
	: * * . . . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
Erizo	MITLFQLFTLDQWYKILKDMWKVMGS--VAPTFYIMLWICIGSFIFKNLFGIMVNNFQN	358
Ratón	LVTVFILFTLDHWYAVLQDIWKVPESSRVFSSIIYVILWLLGSIIFRNIIVAMMVTNFQN	344
Humano	LVTVFILFTLDHWYALLQDVWKVPESSRVFSSIIYVILWLLGSIIFRSIIVAMMVTNFQN	346
	: : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
Erizo	IRNELFMVEKQEVMVQMQLDADKFNEELERQDELNTGRRVSSMK-----	404
Ratón	IRSELSEEMSHLEVQY---KADMFKQI IQRRQHSESLRGTSLGKVSEDI IETS DASDD	400
Humano	IRKELNEEMARREVQL---KADMFKRQI IQRRKNMSHEALTSSHS---KIEDSSRGA--	397
	* * . * * : . * * . * * : : : . . . * . .	
Erizo	-----LLEVD---SVMET-----IEEE-----	418
Ratón	DDDDDDDDDDDDDDKSDATESDNEESDSENSESESEKIDPEKDYAKKSYPEKSH	460
Humano	-----SQQRESLDLSEVSE---VESNYGAT-----EEDLIT----SASK	429
	* * *	
Erizo	--PSRDR-----KSHKSVASSDALFRVRS	440
Ratón	PEKSYPEKSHPEKSYPEKSHPKSYDEQAEAEKVKEESKEKAYPVSHSIS-----SHGS	514
Humano	TEET-----LSKKREYQSSSCVSTSSSYSSSS	457
	: : : : : * :	
Erizo	RMMGEITKKSQDWEKTVHDNLQLLVSS--SSETIWRDITLFRYFQLMEALQENLQERQDL	498
Ratón	TAADTAFLNLDWETLVHENLPGLMDMDQDDRIVWPRDSLFRYFELLEKLQYNLEERKKL	574
Humano	ESRFSEIGRLDWETLVHENLPGLMEMDQDDR-VWPRDSLFRYFELLEKLQYNLEERKKL	516
	* * * . * : * * * : . . . : * * * : * * * : * * * : * * * : * :	
Erizo	QNMTYHALINIFDS	512
Ratón	QEFVQALMSFEDK	588
Humano	QEFVQALMNLEDK	530
	* : : : * * : : * .	

Los alineamientos se hicieron con el programa CLUSTAL O(1.2.4). Fosforilación por PKC Erizo: 6 Ratón: 11 Total: 17. Fosforilación por PKA Erizo: 7 Ratón: 6 Total: 13. Inicio de región fosforilada por PKC sobrepuesta sobre el final de la secuencia fosforilada por PKA o viceversa. Región transmembranal. Aminoácido conservado (*); Aminoácido con conservación de grupos débil (.) y Aminoácido con conservación de grupos fuerte (:).

Tabla SIII. Alineamiento de secuencias de CatSper3 de erizo (XP_011666090), ratón (NP_001239416.1) y humano (NP_821138.1)

Erizo	MHESESSESLP SRQDSDLII -----DDEGEIKRWVRPDFQFHHFIQRLTESNWFNTIIMF	55
Ratón	--MSQHFFHNP VRVKSGLFAT ASEAL QARLSKIKR KDKECQAYFRKVI KSTFFQIVMIT	58
Humano	--MSQHRHQHRSRVISSSPVDTTSVGFCPTFFKFKRNDDECRAVFKRVIMSRFFKIIMIS	58
	*: . * * . . : : * * : : : : * : * : :	
Erizo	TIVMNAVTMAAETGDTIKAKYRTAFVTL DLGIFLGVY TAEFILKIYA EPIKYFYSAY NLFD	115
Ratón	TVTTNSFLLVLGTNYDIQFEFFRTFEVSELFFVSVYVCEFLMKVYVDPITYWKGYNILD	118
Humano	TVT SN AFFMALWTSYDIRYRL FRLL EFSEIFFV S ICTSELSMKVYVDPIN Y WKN GY NLLD	118
	*: . * : . : * . * : . : : : * : * : . : * : * : * : * : * : * :	
Erizo	FIVLLISFVQIFL GQIQ TT Q GP NLS ALR TLRAL RTL RL RTV SFV K LQV L V T ALL DTLR	175
Ratón	VIIILITIPYLLRKIKGNHSA---YLH FADGIQ SLRILKLISY SRGIR TLII AVGET VY	175
Humano	VIIIVMFLPYAL RQ LMG KQ FT---YLYI ADGMQ SLRILKLIGYS QGIR TLIT AVGQ TVY	175
	. * : : : : : * : : . : * . : : * * : : * : : * : : * : * : * : * :	
Erizo	NSVFN VILL LLLLL MFL FAIMGYI FGY KEGMSDKEHWGDLPT AML TL FT L V T VEG WTDVQ	235
Ratón	-TVASVLTLLFLLMFV FA ILGFCLFGVTD-RGDLENWGNLASA FF TLFSLATVDGWTDLQ	233
Humano	-TVASVLLLLLFLMYI FA ILGFCLFGSPD-NGDHDN WGN LAA FF TLFSLATVDGWTDLQ	233
	: * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
Erizo	AELDKL-TEMSRIY TI FIILGHFI FT NVFIGMIIMNIHEATEAY QHDQ MVERELTIQRK	294
Ratón	EELDKRKFTV SRA FTL FI LLASFI FL NMFVGV MIM HT ED SM KK FERDLTLERNLAIMEE	293
Humano	KQLDNREFALS RA FT II FI LL ASFI FL NMFVGV MIM HT ED SIRKFERELM LEQ QEMLMGE	293
	: * : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
Erizo	KEYLIRRH LXK VR LM LEK Q NQGDYKDFYDMVKEF Q GL TR HDDY TL SLDLATSLRWIEAYI	354
Ratón	KQIILKRQ Q EEV NRL MNT Q KSG-SMN FID MVEGF KK TL RHT DPMVLD DF STLS FID IY L	352
Humano	KQVIL Q RQ Q EEIS RL MHI Q KNADCT S FSELVEN F KK TL SHTD PM VLD DF GTSL PF DIY F	353
	* : : : * : : : * : * . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
Erizo	TTLD HQ DNTMY RL QQLHFEMCNLLAMALEK KL KERYGL-----	392
Ratón	VTLD NQ DVIVSKLQELYCEI VN VLS L M LE D MP K ESS SSLSGLS--	395
Humano	STLDYQDTTVHKLQELYEIVH V LS L M LE DL P Q E K P Q S LEK V DEK	398
	* * * * : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	

Los alineamientos se hicieron con el programa CLUSTAL O(1.2.4). Fosforilación por PKC Erizo: 1 Ratón: 4 Total: 5. Fosforilación por PKA Erizo: 1 Ratón: 4 Total: 5. Inicio de región fosforilada por una cinasa (PKA o PKC) sobrepuesta sobre otra secuencia fosforilada por la misma cinasa. Región transmembranal. Aminoácido conservado (*); Aminoácido con conservación de grupos débil (.) y Aminoácido con conservación de grupos fuerte (:).

Tabla SVb. Alineamiento de secuencias de CatSperβ de erizo (XP_011679115.1), ratón (NP_766611.2) y humano (NP_079040.2) (continuación)

Ratón	LIPGYSSFLIMNITDKW--TASALATMPQ-AIKSNLKFLTGSWFLYNFGTAGGRKWSIST	717
Humano	VLPGYSSFLITSILDNK--NALAIATMPE-SAPNNMTFLKSTWFLYNFGQRNGRTWKIYS	715
Erizo	VGSGM-RLLITNMRSLSDGTLVAMATSQEPSSLHANMRTPDI-----AENVIDLLLKE	82
	: * : ** : . . * : : * :	
Ratón	RQCNYWIQQDSLDFMSLNLVKYIDVGNITIDFQFKIIPK--AMSTFPIPPVSMVVGPNPLV	775
Humano	KPCNYWFQHDSD--PSLNIWKYIDLGNISYVLKAKVIRNAKGFRMLEIPLLTVFVGNPNLL	773
Erizo	SPCQHVMTPHSS--VAKQPTRYMDVGDRAFTQVSASVVGQ-IWQSDKAMLSVRVINPALI	139
	* : : .. : : . : * : * : : : . : : : * * * * :	
Ratón	EVKTQGVFDLNNENYYLDIHVSGRFFQKGSTSIALVLWEGSSKCYAITLLPTIKSSCSYLR	835
Humano	EVTAEVTFDDTDSYVITISAASKVLHQGSTSLAFIMWSASTEFCVTTMVPTLKSSCSYLR	833
Erizo	HVQTRRSYNRYGMETAFITVRHRVYNKGVSSILISIPASALRCDSSVSFTFTMHCTCPPTK	199
	. * . . : : * . . . : * : * : : : . * . * : : * : : * * :	
Ratón	TMHHTPGRHIPPEDEWISGVHKDSQGFNMIKTLPINRPPSHMGISIPLTDNFYHADPSKP	895
Humano	SMHHIPSKFIPFEDWISGVHKDSQGFNLIKTLPINRPPSNMGIAIPLTDNFYHADPSKP	893
Erizo	RLHFYIDPPVTSQEFLYGSPKNRKNQLSLTLDVNYRPPSRLGISVPLTNNIYNADPSQP	259
	: * . . : : : * * : . . . : * * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
Ratón	I PRNQFHKSKETGKYKQCANVTSRAMCNCSEHQKFSHAVAFSDCKEKVHRFKFPVTQYPV	955
Humano	I PRNMFHMSKKTGKFKQCANVSTREECNCTKDQKFSHAVAFSDCREKVPFRKFPITQYPV	953
Erizo	RLNDHYEVSKGSGYKQCAGKQSRDCHCTDEMRLSSLELFTDCREKVYRITYTENLYPH	319
	. : . . * * : * : * * . : * * : * : . . : * * : * : * * * : . * * :	
Ratón	VLEIFNERDKISAEPYLVMTTEVNMNRKNWQLKHNEPENVKMKHYLEPLLKTPVYNPLG	1015
Humano	SLEIINEDGRVPLQSPYLVTVEVNMNRHNWKLKHTVPENIKRMKQLVEPILGAAVYNPSG	1013
Erizo	LVIGERKDDDEVLAAPYILTIKEVNDREDFVIEAADVVYMSEIGKVVE-IPVNQLHSPNQ	378
	: . . * : * : * * * * : * : : : : : : * : : : * :	
Ratón	LNLTIQGSELHFHKVSVVPGVSFCELSEEFQIYVDEVPLPFPGHALIAVATSVVLGVLIF	1075
Humano	LNLSIKGSELHFHFRVTVISGVTFCNLIEEFQIYVDEAPLPFPGHALIAVATAVVLGGLIF	1073
Erizo	LVIKFRATQLYHFRLTVIDGFSYCKLEDEVQVFDVDRAPLPGLSQMIIFATVSLMGGVVF	438
	* : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
Ratón	IAFVFQLRNIHPLKALKKSIRGNPGLTSSTTVSS-----	1109
Humano	IAFMFQLQGIHPWRTFQRWIRRNQEKFSSISLSELIHRKSEE	1116
Erizo	AIYLNIVRKSQHLRT-----RSNMALFQ-----	461
	: : : : : * * .	

Los alineamientos se hicieron con el programa CLUSTAL O(1.2.4). Fosforilación por PKC Erizo: 21 Ratón: 14 Total: 35. Fosforilación por PKA Erizo: 10 Ratón: 7 Total: 17. Inicio de región fosforilada por una cinasa (PKA o PKC) sobrepuesta sobre otra secuencia fosforilada por la misma cinasa. Inicio de región fosforilada por PKC sobrepuesta sobre el final de la secuencia fosforilada por PKA o viceversa. Región transmembranal. Aminoácido conservado (*); Aminoácido con conservación de grupos débil (.) y Aminoácido con conservación de grupos fuerte (:).

Tabla SVI. Alineamiento de secuencias de CatSperY de erizo (XP_011679048.1), ratón (XP_006540153.1) y humano (NP_067008.3)

Erizo	-----	0
Ratón	MQPLAKRCVTLWVWVVGITKLSKEIKSYNKYLDRPLSEAKCSWASGSGSSYMVSRPAMS	60
Humano	-----MCGPAMF	7
Erizo	-----	0
Ratón	PVSPVWPRKPNLWAFWVLRLLVLLLSLKSWAEDTLQHCTWLLVLNKFVKVGLHLSKDRFQD	120
Humano	PAGPPVPRVRVQVLWALLAVLLASWRLWAIKDFQECTWQVVLNEFKRVGESGVSDSFFE	67
Erizo	-----	0
Ratón	HEPIDTVAKVFQKLTDSPIDPSENYLSFPYYLQINFSCPGQNSEELARKGHLMGKPMVR	180
Humano	QEPVDTVSSLFHMLVDSPIDPSEKYLGFPPYLLKINYSCEEKPSIEDLVRMGHLTGLKPLVL	127
Erizo	-----	0
Ratón	INMYSVNFYRWEMENLQILMEAAPMRSTGYCPAEAMCILNWTTPMPFKNGSVVSSVDIY	240
Humano	VTFQSPVNFYRWKIEQLQIQMEAAPFRSKEPCMAEEVCSMSWYTPMPICKGVSVMRVDIS	187
Erizo	-----	0
Ratón	TNGIGPFIKKRFYVNMNGFLKRDAAGKSLFAIGYESLVLKSSHFRLSKSRPLWYTVNHA	300
Humano	SNGLGTFIPDKRFQMNINGFLKRDNRDNIQFTVGEELFNLMQPQYFVGVSRRPLWHTVDQS	247
Erizo	-----	0
Ratón	PVFILGGFYDEKAILFSDSNFQDYVLELSIDSCWVGSFYCPILGFSATIHDAIATESTL	360
Humano	PVLILGGIPNEKYVLMTDTSFKDFSLVELSIDSCWVGSFYCPHSGFTATIYDTIATESTL	307
Erizo	-----	0
Ratón	FIRQNQLVYYFTGTYSTLFDKSHGSSRWVRLPSECIKRLCPVYFSGNGSEYVLALTTGK	420
Humano	FIRQNQLVYYFTGTYTTLYERNRSGSWIRVLASECIKKLCPVYFHSNGSEYIMALTTGK	367
Erizo	-----	0
Ratón	NEGYIHIGTITDGLVSFEMVPDGSVCEKLPKNC SIDWATYITDERNLLLLVKIDS---	477
Humano	HEGYVHFGTIRDGQVSFEMLPRQWSVCEQIGVTTCSIWSEYIAGEYTLVVESGYGNA	427
Erizo	-----	0
Ratón	-GQFYLVNFNTEFKTLNLYKIPEFIPEAKELDFVLVLDVTYTNTPMTPKGLFFNTLNN	536
Humano	SKRFQVVSYNASDDLELLYHIPEFIPEARGLFLMILGTESYTSTAMAPKGIFCNPYNN	487
Erizo	-----	0
Ratón	MLYIWGNFILQSYNREEFI FLADFPKESTIKYMVNSFKGQMAVVTENEIWIYFLEGGYDV	596
Humano	LIFIWGNFLLQSSNKENFIYLADFPKELSIKYMARSFRGAVAIVTETEEIWIYLLGGSYRV	547
Erizo	-----	0
Ratón	YQVVPSQGWRTYLKLQKMQKSPLYSTNESLVSLFYQDENLFLVYLFVVGKERLVKRLLP	656
Humano	YQLFPSKGWQVHISLKLQQSSLYASNETMLTLFYEDSKLYQLVYLMNNQKGLVKRLVP	607

Los alineamientos se hicieron con el programa CLUSTAL O(1.2.4). Fosforilación por PKC Erizo: 0 Ratón: 18 Total: 18. Fosforilación por PKA Erizo: 0 Ratón: 7 Total: 7. Inicio de región fosforilada por una cinasa (PKA o PKC) sobrepuesta sobre otra secuencia fosforilada por la misma cinasa. Inicio de región fosforilada por PKC sobrepuesta sobre el final de la secuencia fosforilada por PKA o viceversa. Aminoácido conservado (*); Aminoácido con conservación de grupos débil (.) y Aminoácido con conservación de grupos fuerte (:).

Tabla SVIb. Alineamiento de secuencias de CatSperY de erizo (XP_011679048.1), ratón (XP_006540153.1) y humano (NP_067008.3) (continuación)

Erizo	-----	0
Ratón	VGTLMEYNLP-KPFTVVNQGNKMITFTNTCPFKAIHAVDVPKKQHASRTESYVALPPLV	715
Humano	VEQLLMYQQHTSHYDLERKGGYLMLSFIDFCPFVSMRLRSLPSPQRYTRQERYRARPPRV	667
Erizo	-----MIYQVIVHLLSEKEDLQTIKDNEIAEVTHNPFKRWYGETETLRYFYQ	48
Ratón	SESLGFHNNNTLAVYQGLVYYLLW---LHSKYDKPYADPVHDPTWRWQHKTCKDKDYFF	771
Humano	LERSGFHNENSLAIYQGLVYYLLW---LHSVYDKPYADPVHDPTWRWANNKQDQDYFF	723
	:* :*:*** *:: * : * :.*: * :*: .. :::	
Erizo	YLFQKNLQSGIHI DPDAYYLQPFGNTPEDTKTLPSTIYLDKHEVFEFAISLELGLTHSN	108
Ratón	YLFNSRLAEGIYINMAYQKLY---NMSGDYGI PDLFFLDKGNWFTFTVVLLSHQDTFT	828
Humano	FLASNWRSAAGVSIEMDSYEKIY---NLESAYELPERIFLDKGTEYSFAIFLSAQGHFR	780
	:* .* * : * : : * . . . : * . : * * * : * : * *	
Erizo	V--E-----IEDLYAL-VEVSNDDVLGINTHYFEYRLNNTIRYEVTLSDKGALELQAGP	159
Ratón	SSDSQGPNTINVDKKLSSLVLA DPECLSVTATREFLLNRNTLLTKIKVIDKKRCSEQGMV	888
Humano	TQSELGTAFLQHSQVDVGVVLADPGCIEASVKQEVLINRNSVLFISI TLKDKKLCYDQGIS	840
	. : . : *	
Erizo	GVDLYPASVLIHVHSTFSCFIKEGDI FKPGEIY TMDIMLGCPPGRKLVFDLQLSID--V	217
Ratón	GRNIIKTSMLIKVLGAPGNCIQRTYLG DHIQGI RLVPI FIFIGCPPGKRLAFDVSYTIKHSE	948
Humano	GHHLMETSMTVNVVVGSSGLCFQETHL GPHMQGNLMV PVFIFIGCPPGKRLAFDITYTLEYSR	900
	* . : : * : : * : * : . : : * : : : * * * * * : * * * : : .	
Erizo	LQTTFFYDCPIV TQNRPC LH YH D VFRP MFKVVDFTTGEASLFEGLYTLTVLGGSHSSEED	277
Ratón	EINKHYFDCVIKDAEMPCFLFRDLFQ PFFLVQDLVTGDSGSFLGSYVLKVVGGGRTL N-T	1007
Humano	LKNKHYFDCVNVNPEMPCFLFRDIFYP FFLIQDLVTGDSGSFQGSYVLLVGGGPTLD-S	959
	. . . : * * : * * : : * * : * * : * * * * * : * * * * * : : :	
Erizo	IVLFTPEEQRYNNL-DISGSRI LQPVKVESI INDSIPVYSLHNNTIKWVCKGSGSPCSDV	336
Ratón	IRDYTEEEI FRYNSPLDTTNSLIWKT KVERTTEDKKFYIMSHESPGVEWLCLENSPCYDI	1067
Humano	LKDYSEDEIYRFNSPLDKTNSLIWTRTRTRTKDSAFHIMSHESPGIEWLCLLENAPCYDN	1019
	: : : * * : * . * : . * * . : : : : : * . . : * * * : * * * *	
Erizo	PPSKLLRSPEYYFLIEMSNHGVDTDSTYCYD LQFVVHVHGM DIGSKSAVLIVVGIY TMD	396
Ratón	IPQSI-YPPEFFFKLLVSNR GVDN-STYCDYKLT FIVHIHGLPLSSKRSSFIVMVSTSF	1125
Humano	VPQGI-FAPEFFFKVLVSNR GVDN-STYCN YQLTFL LH I HGLPLSPKRALFIIMVSASVF	1077
	* . : * * : * : : * * * * * . * * * * * : * * * * * : . . * : : * : : .	
Erizo	IMLGCPPGRKLVFDLQLSIDVLQTTFFYDCPIVKENR PCLHYHDAFRPMFKVVDFTTGEA	456
Ratón	IAL-----VVFYILFCLVWPHIVK--AWVSFRWKIHNMMAP-----	1159
Humano	VGL-----VIFYIAFCLLWPLVVK--GCTMIRWKINNLIAS-----	1111
	: * : : * * * : : : : : : : : : : : : : : : :	
Erizo	SLFEGLYTLTVLGGQ-----HSSEEDIVLFTPEEQQ-RYNNLDISGSRI LQPVKVESI	508
Ratón	---ETYSSSSSSGGFTLHS---HSSEGS--FEGPSRPGTKEDNVQAKRA-----KVA--	1203
Humano	---ESYTYASISGISSMPSLRHSRMS--MFSSR---MTEDRAEPKEA-----VERQL	1157
	* : : . * * * . : : : : : : : : : : : :	
Erizo	INDSIPVYSLHNNTIKWVCKGSGSPCSDVPPSKLLRSPEYYFLIEMSNHGVDTDSTYCYD	568
Ratón	-----	1203
Humano	MT-----	1159
Erizo	LQFVVHVHGM DIGSKSAVLIVVVSFVVTILVVCLFIVCNYKERRLWNRLKASCTRRDRTR	628
Ratón	-----	1203
Humano	-----	1159

Los alineamientos se hicieron con el programa CLUSTAL O(1.2.4). Fosforilación por PKC Erizo: 12 Ratón: 22 Total: 34. Fosforilación por PKA Erizo: 2 Ratón: 9 Total: 11. Inicio de región fosforilada por una cinasa (PKA o PKC) sobrepuesta sobre otra secuencia fosforilada por la misma cinasa. Inicio de región fosforilada por PKC sobrepuesta sobre el final de la secuencia fosforilada por PKA o viceversa. Región transmembranal. Aminoácido conservado (*); Aminoácido con conservación de grupos débil (.) y Aminoácido con conservación de grupos fuerte (:).

Tabla SVIc. Alineamiento de secuencias de CatSperY de erizo (XP_011679048.1), ratón (XP_006540153.1) y humano (NP_067008.3) (continuación)

Erizo	RVV PVSSDSSEEIELEVHYREGIAHR PIGLSTTSTVIER LVKNDEDDYGFPPDEYDELEY	688
Ratón	-----	1203
Humano	-----	1159
Erizo	TGNMDSSR HRTNSLHHR SVSS NI LDRSKT	717
Ratón	-----	1203
Humano	-----	1159

Los alineamientos se hicieron con el programa CLUSTAL O(1.2.4). Fosforilación por PKC Erizo: 3 Ratón: 40 Total: 43. Fosforilación por PKA Erizo: 4 Ratón: 16 Total: 20. Inicio de región fosforilada por una cinasa (PKA o PKC) sobrepuesta sobre otra secuencia fosforilada por la misma cinasa. Inicio de región fosforilada por PKC sobrepuesta sobre el final de la secuencia fosforilada por PKA o viceversa. Aminoácido conservado (*); Aminoácido con conservación de grupos débil (.) y Aminoácido con conservación de grupos fuerte (:).

Tabla SVII. Alineamiento de secuencias de CatSper δ de erizo (XP_011683737.1), ratón (NP_780559.2) y humano (NP_689997.3)

Erizo	-----	0
Ratón	MLVLM LAAAVATMV --- RAHTLCRVHTVRTGKVF KSNIQL QGDPLFYAFPNTFVLKNVCK	57
Humano	MLMLMLVAAVTMWLRPLVTAQLCRSRTVRTGKVFNLIQDVQGDRLYFHPTTTRLIKHPCE	60
Erizo	-----	0
Ratón	ADISVYLGQKVFLTIDNFESS LLPLTVPKS LAVGVPSITS AHFVSGSLVLFVISGKGY SY	117
Humano	KNIALYLGKQVFFTMDFETSLLPFTIPTMSQVGVPEVTSAHFA-GSLLLLVVDQKVYIY	119
Erizo	-----	0
Ratón	DYYENTWRK LEGISEPVSHISGDVCC CFKGS - FCLE L SNNLFAYLRGGQ IPGTNIY FSDNG	176
Humano	DYENNSWSMSLGIKHPVTHVSGDNCCYTGSLFCVHVSNLVFAVFRGDQISQTYIYYSNTG	179
Erizo	-----	0
Ratón	GFSF QLMNTDKLSHLTGLGGI FHLHMSQVGVLMVEN NLGTFFHYMEY PLNHS MGI A FSY	236
Humano	GFSFWKYHYDRQAEIIGSLGGIFHFFSLSQVAMLVVNQGGKGMFKYSDHPLNRSFGLSFDY	239
Erizo	-----MGPLSKVFFAFTN-----KQ-----	15
Ratón	KNL LEVIMKPYQRGFMVLWNQK SILVSSNSG QIVEHVRLIDQKIFTDLDVEHANINIYSV	296
Humano	NGTLDILIA PGQRGILLWFENSL LF SHNAGQ LVDTVVRVKKGDQTLFSSIFEAKITIHNI	299
	: * . : : : :	.
Erizo	-----LHVDDLIDSNSAIFDKQSNIFIMNA-----	41
Ratón	ASNAYELAF LVAEDHLYYGSQSYMGT YVIKLP HQPLWSTHTSIYFEDIGILQ VLPVADP	356
Humano	AVTENELAVITREDNLYYGNLGV PSSIIK FADQYIWSE DVALMFRSPGTLEILT PLRDT	359
	: : : . . : : * . . : : :	
Erizo	--RHYD LDSRNASTSSLVYL ASELIYPSEVLEE QGHDLPTCP FL LFTADFGSEL FYIDIG	99
Ratón	HFAAYD FDK ----- CTVNVQ SSLMDEK LALQPCNV ELLEST MINMFT IDMN	403
Humano	AFFPA DFQK ----- CLVNIQ ALLMDPELHV GKCKIEFLTGE FIYRMYTIDMH	406
	:*::: : . * : : * . : : : : : : : : **:	
Erizo	HSLILRAS FIPSLWQNSNIMIYPSNPS IITVSTSLT TGDP IGHGLQKIEV SASIS----L	155
Ratón	SKLKL SALMI PRKGENPTPLVM VS NPHALGF KANLNEFGNT FDGNSKYKLDI ELKQ QH HW	463
Humano	SQLELTASLIPQPGTSLIPLVM VS NPHSLG FQATFY ENGYTSDGNTKYKLDIFL KQ Q Q HW	466
	. * * * : ** . : : * * : . . . : . . * * : : . .	
Erizo	TGDQPDI EDGEYIDGLT TV FTTAE PSL TCLPNP SVHAYVSAG CPPEKTIRARKQ LKRE-	214
Ratón	GNSDFNFTASIKRHAISSVTV DIADK TLSCVDL KPL STLISV GCD MTKKIV VQNKISACT	523
Humano	GR TDSNFTSSLK KATMSTLTVDIANKEIS CVDIKPLSTLISV GCDL DKKIVIQ NKVSACS	526
	: : : . : : : * . * : : * : : : : * . * * * . * * : : : .	
Erizo	-----SCEYLK NYVYTF ERDEYDPS FLEGT NGISE DQGILSIQYDYGR HGCPD QSY SDG	269
Ratón	MGILN PVQLQ KNYTYTIEKEAYDPIN HNGE -----A QDDLIVF Y EYKDLGC PRLV Y YDKP	578
Humano	MGILD PLTLQDNYSFIE KEFYD PGFQ QGQ-----S SEDLHV FYSY QQLGC PLL V Y Y DTL	581
	. * * : : * : : * * . . * : * * * * * . * : * * * * * . * .	
Erizo	YKPHFDLYMGDEFIEKMDTDYAMIEIHGAHNY DYLM TAK QAGCTQRPQ SW EM LT LQNTT	329
Ratón	WKPV VELW KNGIVEEIMNAEYVISEIN GLV TY SYS SLTAATANC RSQPQ NWSTFESDIEN-	637
Humano	WKPV VELWRK DSFQ EVIDAEYV LLEVNGQ FYSYS SLTAQ SAMCTS QPQ NW TTMIKE--F-	638
	: ** . : * : . . * : : : * : : * * . * * : * * * * * : : .	

Los alineamientos se hicieron con el programa CLUSTAL O(1.2.4). Fosforilación por PKC Erizo: 14 Ratón: 22 Total: 36. Fosforilación por PKA Erizo: 7 Ratón: 10 Total: 17. Inicio de región fosforilada por una cinasa (PKA o PKC) sobrepuesta sobre otra secuencia fosforilada por la misma cinasa. Inicio de región fosforilada por PKC sobrepuesta sobre el final de la secuencia fosforilada por PKA o viceversa. Aminoácido conservado (*); Aminoácido con conservación de grupos débil (.) y Aminoácido con conservación de grupos fuerte (:).

Tabla SVIIb. Alineamiento de secuencias de CatSperδ de erizo (XP_011683737.1), ratón (NP_780559.2) y humano (NP_689997.3)

Erizo	KDPSTAWTRYLNL-----	342
Ratón	-EEPFLWNRENYVSCHEDNKDNPLLPNVEYQVLGGQTNNKIIIFGQRNGIYTFHLSVVDP	696
Humano	-GGPFFWNRENYVSCHPNNAPLRWPDVQYQILGGRTANQIIFGH-NGFYVFIYSIVDP	696
	. :	
Erizo	-----	342
Ratón	YYSYCNLNTIFS VYV HGALPVTKFQPLLTILLMVT TLL TAWLAYAIPKQLRSEK GQRLL	756
Humano	YYSYCQLETIFSIYVYGAFPVQLVSAGVVILLI ISS ILGSVWLAYKTPKLLRTARGRIK	756
Erizo	-----342	
Ratón	GFCYQILQLCLGVCFCTWLRGKLRQWLRPRRVKDQNRGKVRVAQKHPET805	
Humano	KCATQLCRRCKTVCQFRASATARAGTEPPGRHRTPHGGRSDH-----798	

Los alineamientos se hicieron con el programa CLUSTAL O(1.2.4). Fosforilación por PKC
 Erizo: 0 Ratón: 1 Total: 1. Región transmembranal. Aminoácido conservado (*);
 Aminoácido con conservación de grupos débil (.) y Aminoácido con conservación de grupos fuerte (:).

Tabla SIXb. Alineamiento de secuencias de CatSperc de erizo (XP_030855090.1), ratón (P0DP43.1) y humano (NP_001124429.1)

Erizo	-----	421
Ratón	SQFYHMDK GESLTI WSQIVYPENRGLYIVVEHYGSSVMTWTQNLEYEIASGFCTKTMITR	687
Humano	HVFYFLDKGEALTVWTQIVYPENTGLYVIVESYGPKILQESHEISFEAAFYCYCTKTLTLT	653
Erizo	-----	421
Ratón	FFQTTN YELVDNYYQLQKENTGLMLL QFRPSEFS RTCLTAKPVFEIDVGCDSKYIMVRG	747
Humano	FYQNVDYERISDYFETQDKH TGLVLVQFRPSEYSKACPIAQKVFQIAVGCDDKKFIAIKG	713
Erizo	-----	421
Ratón	FNKSRCQ RRDFS YVIDK ELLRES LSDNLKVRYDVAKYGCPLTLELGQMFQPIVELYDENG	807
Humano	FSKKGCH HHDFSY VIEKSYLRH QPSKNLVRVYIWGEYGCPL RLDFTEK FQPVVQLFDDNG	773
Erizo	-----	421
Ratón	FIKIVDANFILWEIHGRNDYTFNSTMEQNGCINEAQTWDSMIEENPDIPDDVWGPQNYR	867
Humano	YVKDVEANFIVWEIHGRDDY SFNNTMA QSGCL HEAQT WKS MIE LNKHLPLEEVWGPENYK	833
Erizo	-----	421
Ratón	PCFSYAIGKPGDLGQPYEILNYSNKNHIKWPMTYAGMYVYRLKILDPNYSFCNLTTIFAI	927
Humano	HCFSYAIGKPGDLNQPYEIINSSNGNHIFWPMGHSGMYVFRVKILDPNYSFCNL TAMFAI	893
Erizo	-----	421
Ratón	ESLGM IPR SSVYLVAALIFVLM LT FISILVLSYFWYLKIYRQFIEPLHKRPAKQKKN	985
Humano	ETFGLI PSVYLVASFLFVLM LLFF TILVLSY FRY MRIYRRIYIEPLHKPQRKRKKN	951

Los alineamientos se hicieron con el programa CLUSTAL O(1.2.4). Fosforilación por PKC Erizo: 0 Ratón: 6 Total: 6. Fosforilación por PKA Erizo: 0 Ratón: 5 Total: 5. Inicio de región fosforilada por una cinasa (PKA o PKC) sobrepuesta sobre otra secuencia fosforilada por la misma cinasa. Inicio de región fosforilada por PKC sobrepuesta sobre el final de la secuencia fosforilada por PKA o viceversa. Región transmembranal. Aminoácido conservado (*); Aminoácido con conservación de grupos débil (.) y Aminoácido con conservación de grupos fuerte (:).

Tabla SX. Alineamiento de secuencias de CatSper EFCAB9 de erizo (XP_003728906.1), ratón (NP_081307.2) y humano (NP_001164654.1)

Erizo	MRV-KPCILQHLHLDKTYGMLTGKNVRTLMEYFDLIDVHQDGSINDIQFCLVLGAMTDLK	59
Ratón	MKLTGCGFLWYLYMDKIYCLLSLRNVKALMVYFHLLDVHHRNTLNDVLFHFHFLQHVNTLN	60
Humano	MRLKQGSFLWYLYLDKIYCLLSVRNVKALAEYFHILDVHGKNTLNDVLFYHFLHHVTDLK	60
	:: .: :*** * :*: :***: * **::*** .:***: * .* :***:	
Erizo	RNQIYIVFDMLDIDGSGQIDFDEFYLLICILISLKDDEKQFIYRHSRTVFELLEDGSGQ	119
Ratón	KSQIGMIFDLDWTAVGEIGFDQFYVLICILLAHQDHLEDHFMYRHSRPVFELLDLGEM	120
Humano	KAQINIVFDMLDWNVAVEIDFEKFYMLVCMLLAHQNHLEGQFMYRHSRPVFDLLDLKGD	120
	: ** :***:* . **.*:***:***:***: : : * :*:*** **:* ** .*	
Erizo	SISAQEFSAFGFLNFYGDVAVKQIFNDFDISGDQELDYEKFKMFAMACIDRQNEIDRLKR	179
Ratón	NIGAANFQNYRFLFNKQELRDLFDFDITGDRLLNYKEFKLYTIFCTDKSIDRK--KR	178
Humano	RIGAKNFEMYRFLFNIQKQELKDLFRDFDITGDNRLNYQEFKLYTIIYTDKLQKRQ--KT	178
	. :*. : ***: : :***:***:***. **:****: : * . . *	
Erizo	EEIERQKRRREAKALKRLAAGGGTVAWLRSSCTIV-----	215
Ratón	RKDREAAREKEKEGK---DKEKYLHLKKIYSSMLSHRSIL	216
Humano	EEKEKGERKRSLY-----SKCHIK-----	197
	:: .. *.*. . : :	

Los alineamientos se hicieron con el programa CLUSTAL O(1.2.4). Fosforilación por PKC Erizo: 3 Ratón: 5 Total: 8. Fosforilación por PKA Erizo: 3 Ratón: 2 Total: 5. Inicio de región fosforilada por una cinasa (PKA o PKC) sobrepuesta sobre otra secuencia fosforilada por la misma cinasa. Inicio de región fosforilada por PKC sobrepuesta sobre el final de la secuencia fosforilada por PKA o viceversa. Aminoácido conservado (*); Aminoácido conservado (*); Aminoácido con conservación de grupos débil (.) y Aminoácido con conservación de grupos fuerte (:).

Tabla SXI. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus*

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
CatSper1	NP_647462.1	686	4 S	-MDQSSRRD	0.691	PKC
			96 S	RAGVSTLPN	0.506	PKC
			150 S	SHPSTGSH	0.582	PKC
			151 T	HPSSTGSHQ	0.529	PKC
			158 T	HQGTTHQQY	0.727	PKC
			182 S	ADTISYRSS	0.777	PKC
			185 S	ISYRSSTRF	0.539	PKC
			186 S	SYRSSTRFY	0.833	PKC
			187 T	YRSSTRFYR	0.619	PKC
			192 S	RFYRSHAPF	0.600	PKC
			197 S	HAPFSRQER	0.552	PKC
			246 S	HRSPSASQL	0.631	PKA
			248 S	SPSASQLSH	0.603	PKC
			251 S	ASQLSHKSH	0.762	PKC
			254 S	LSHKSHSTL	0.524	PKA
			256 S	HKSHSTLAT	0.733	PKC
			257 T	KSHSTLATS	0.540	PKC
			260 T	STLATSPSH	0.800	PKC
			272 S	KSTASGARY	0.795	PKC
			277 T	GARYTFGAR	0.802	PKC
			293 S	QSRESLRES	0.585	PKC
			297 S	SLRESASLS	0.564	PKA
			322 T	KKAHTGNIF	0.542	PKC
			334 S	WEKISHLLL	0.640	PKA
			346 S	QMILSLTQS	0.522	PKA
			346 S	QMILSLTQS	0.505	PKC
			350 S	SLTQSLGFE	0.508	PKA
			393 S	SIFLSIYVL	0.645	PKA
			470 S	LRRLSILTS	0.870	PKA
			525 T	NIFTTLFTL	0.518	PKA
			539 S	LDDWSLIYI	0.566	PKA
			607 S	LLDDSLTDL	0.543	PKA
			638 T	FGNMTVKQR	0.885	PKC
664 S	QKFRSQAYV	0.541	PKA			
CatSper2	A2ARP9.2	588	25 S	IDTFSLIEH	0.589	PKC

Región transmembranal; Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXIb. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
CatSper3	NP_001239416.1	395	41 T	VPRHTLREI	0.586	PKC
			66 S	LVRFSIKPR	0.605	PKA
			66 S	LVRFSIKPR	0.509	PKC
			78 S	HITHSRLL	0.733	PKC
			83 S	RRLSRLRV	0.647	PKA
			83 S	RRLSRLRV	0.505	PKC
			90 S	RVRC SRMPP	0.678	PKA
			106 S	VLDSSVFSK	0.668	PKC
			109 S	SSVFSKFII	0.559	PKC
			114 S	KFIISLIFL	0.702	PKA
			154 S	FILLSFIVE	0.705	PKC
			186 S	VTLLSLLPE	0.566	PKA
			201 S	VPAHSVWLQ	0.537	PKA
			215 S	RVLRSLKLF	0.721	PKC
			215 S	RVLRSLKLF	0.543	PKA
			238 S	RALKSMTFL	0.515	PKA
			265 S	FREYSRSTI	0.732	PKA
			310 S	KVPESRVF	0.825	PKC
			315 S	SRVFSSIV	0.728	PKA
			316 S	RVFSSIV	0.512	PKA
			376 S	RRQHSESLR	0.825	PKA
			378 S	QHSESLRGT	0.620	PKC
			382 T	SLRGTSLGK	0.567	PKC
			383 S	LRGTSLGKV	0.745	PKA
			454 S	YAKKSYPEK	0.816	PKC
			479 S	YPEKSHPKK	0.501	PKC
			511 S	HSISSHGST	0.598	PKC
			514 S	SSHGSTAAD	0.638	PKC
			553 S	WPRDSLFRY	0.768	PKA
			14 S	VRVKSGLF	0.767	PKA
			30 S	QARLSKIKR	0.924	PKC
			16 S	VKSGSLFAT	0.538	PKA
			50 T	VIKSTFFQI	0.821	PKC
			61 T	ITTVITNSF	0.832	PKC
			64 S	VTNSFLLV	0.546	PKA
			108 T	VDPITYWKD	0.592	PKC
			150 S	DGIQSLRIL	0.665	PKC
			160 S	LISYRGIR	0.701	PKA
			222 S	FTLFLATV	0.626	PKA

Región transmembranal; Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXIc. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
CatSper α	NP_808534.1	442	225 T	FSLATVDGW	0.66	PKC
			242 T	KRKFTVSRA	0.742	PKC
			242 T	KRKFTVSRA	0.633	PKA
			274 S	HTEDSMKKF	0.842	PKC
			311 T	RLMNTQKSG	0.674	PKC
			329 T	GFKKTLRHT	0.623	PKC
			377 S	VNVLSLMLE	0.504	PKA
			387 S	MPKESSSL	0.518	PKA
			2 S	---MSEKHK	0.656	PKC
			89 T	IALRTNSYL	0.502	PKC
			328 T	ARKDTSTVP	0.564	PKA
			330 T	KDTSTVPKE	0.908	PKC
			398 T	LHKYTSKSA	0.637	PKC
			399 S	HKYTSKSAT	0.711	PKC
403 T	SKSATFLSE	0.689	PKC			
441 S	KHKFSH---	0.578	PKA			
CatSper β	NP_766611.2	1109	19 S	VFVFSSGVI	0.534	PKC
			46 T	TGLHTIKLF	0.701	PKC
			91 S	IITNSTFYG	0.607	PKC
			123 T	ITVNTDIAA	0.508	PKC
			218 T	SGFWTYKEC	0.556	PKC
			243 T	HQGLTVIDL	0.684	PKC
			259 S	VILTSLGLY	0.523	PKA
			272 T	LRYPTTSQI	0.502	PKC
			274 S	YPTTSQIKL	0.52	PKC
			279 S	QIKLSRAEF	0.592	PKA
			317 T	YVTITFNRN	0.717	PKC
			346 S	PCVFSTIKN	0.675	PKC
			347 T	CVFSTIKNE	0.712	PKC
			384 T	ETYVTVAML	0.53	PKC
			401 S	PKFPSFHFP	0.51	PKC
			406 S	FHFPSTFTL	0.61	PKA

Región transmembranal; Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXId. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
			407 T	HFPSTFTLP	0.679	PKC
			428 S	YVYGSQIWV	0.56	PKC
			448 S	CNLFSSHVT	0.632	PKC
			452 T	SHHVTKTSN	0.61	PKC
			454 T	HVTKTSNSF	0.78	PKC
			474 T	GRILTTKAG	0.832	PKC
			475 T	RILTTKAGL	0.646	PKC
			480 T	KAGLTTYSE	0.607	PKC
			494 T	DAIFTLYYD	0.597	PKC
			558 T	HVPLTMPTN	0.596	PKC
			571 T	KRFKTIHLG	0.73	PKA
			644 S	IKLLSKNPL	0.62	PKC
			653 S	HELKSTDVE	0.669	PKC
			684 T	SALATMPQA	0.772	PKC
			691 S	QAIKSNLKF	0.558	PKC
			699 S	FTGSWFLY	0.647	PKA
			714 S	GRKWSISTR	0.83	PKA
			716 S	KWSISTRQC	0.702	PKC
			717 T	WSISTRQCN	0.552	PKC
			759 T	KAMSTFPIP	0.61	PKC
			796 S	DIHVSGRFF	0.704	PKC
			804 S	FQKGSTSLA	0.647	PKA
			805 T	QKGSTSLAL	0.531	PKC
			806 S	KGSTSLALV	0.565	PKA
			826 T	TLLPTIKSS	0.742	PKC
			830 S	TIKSSCSYL	0.736	PKA
			832 S	KSSCSYLRT	0.622	PKC
			836 T	SYLRTMHHT	0.677	PKC
			880 S	HMGISIPLT	0.653	PKA
			907 T	KSKETGKYK	0.912	PKC
			917 T	CANVTSRAM	0.687	PKC
			931 S	HQKFHAVVA	0.708	PKC
			1094 S	ALKKSIRGN	0.598	PKC

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXIe. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
CatSper γ	XP_006540153.1	1203	1094 S	ALKKSIRGN	0.518	PKA
			10 T	KRCVTLWVW	0.697	PKA
			23 S	ITKLSKEIK	0.625	PKC
			28 S	KEIKSYNKY	0.533	PKC
			46 S	CSWASGSGS	0.528	PKC
			55 S	SYMVSRPAM	0.511	PKC
			85 S	VLLSLKSW	0.659	PKC
			114 S	GLHLSKDRF	0.603	PKC
			208 S	APMRSTGYC	0.597	PKA
			266 S	KRDASGKSL	0.711	PKA
			288 S	HFRLSKSRP	0.851	PKC
			288 S	HFRLSKSRP	0.502	PKA
			290 S	RLSKSRPLW	0.581	PKA
			296 T	PLWYTVNHA	0.546	PKC
			317 S	ALFSDSNF	0.521	PKA
			372 T	VYYFTGTYS	0.679	PKC
			377 T	GIYSTLFDK	0.774	PKC
			385 S	KSHGSSRWV	0.696	PKC
			410 S	SGNGSEYVL	0.512	PKA
			417 T	VLALTTGKN	0.758	PKC
			418 T	LALTTGKNE	0.736	PKC
			548 S	FILQSYNRE	0.746	PKC
			564 S	FPKESTIKY	0.594	PKC
			565 T	PKESTIKYM	0.584	PKC
			572 S	YMVNSFKGQ	0.765	PKC
			607 T	QGWRTYLKL	0.562	PKC
			683 T	MITFTNTCP	0.559	PKC
			703 S	KQHASRTES	0.61	PKA
			707 S	SRTESYVAL	0.59	PKA
			726 T	HNNNTLAVY	0.54	PKC
742 S	LWLHSKYDK	0.518	PKC			
764 T	WQHKTCKDK	0.629	PKC			

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXIf. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
CatSper δ	NP_780559.2	805	775 S	FYLFSNRLA	0.544	PKC
			797 S	LYNMSGDYG	0.529	PKA
			828 T	QDTFTSSDS	0.625	PKC
			836 T	SQGPTINVD	0.544	PKC
			844 S	DKKLSLSLV	0.828	PKA
			846 S	KLSLSLVLA	0.571	PKA
			872 T	NLLTKIKV	0.896	PKC
			883 S	KKRCSEQGM	0.72	PKA
			895 T	NIKKTSMIL	0.73	PKC
			943 T	DVSYTIKHS	0.565	PKC
			993 S	SFLGSYVLK	0.654	PKC
			1007 T	RTLNTIRDY	0.795	PKC
			1021 S	FRYNSPLDT	0.621	PKA
			1028 S	DTTNSLIWK	0.695	PKC
			1092 T	VDNSTYCDY	0.559	PKC
			1099 T	DYKLTIVH	0.749	PKC
			1110 S	GLPLSSKRS	0.857	PKC
			1111 S	LPLSSKRSS	0.714	PKC
			1114 S	SSKRSSFIV	0.575	PKA
			1115 S	SKRSSFIVM	0.677	PKC
			1115 S	SKRSSFIVM	0.629	PKA
			1148 S	KAWVSRWK	0.868	PKC
			1161 T	MAPETYSSS	0.727	PKC
			1167 S	SSSSSSGGF	0.624	PKC
			1172 T	SGGFTLHSH	0.683	PKC
			12 T	AAVATMVRA	0.508	PKC
			18 T	VRAHTLCRV	0.626	PKC
			18 T	VRAHTLCRV	0.553	PKA
			24 T	CRVHTVRTG	0.653	PKC
			27 T	HTVRTGKVF	0.924	PKC
			33 S	KVFKSNIQL	0.604	PKA
			83 T	LLPLTVPKS	0.623	PKC

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXlg. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
			102 S	AHFVSGSLV	0.639	PKA
			104 S	FVSGSLVLF	0.582	PKA
			116 S	GKGYSDYY	0.531	PKA
			123 T	YYENTWRKL	0.621	PKC
			147 S	CFKGSFCLE	0.637	PKA
			168 T	QIPGTNIYF	0.741	PKC
			185 T	QLMNTDKLS	0.594	PKC
			194 T	HLTGTLGGI	0.655	PKC
			218 T	NNLGIFHYM	0.51	PKC
			235 S	GIAFSYKNL	0.813	PKC
			263 S	SILVSSNSG	0.579	PKC
			322 T	SYMGTYVIK	0.623	PKC
			337 T	WSTHTSIYF	0.641	PKC
			367 T	FDKCTVNVQ	0.699	PKC
			404 S	IDMNSKLLK	0.539	PKC
			449 S	FDGNSKYKL	0.591	PKA
			466 S	HWGNSDFNF	0.676	PKA
			473 S	NFTASIKRH	0.844	PKC
			480 S	RHAISSVTV	0.521	PKA
			481 S	HAISSVTVD	0.795	PKC
			501 T	KPLSTLISV	0.735	PKC
			504 S	STLISV GCD	0.547	PKC
			510 T	GCDMTKKIV	0.525	PKC
			609 T	NGLVTYSYS	0.595	PKC
			611 S	LVTYSYSLT	0.635	PKA
			708 S	NTIFSVYVH	0.762	PKC
CatSper ϵ	P0DP43	985	3 S	MPSAGQR	0.555	PKC
			11 S	RKPGSLAL	0.727	PKA
			64 S	YSIFSTRSS	0.85	PKC
			65 T	SIFSTRSSI	0.731	PKC
			68 S	STRSSIKLE	0.682	PKA
			68 S	STRSSIKLE	0.668	PKC
			80 S	NSFVSWKIP	0.506	PKC
			86 S	KIPESCKVE	0.715	PKC
			93 T	VENTTSPKT	0.56	PKC
			97 T	TSPKTLHC	0.553	PKC
			98 T	SPKTLHCK	0.567	PKC
			123 T	ERHLTVDNS	0.512	PKA

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXIh. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
			166 T	ELIWTAKKP	0.763	PKC
			171 S	AKKPSLSSR	0.793	PKA
			173 S	KPSLSSRVL	0.654	PKC
			174 S	PSLSSRVLT	0.617	PKC
			178 T	SRVLTQMN	0.621	PKC
			183 T	KQMNTLGQR	0.751	PKC
			192 T	PFIFTVEKR	0.805	PKC
			297 T	DSFQWTRV	0.514	PKC
			299 T	FQWTRVRA	0.598	PKC
			315 S	AQRHSLRDV	0.62	PKA
			333 T	LVDGTVYLR	0.509	PKC
			333 T	LVDGTVYLR	0.508	PKA
			352 S	SRGSETGI	0.657	PKA
			360 S	ILGFSKRRW	0.777	PKC
			375 S	YKLASKKSI	0.904	PKC
			387 T	WSKTTVYAG	0.521	PKC
			394 T	AGYATFRFV	0.704	PKC
			399 T	FRFVTLTDT	0.575	PKA
			401 T	FVILDTAK	0.773	PKC
			444 T	SVCTNTRN	0.577	PKC
			460 T	AIFQWTLQ	0.531	PKA
			499 S	HVYYSYKNF	0.909	PKC
			532 T	HQVLTDRIG	0.639	PKC
			562 T	VILHTWVNT	0.653	PKC
			597 T	YQLQTQPYP	0.775	PKC
			638 S	DKGESLTIW	0.553	PKA
			663 S	HYGSSVMTW	0.665	PKC
			663 S	HYGSSVMTW	0.648	PKA
			666 T	SSVMWTQTN	0.545	PKC
			681 T	SGFCTKTM	0.538	PKC
			691 T	RFFQTTNVE	0.53	PKC
			718 S	QFRPSEFSR	0.543	PKA
			726 T	RTCLTAKPV	0.802	PKC
			739 S	VGCDSSKYI	0.653	PKC
			759 S	RRDFSVID	0.604	PKA
			770 S	LLRESLSDN	0.652	PKA
			936 S	MIPRSSVYL	0.566	PKA
			937 S	IPRSSVYLV	0.818	PKA
			951 T	VLMLTFISI	0.618	PKC
			954 S	LTFSILVL	0.533	PKA

Región transmembranal; Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXI. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
CatSper ζ	NP_001034583.1	194	4 S	MESVVKPV	0.633	PKC
			18 S	HRRSSVRSS	0.921	PKC
			18 S	HRRSSVRSS	0.763	PKA
			22 S	SVRSSLYGD	0.697	PKA
			65 S	IRKYSQTIS	0.695	PKA
			69 S	SQTISIRDS	0.585	PKC
			73 S	SIRDSLNLE	0.794	PKA
			121 S	SLIFSLWKP	0.678	PKC
			159 T	KALITYRST	0.881	PKC
			162 S	ITYRSTIGR	0.534	PKC
163 T	TYRSTIGRN	0.81	PKC			
EFCAB9	NP_081307.2	216	22 S	YCLLSLRNV	0.85	PKC
			43 T	HHRNTLNDV	0.652	PKA
			107 S	MYRHSRPVF	0.689	PKA
			169 T	TIFCTDKSI	0.548	PKC
			172 S	CTDKSIDRK	0.726	PKC
			208 S	KIYSSMLSH	0.629	PKC
			211 S	SSMLSHRSI	0.788	PKC

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXII. Resumen de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus*

Subunidad	No. Identificación	No. aa	No. sitios de fosforilación	
			Por PKA	Por PKC
CatSper1	NP_647462.1	686	12	22
CatSper2	A2ARP9.2	588	14	16
CatSper3	NP_001239416.1	395	8	10
CatSper4	NP_808534.1	442	2	6
CatSper β	NP_766611.2	1109	11	39
CatSper γ	XP_006540153.1	1203	16	40
CatSper δ	NP_780559.2	805	10	23
CatSper ϵ	NP_780559.2	985	17	35
CatSper ζ	NP_001034583.1	194	4	7
EFCAB9	NP_081307.2	216	2	5
Total de sitios de fosforilación			96	203

Fosforilados por PKA; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXIII. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *S. purpuratus*

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
Catsper1	XP_011664201	474	55 T	ARRQTMLGP	0.563	PKA
			91 S	KRLDSMRSA	0.713	PKC
			160 T	LCALTFSVI	0.729	PKC
			162 S	ALTFSVIKV	0.557	PKC
			251 T	RVLKTVRFL	0.820	PKC
			268 S	TCLESVQSM	0.505	PKC
			280 S	IMLISLFLY	0.606	PKA
			307 S	GNIGSAALT	0.653	PKA
			368 T	NFQLTLDA	0.557	PKC
			408 S	PTLSSLSNA	0.637	PKC
			408 S	PTLSSLSNA	0.522	PKA
			431 S	DYSTSEKKY	0.714	PKC
			437 S	KKYLSHFLQ	0.508	PKA
			459 T	NQQGTLDKV	0.666	PKC
			Catsper2	XP_011679404.1	512	29 S
40 S	HLLESFDDH	0.712				PKC
81 T	FHAYTRKDN	0.777				PKC
134 S	ILANSLSLG	0.612				PKA
136 S	ANSLSLGLL	0.630				PKA
197 T	DFVVTVASF	0.582				PKC
283 S	YSRSMRDD	0.546				PKC
326 S	KVMGSVAPT	0.651				PKC
326 S	KVMGSVAPT	0.622				PKA
341 S	ICIGSFIFK	0.833				PKC
396 T	QELNTGRRV	0.825				PKC
401 S	GRRVSSMKL	0.871				PKA
402 S	RRVSSMKLL	0.622				PKA
425 S	RDRKSHKSV	0.725				PKC
428 S	KSHKSVASS	0.625				PKC
440 S	FRRVSRMMG	0.838				PKA
450 S	ITKKS GDWE	0.550				PKA
450 S	ITKKS GDWE	0.535	PKC			
Catsper3	XP_011666090	392	16 S	SRQSDLIH	0.573	PKA
			71 T	ETGDTIKAK	0.757	PKC
			109 S	KYFYSAYNL	0.630	PKA
			144 T	SALRTLRL	0.783	PKC
			150 T	RALRTLRTL	0.551	PKC
			153 T	RTLRTLRTV	0.800	PKC
			156 T	RTLRTVSFV	0.828	PKC
			158 S	LRTVSFVKG	0.659	PKA
			177 S	TLRNSVFNV	0.798	PKA
			245 S	LTEMSRIYT	0.578	PKA
			261 T	HFIFTNVFI	0.597	PKC
			363 T	HQDNTMYRL	0.569	PKC
Catsper4	XP_011682209.1	323	29 S	VRRASKQFG	0.839	PKA
			54 S	NKLGSRNKN	0.903	PKC
			143 T	IGAQTNREL	0.610	PKC
			208 S	KFLGSSRIL	0.561	PKC
			209 S	FLGSSRILR	0.723	PKA
			225 S	FRNMSNIAL	0.818	PKA
			263 S	SAMFSLFIC	0.542	PKA
301 S	ITIGSFVFA	0.609	PKC			

Región transmembranal; Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXIIIb. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *S. purpuratus* (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa			
Catsper β	XP_011679115.1	461	34 S	EIVGSGMRL	0.548	PKA			
			41 T	RLITNMRS	0.636	PKC			
			45 S	TNMRSLSDG	0.524	PKA			
			47 S	MRLSDGTL	0.754	PKA			
			93 S	MTPHSSVAK	0.509	PKC			
			94 S	TPHSSVAKQ	0.759	PKC			
			124 S	QIWQSDKAM	0.795	PKC			
			130 S	KAMLSVRVI	0.883	PKC			
			143 T	IHVQTRRSY	0.756	PKC			
			146 S	QTRRSYNRY	0.749	PKC			
			158 T	TAFITVRHR	0.693	PKC			
			179 S	IPSASLRCD	0.631	PKC			
			184 S	LRCDVSFT	0.715	PKA			
			188 T	SVSFTFMH	0.582	PKC			
			190 T	SFTFTMHCT	0.607	PKC			
			198 T	TCPPTKRLH	0.634	PKC			
			226 S	RKNQSLST	0.628	PKA			
			226 S	RKNQSLST	0.502	PKC			
			229 S	QSLSTLDV	0.516	PKC			
			230 T	SLLSTLDVN	0.516	PKC			
			244 S	RLGISVPLT	0.584	PKA			
			271 S	VSKGSGYYK	0.762	PKC			
			295 S	EMRLSSLEL	0.714	PKA			
			296 S	MRLSSLELF	0.691	PKA			
			311 T	VYRITYTEN	0.711	PKA			
			311 T	VYRITYTEN	0.531	PKC			
			339 T	PYLTIKEV	0.804	PKC			
			386 T	KFRATQLYH	0.508	PKC			
			394 T	HFRLTVIDG	0.745	PKC			
			448 S	YVRKSQLHR	0.622	PKA			
			448 S	YVRKSQLHR	0.532	PKC			
			455 S	HRTRSNMAL	0.704	PKA			
			Catsper γ	XP_011679048.1	717	12 S	HLLSEKED	0.641	PKC
						19 T	EDLQTIKDN	0.820	PKC
						42 T	GETETLRYF	0.620	PKC
						84 S	KTLPSTIYL	0.574	PKA
						148 S	EVTLSDKGA	0.563	PKC
						175 S	HVWHSTFSC	0.595	PKC
						178 S	HSTFSCFIK	0.771	PKC
						220 T	DVLQTTFFYY	0.530	PKC
						382 S	MDIGKSAV	0.540	PKC
						420 T	DVLQTTFFYY	0.530	PKC
						582 S	MDIGKSAV	0.540	PKC
						622 T	KASCTRRDR	0.844	PKC
						627 T	RRDRTRRVV	0.740	PKC
627 T	RRDRTRRVV	0.546				PKA			
659 S	PIGLSTTST	0.566				PKC			
659 S	PIGLSTTST	0.513				PKA			
663 T	STTSTVIER	0.832				PKC			
701 S	HRTNSLHHR	0.752				PKC			
701 S	HRTNSLHHR	0.619				PKA			
706 S	LHRSVSSN	0.563				PKA			
708 S	HRSVSSNIL	0.608	PKA						
Catsper δ	XP_011683737.1	342	12 T	FFAFTNKQL	0.785	PKC			
			48 S	YDLDSRNAS	0.579	PKC			
			52 S	SRNASTSSL	0.763	PKA			
			55 S	ASTSSLVYL	0.648	PKA			
			101 S	DIGHSILR	0.599	PKA			
107 S	ILRASFIPI	0.571	PKC						

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXIIIc. Total de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *S. purpuratus* (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
Catsper ε	XP_011664202.2	489	111 S	SFIPSLWQN	0.742	PKC
			131 S	IITVSTSLT	0.572	PKA
			131 S	IITVSTSLT	0.540	PKC
			150 S	KIEVSASIS	0.512	PKA
			156 T	SISLTGDQP	0.583	PKC
			173 T	DGLTTVTFT	0.555	PKC
			177 T	TVTFTTAEP	0.633	PKC
			196 S	HAYVSAGCP	0.631	PKC
			204 T	PPEKTIRAR	0.676	PKC
			215 S	LKRESCEYL	0.704	PKA
			267 S	QSYYSDBGYK	0.546	PKC
			306 T	DYLMTAKQA	0.859	PKC
			313 T	QAGCTQRPQ	0.807	PKC
			318 S	QRPQSWVEM	0.699	PKA
			328 T	TLQNTTKDP	0.511	PKC
			21 T	IKQLTVTMD	0.562	PKC
			39 T	NVLYTSQYH	0.615	PKC
			52 S	IKHSSLAVP	0.591	PKA
			84 S	AERTSYSLK	0.531	PKA
			86 S	RTSYSLKAD	0.799	PKC
			93 S	ADMGSIVNQ	0.565	PKA
			124 S	DLRDSAIW	0.646	PKA
			143 T	NDIETVINR	0.752	PKC
165 S	FNPGSKLIK	0.632	PKC			
176 S	FRVRSNFLF	0.637	PKA			
243 S	QDYGSYIIN	0.594	PKC			
250 S	INRRSYVQE	0.627	PKA			
279 T	PIILTVKDV	0.867	PKC			
316 T	RHDFTYTAS	0.542	PKC			
320 S	TYTASMQSA	0.555	PKC			
332 T	RLAQTWEKM	0.784	PKC			
436 S	LLRISLGF	0.846	PKA			
439 T	ISLGFAGL	0.8	PKC			
444 T	FAGLTGSIL	0.566	PKA			
451 T	ILIATYFYY	0.542	PKC			
Catsper ε	XP_030855090.1	421	27 S	FGGQSKLAN	0.718	PKC
			50 S	ATLFLSTRLP	0.642	PKC
			159 T	EMKQTAIKP	0.693	PKC
			164 S	AIKPSKFSE	0.518	PKA
			167 S	PSKFSERLT	0.754	PKC
			171 T	SERLTKIFA	0.76	PKC
			215 S	YVRVSRCKA	0.668	PKC
			225 S	RVQVSGKPS	0.708	PKC
			229 S	SGKPSVASH	0.728	PKC
			240 T	FIRDTKAVI	0.616	PKC
			260 T	EGSLTLKGQ	0.585	PKC
			291 T	QCVFTTDGF	0.582	PKC
			343 T	RSSGTFMRL	0.781	PKC
			348 T	FMRLTEFQV	0.539	PKA
393 S	ELLQSIQVS	0.54	PKC			
EFCAB9	XP_003728906.1	215	21 T	YGMLTGKNV	0.733	PKC
			92 S	CILISLKDK	0.742	PKC
			106 S	IYRHSRTVF	0.666	PKA
			106 S	IYRHSRTVF	0.52	PKC
			210 S	WLRSSCTI	0.545	PKA
211 S	LRTSSCTIV	0.797	PKA			

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXIV. Resumen de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *S. purpuratus*

Subunidad	No. Identificación	No. aa	No. sitios de fosforilación	
			Por PKA	Por PKC
Catsper1	XP_011664201	474	5	9
Catsper2	XP_011679404.1	512	8	10
Catsper3	XP_011666090	392	5	7
Catsper4	XP_011682209.1	323	4	4
Catsper β	XP_011679115.1	461	11	21
Catsper γ	XP_011679048.1	717	6	15
Catsper δ	XP_011683737.1	342	7	14
Catsper ϵ	XP_011664202.2	489	8	12
Catsper ϵ	XP_003728906.1	421	2	13
EFCAB9	XP_003728906.1	139	3	3
Total de sitios de fosforilación			59	108

Forsforilados por PKA; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>

Tabla SXV. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *S. purpuratus* sin considerar las regiones transmembranales

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
Catsper1	XP_011664201	474	55 T	ARRQTMLGP	0.563	PKA
			91 S	KRLDSMRSA	0.713	PKC
			408 S	PTLSSLSNA	0.637	PKC
			408 S	PTLSSLSNA	0.522	PKA
			431 S	DYSTSEKKY	0.714	PKC
			437 S	KKYLSHFLQ	0.508	PKA
			459 T	NQQGTLDKV	0.666	PKC
Catsper2	XP_011679404.1	512	29 S	EIFRSKLIE	0.533	PKA
			40 S	HLLESFDDH	0.712	PKC
			81 T	FHAYTRKDN	0.777	PKC
			134 S	ILANSLSLG	0.612	PKA
			136 S	ANSLSLGLL	0.630	PKA
			396 T	QELNTGRRV	0.825	PKC
			401 S	GRRVSSMKL	0.871	PKA
			402 S	RRVSSMKLL	0.622	PKA
			425 S	RDRKSHKSV	0.725	PKC
			428 S	KSHKSVASS	0.625	PKC
			440 S	FRRVSRMMG	0.838	PKA
			450 S	ITKKS GDWE	0.550	PKA
450 S	ITKKS GDWE	0.535	PKC			
Catsper3	XP_011666090	392	16 S	SRQDSLII	0.573	PKA
			363 T	HQDNTMYRL	0.569	PKC
Catsper4	XP_011682209.1	323	29 S	VRRASKQFG	0.839	PKA
			54 S	NKLGSRNKN	0.903	PKC
Catsper β	XP_011679115.1	461	34 S	EIVGSGMRL	0.548	PKA
			41 T	RLITNMRS	0.636	PKC
			45 S	TNMRLSDG	0.524	PKA
			47 S	MRLSDGTL	0.754	PKA
			93 S	MTPHSSVAK	0.509	PKC
			94 S	TPHSSVAKQ	0.759	PKC
			124 S	QIWQSDKAM	0.795	PKC
			130 S	KAMLSVRVI	0.883	PKC
			143 T	IHVQTRRSY	0.756	PKC
			146 S	QTRRSYNRY	0.749	PKC
			158 T	TAFITVRHR	0.693	PKC
179 S	IPSASLRCD	0.631	PKC			

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVb. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *S. purpuratus* sin considerar las regiones transmembranales (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa			
Catsper γ	XP_011679048.1	717	184 S	LRCDSVSFT	0.715	PKA			
			188 T	SVSFTFTMH	0.582	PKC			
			190 T	SFTFTMHCT	0.607	PKC			
			198 T	TCPPTKRLH	0.634	PKC			
			226 S	RKNQSLST	0.628	PKA			
			226 S	RKNQSLST	0.502	PKC			
			229 S	QSLSTLDV	0.516	PKC			
			230 T	SLLSTLDVN	0.516	PKC			
			244 S	RLGISVPLT	0.584	PKA			
			271 S	VSKGSGYYK	0.762	PKC			
			295 S	EMRLSSLEL	0.714	PKA			
			296 S	MRLSSLELF	0.691	PKA			
			311 T	VYRITYTEN	0.711	PKA			
			311 T	VYRITYTEN	0.531	PKC			
			339 T	PYILTIKEV	0.804	PKC			
			386 T	KFRATQLYH	0.508	PKC			
			394 T	HFRLTVIDG	0.745	PKC			
			448 S	YVRKSQLHR	0.622	PKA			
			448 S	YVRKSQLHR	0.532	PKC			
			455 S	HRTRSNMAL	0.704	PKA			
			12 S	HLLSEKED	0.641	PKC			
			19 T	EDLQTIKDN	0.820	PKC			
			42 T	GETETLRYF	0.620	PKC			
			84 S	KTLPSTIYL	0.574	PKA			
			148 S	EVTLSDKGA	0.563	PKC			
			175 S	HVWHSTFSC	0.595	PKC			
			178 S	HSTFSCFIK	0.771	PKC			
			220 T	DVLQTTFY	0.530	PKC			
			382 S	MDIGSKSAV	0.540	PKC			
			420 T	DVLQTTFY	0.530	PKC			
			582 S	MDIGSKSAV	0.540	PKC			
			622 T	KASCTRRDR	0.844	PKC			
			627 T	RRDRTRRVV	0.740	PKC			
			627 T	RRDRTRRVV	0.546	PKA			
			659 S	PIGLSTTST	0.566	PKC			
			659 S	PIGLSTTST	0.513	PKA			
			663 T	STTSTVIER	0.832	PKC			
			701 S	HRTNSLHHR	0.752	PKC			
			701 S	HRTNSLHHR	0.619	PKA			
			706 S	LHRSVSSN	0.563	PKA			
			708 S	HRSVSSNIL	0.608	PKA			
			Catsper δ	XP_011683737.1	342	12 T	FFAFTNKQL	0.785	PKC
						48 S	YDLDSRNAS	0.579	PKC

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVc. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *S. purpuratus* sin considerar las regiones transmembranales (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
Catsper ϵ	XP_011664202.2	489	52 S	SRNASTSSL	0.763	PKA
			55 S	ASTSSLVYL	0.648	PKA
			101 S	DIGHSLILR	0.599	PKA
			107 S	ILRASFIPS	0.571	PKC
			111 S	SFIPSLWQN	0.742	PKC
			131 S	IITVSTSLT	0.572	PKA
			131 S	IITVSTSLT	0.540	PKC
			150 S	KIEVSASIS	0.512	PKA
			156 T	SISLTGDQP	0.583	PKC
			173 T	DGLTTVTFT	0.555	PKC
			177 T	TVTFTTAEP	0.633	PKC
			196 S	HAYVSAGCP	0.631	PKC
			204 T	PPEKTIRAR	0.676	PKC
			215 S	LKRESCEYL	0.704	PKA
			267 S	QSYSDGYK	0.546	PKC
			306 T	DYLMTAKQA	0.859	PKC
			313 T	QAGCTQRPQ	0.807	PKC
			318 S	QRPQSWVEM	0.699	PKA
			328 T	TLQNTTKDP	0.511	PKC
			21 T	IKQLVTMD	0.562	PKC
			39 T	NVLYTSQYH	0.615	PKC
			52 S	IKHSSLAVP	0.591	PKA
			84 S	AERTSYSLK	0.531	PKA
			86 S	RTSYSLKAD	0.799	PKC
			93 S	ADMGSIVNQ	0.565	PKA
			124 S	DLRDSAIW	0.646	PKA
			143 T	NDIETVINR	0.752	PKC
			165 S	FNPGSKLIK	0.632	PKC
			176 S	FRVRSNFLF	0.637	PKA
			243 S	QDYGSYIIN	0.594	PKC
			250 S	INRRSYVQE	0.627	PKA
			279 T	PIILTVKDV	0.867	PKC
316 T	RHDFTYTAS	0.542	PKC			
320 S	TYTASMQSA	0.555	PKC			
332 T	RLAQTWEKM	0.784	PKC			
436 S	LLRISLGTf	0.846	PKA			
439 T	ISLGTfAGL	0.8	PKC			
444 T	FAGLTGSIL	0.566	PKA			
451 T	ILIATYFYF	0.542	PKC			
Catsper ϵ	XP_030855090.1	421	27 S	FGGQSKLAN	0.718	PKC
			50 S	ATLFSTRLP	0.642	PKC
			159 T	EMKQTAIKP	0.693	PKC
			164 S	AIKPSKFSE	0.518	PKA

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVd. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *S. purpuratus* sin considerar las regiones transmembranales (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
EFCAB9	XP_003728906.1	215	167 S	PSKFSERLT	0.754	PKC
			171 T	SERLTKIFA	0.76	PKC
			215 S	YVRVSRCKA	0.668	PKC
			225 S	RVQVSGKPS	0.708	PKC
			229 S	SGKPSVASH	0.728	PKC
			240 T	FIRDTKAVI	0.616	PKC
			260 T	EGSLTLKGQ	0.585	PKC
			291 T	QCVFTTDGF	0.582	PKC
			343 T	RSSGTFMRL	0.781	PKC
			348 T	FMRLTEFQV	0.539	PKA
			393 S	ELLQSIQVS	0.54	PKC
			21 T	YGMLTGKNV	0.733	PKC
			92 S	CILISLKDK	0.742	PKC
			106 S	IYRHSRTVF	0.666	PKA
			106 S	IYRHSRTVF	0.52	PKC
			210 S	WLRTSSCTI	0.545	PKA
			211 S	LRTSSCTIV	0.797	PKA

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVI. Resumen de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC (probabilidad ≥ 0.8) en las subunidades de CatSper de *S. purpuratus* sin considerar las regiones transmembranales

Subunidad	No. Identificación	No. sitios de fosforilación	
		Por PKA	Por PKC
CatSper1	NP_647462.1	0	7
CatSper1	XP_011664201	0	0
CatSper2	A2ARP9.2	2	1
CatSper2	XP_011679404.1	2	2
CatSper3	NP_001239416.1	1	2
CatSper3	XP_011666090	0	0
CatSper4	NP_808534.1	0	1
CatSper4	XP_011682209.1	1	1
CatSper β	NP_766611.2	1	4
CatSper β	XP_011679115.1	1	6
CatSper γ	XP_006540153.1	1	8
CatSper γ	XP_011679048.1	0	5
CatSper δ	NP_780559.2	0	5
CatSper δ	XP_011683737.1	1	3
CatSper ϵ	NP_780559.2	1	10
Catsper ϵ	XP_011664202.2	1	5
Catsper ϵ	XP_003728906.1	0	3
CatSper ζ	NP_001034583.1	2	3
Ausente	s.n.	0	0
EFCAB9	NP_081307.2	0	2
EFCAB9	XP_003728906.1	1	0
Total de sitios de fosforilación en <i>M. musculus</i>		8	43
Total de sitios de fosforilación en <i>S. purpuratus</i>		7	25

Fosforilados por PKA; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVII. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* sin considerar las regiones transmembranales

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa			
CatSper1	NP_647462.1	686	4 S	-MDQSSRRD	0.691	PKC			
			96 S	RAGVSTLPN	0.506	PKC			
			150 S	SHPSSTGSH	0.582	PKC			
			151 T	HPSSTGSHQ	0.529	PKC			
			158 T	HQGTTHQQY	0.727	PKC			
			182 S	ADTISYRSS	0.777	PKC			
			185 S	ISYRSSTRF	0.539	PKC			
			186 S	SYRSSTRFY	0.833	PKC			
			187 T	YRSSTRFYR	0.619	PKC			
			192 S	RFYRSHAPF	0.600	PKC			
			197 S	HAPFSRQER	0.552	PKC			
			246 S	HRSASASQL	0.631	PKA			
			248 S	SPSASQLSH	0.603	PKC			
			251 S	ASQLSHKSH	0.762	PKC			
			254 S	LSHKSHSTL	0.524	PKA			
			256 S	HKSHSTLAT	0.733	PKC			
			257 T	KSHSTLATS	0.540	PKC			
			260 T	STLATSPSH	0.800	PKC			
			272 S	KSTASGARY	0.795	PKC			
			277 T	GARYTFGAR	0.802	PKC			
			293 S	QSRESLRES	0.585	PKC			
			297 S	SLRESASLS	0.564	PKA			
			322 T	KKAHGTGNIF	0.542	PKC			
			334 S	WEKISHLLL	0.640	PKA			
			346 S	QMILSLTQS	0.522	PKA			
			346 S	QMILSLTQS	0.505	PKC			
			638 T	FGNMTVKQR	0.885	PKC			
			664 S	QKFRSQAYV	0.541	PKA			
			CatSper2	A2ARP9.2	588	25 S	IDTFSLIEH	0.589	PKC
						41 T	VPRHTLREI	0.586	PKC
66 S	LVRFSIKPR	0.605				PKA			
66 S	LVRFSIKPR	0.509				PKC			
78 S	HITHSRLL	0.733				PKC			
83 S	RRLSRLRV	0.647				PKA			
83 S	RRLSRLRV	0.505				PKC			
90 S	RVRCRMPP	0.678				PKA			
376 S	RRQHSESLR	0.825				PKA			
378 S	QHSESLRGT	0.620				PKC			

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVIIb. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* sin considerar las regiones transmembranales (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
CatSper3	NP_001239416.1	395	382 T	SLRGTSLGK	0.567	PKC
			383 S	LRGTSLGKV	0.745	PKA
			454 S	YAKKSYPEK	0.816	PKC
			479 S	YPEKSHPKK	0.501	PKC
			511 S	HSISSHGST	0.598	PKC
			514 S	SSHGSTAAD	0.638	PKC
			553 S	WPRDSLFRY	0.768	PKA
			14 S	VRVKSGSLF	0.767	PKA
			16 S	VKSGSLFAT	0.538	PKA
			30 S	QARLSKIKR	0.924	PKC
			274 S	HTEDSMKKF	0.842	PKC
			311 T	RLMNTQKSG	0.674	PKC
			329 T	GFKKTLRHT	0.623	PKC
			377 S	VNVLSLMLE	0.504	PKA
387 S	MPKESSSL	0.518	PKA			
CatSper4	NP_808534.1	442	2 S	---MSEKHK	0.656	PKC
			328 T	ARKDTSTVP	0.564	PKA
			330 T	KDTSTVPKE	0.908	PKC
			398 T	LHKYTSKSA	0.637	PKC
			399 S	HKYTSKSAT	0.711	PKC
			403 T	SKSATFLSE	0.689	PKC
			441 S	KHKFSH---	0.578	PKA
CatSper β	NP_766611.2	1109	46 T	TGLHTIKLF	0.701	PKC
			123 T	ITVNTDIAA	0.508	PKC
			218 T	SGFWTYKEC	0.556	PKC
			272 T	LRYPPTSQI	0.502	PKC
			274 S	YPTTSQIKL	0.52	PKC
			279 S	QIKLSRAEF	0.592	PKA
			317 T	YVTIIFNRN	0.717	PKC
			346 S	PCVFSTIKN	0.675	PKC
			347 T	CVFSTIKNE	0.712	PKC
			384 T	ETYVTVAML	0.53	PKC
			401 S	PKFPSFHFP	0.51	PKC
			406 S	FHFPSFTIL	0.61	PKA
			407 T	HFPSTFTLP	0.679	PKC
			428 S	YVYGSQIWV	0.56	PKC
			448 S	CNLFSSHVT	0.632	PKC
			452 T	SHHVTKTSN	0.61	PKC
			454 T	HVTKTSNSF	0.78	PKC
			474 T	GRILTTKAG	0.832	PKC
475 T	RILTTKAGL	0.646	PKC			
480 T	KAGLTTYSE	0.607	PKC			

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVIIc. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* sin considerar las regiones transmembranales (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
			494 T	DAIFTLYYD	0.597	PKC
			558 T	HVPLTMPN	0.596	PKC
			571 T	KRFKTIHLG	0.73	PKA
			644 S	IKLLSKNPL	0.62	PKC
			653 S	HELKSTDVE	0.669	PKC
			684 T	SALATMPQA	0.772	PKC
			691 S	QAIKSNLKF	0.558	PKC
			699 S	FLTGSWFLY	0.647	PKA
			714 S	GRKWSISTR	0.83	PKA
			716 S	KWSISTRQC	0.702	PKC
			717 T	WSISTRQCN	0.552	PKC
			759 T	KAMSTFPIP	0.61	PKC
			796 S	DIHVSGRFF	0.704	PKC
			804 S	FQKGSTSLA	0.647	PKA
			805 T	QKGSTSIAL	0.531	PKC
			806 S	KGSTSLALV	0.565	PKA
			826 T	TLLPTIKSS	0.742	PKC
			830 S	TKSSCSYL	0.736	PKA
			832 S	KSSCSYLRT	0.622	PKC
			836 T	SYLRTMHHT	0.677	PKC
			880 S	HMGSIPLT	0.653	PKA
			907 T	KSKETGKYK	0.912	PKC
			917 T	CANVTSRAM	0.687	PKC
			931 S	HQKFSHAVA	0.708	PKC
			1094 S	ALKKSIRGN	0.598	PKC
			1094 S	ALKKSIRGN	0.518	PKA
CatSper Y	XP_006540153.1	1203	10 T	KRCVTLVWW	0.697	PKA
			23 S	ITKLSKEIK	0.625	PKC
			28 S	KEIKSYNKY	0.533	PKC
			46 S	CSWASGSGS	0.528	PKC
			55 S	SYMVSRPAM	0.511	PKC
			85 S	VLLLSLKSW	0.659	PKC
			114 S	GLHLSKDRF	0.603	PKC
			208 S	APMRSTGYC	0.597	PKA
			266 S	KRDASGKSL	0.711	PKA
			288 S	HFRLSKSRP	0.851	PKC
			288 S	HFRLSKSRP	0.502	PKA
			290 S	RLSKSRPLW	0.581	PKA
			296 T	PLWYTVNHA	0.546	PKC
			317 S	AILFSDSNF	0.521	PKA
			372 T	VYYFTGTYS	0.679	PKC
			377 T	GTYSTLFDK	0.774	PKC
			385 S	KSHGSSRWV	0.696	PKC
			410 S	SGNGSEYVL	0.512	PKA

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVIIId. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* sin considerar las regiones transmembranales (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
			417 T	VLALTTGKN	0.758	PKC
			418 T	LALTTGKNE	0.736	PKC
			548 S	FILQSYNRE	0.746	PKC
			564 S	FPKESTIKY	0.594	PKC
			565 T	PKESTIKYM	0.584	PKC
			572 S	YMVNSFKGQ	0.765	PKC
			607 T	QGWRTYLKL	0.562	PKC
			683 T	MITFINTCP	0.559	PKC
			703 S	KQHASRTES	0.61	PKA
			707 S	SRTESYVAL	0.59	PKA
			726 T	HNNNTLAVY	0.54	PKC
			742 S	LWLHSKYDK	0.518	PKC
			764 T	WQHKTCKDKD	0.629	PKC
			775 S	FYLFSNRLA	0.544	PKC
			797 S	LYNMSGDYG	0.529	PKA
			828 T	QDIFTSSDS	0.625	PKC
			836 T	SQGPITNVD	0.544	PKC
			844 S	DKKLSLSLV	0.828	PKA
			846 S	KLSSLSVLA	0.571	PKA
			872 T	NTLLTKIKV	0.896	PKC
			883 S	KKRCSEQGM	0.72	PKA
			895 T	NIKKTSMIL	0.73	PKC
			943 T	DVSYTIKHS	0.565	PKC
			993 S	SFLGSYVLK	0.654	PKC
			1007 T	RTLNTIRDY	0.795	PKC
			1021 S	FRYNSPLDT	0.621	PKA
			1028 S	DTNSLIWK	0.695	PKC
			1092 T	VDNSTYCDY	0.559	PKC
			1099 T	DYKLTFFIVH	0.749	PKC
			1110 S	GLPLSSKRS	0.857	PKC
			1111 S	LPLSSKRSS	0.714	PKC
			1114 S	SSKRSSFIV	0.575	PKA
			1115 S	SKRSSFIVM	0.677	PKC
			1115 S	SKRSSFIVM	0.629	PKA
			1148 S	KAWVSFRWK	0.868	PKC
			1161 T	MAPETYSSS	0.727	PKC
			1167 S	SSSSSSGGF	0.624	PKC
			1172 T	SGGFTLHSH	0.683	PKC
CatSper δ	NP_780559.2	805	12 T	AAVATMVRA	0.508	PKC
			18 T	VRAHTLCRV	0.626	PKC
			18 T	VRAHTLCRV	0.553	PKA
			24 T	CRVHTVRTG	0.653	PKC
			27 T	HTVRTGKVF	0.924	PKC

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVIIe. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* sin considerar las regiones transmembranales (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
CatSper ϵ	P0DP43	985	33 S	KVFKSNIQL	0.604	PKA
			83 T	LLPLTVPKS	0.623	PKC
			102 S	AHFVSGSLV	0.639	PKA
			104 S	FVSGSLVLF	0.582	PKA
			116 S	GKGYSYDYY	0.531	PKA
			123 T	YYENTWRKL	0.621	PKC
			147 S	CFKGSFCLE	0.637	PKA
			168 T	QIPGTNIYF	0.741	PKC
			185 T	QLMNTDKLS	0.594	PKC
			194 T	HLTGTLGGI	0.655	PKC
			218 T	NNLGTFHYM	0.51	PKC
			235 S	GIAFSYKNL	0.813	PKC
			263 S	SILVSSNSG	0.579	PKC
			322 T	SYMGTYVIK	0.623	PKC
			337 T	WSTHTSIYF	0.641	PKC
			367 T	FDKCTVNVQ	0.699	PKC
			404 S	IDMNSKCLK	0.539	PKC
			449 S	FDGNSKYKL	0.591	PKA
			466 S	HWGNSDFNF	0.676	PKA
			473 S	NFTASIKRH	0.844	PKC
			480 S	RHAISSVTV	0.521	PKA
			481 S	HAISSVTVD	0.795	PKC
			501 T	KPLSTLISV	0.735	PKC
			504 S	STLISVGC	0.547	PKC
			510 T	GCDMTKKIV	0.525	PKC
			609 T	NGLVTYSYS	0.595	PKC
			611 S	LVTYSYSLT	0.635	PKA
			708 S	NTIFSVYVH	0.762	PKC
			3 S	MPSAGQR	0.555	PKC
			11 S	RKPGSLLAL	0.727	PKA
			64 S	YSIFSTRSS	0.85	PKC
			65 T	SIFSTRSSI	0.731	PKC
			68 S	STRSSIKLE	0.682	PKA
			68 S	STRSSIKLE	0.668	PKC
			80 S	NSFVSWKIP	0.506	PKC
			86 S	KIPESCKVE	0.715	PKC
			93 T	VENTTSPKT	0.56	PKC
			97 T	TSPKTLHCK	0.553	PKC
			98 T	SPKTLHCK	0.567	PKC
			123 T	ERHLTVDNS	0.512	PKA
			166 T	ELIWIAKKP	0.763	PKC
			171 S	AKKPSLSSR	0.793	PKA
			173 S	KPSLSSRVL	0.654	PKC
174 S	PSLSSRVLT	0.617	PKC			

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVIIIf. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* sin considerar las regiones transmembranales (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
			178 T	SRVLTQMN	0.621	PKC
			183 T	KQMNTLGQR	0.751	PKC
			192 T	PFIFTVEKR	0.805	PKC
			297 T	DSFQWTRV	0.514	PKC
			299 T	FQWTRVRA	0.598	PKC
			315 S	AQRHSLRDV	0.62	PKA
			333 T	LVDGTVYLR	0.509	PKC
			333 T	LVDGTVYLR	0.508	PKA
			352 S	SRGSETGI	0.657	PKA
			360 S	ILGFSKRRW	0.777	PKC
			375 S	YKLASKKSI	0.904	PKC
			387 T	WSKTTVYAG	0.521	PKC
			394 T	AGYATFRFV	0.704	PKC
			399 T	FRFVTLTDT	0.575	PKA
			401 T	FVTLTDTAK	0.773	PKC
			444 T	SVCTTNTRN	0.577	PKC
			460 T	AIFQTWILQ	0.531	PKA
			499 S	HVYYSYKNF	0.909	PKC
			532 T	HQVLDRIG	0.639	PKC
			562 T	VILHTWVNT	0.653	PKC
			597 T	YQLQTQPYP	0.775	PKC
			638 S	DKGESLTIW	0.553	PKA
			663 S	HYGSSVMTW	0.665	PKC
			663 S	HYGSSVMTW	0.648	PKA
			666 T	SSVMWTQN	0.545	PKC
			681 T	SGFCTKMI	0.538	PKC
			691 T	RFFQITNIE	0.53	PKC
			718 S	QFRPSEFSR	0.543	PKA
			726 T	RTCLTAKPV	0.802	PKC
			739 S	VGCDSSKYI	0.653	PKC
			759 S	RRDFSVID	0.604	PKA
			770 S	LLRESLSDN	0.652	PKA
CatSper ζ	NP_001034583.1	194	4 S	MEESVKPV	0.633	PKC
			18 S	HRRSSVRSS	0.921	PKC
			18 S	HRRSSVRSS	0.763	PKA
			22 S	SVRSSLYGD	0.697	PKA
			65 S	IRKYSQTIS	0.695	PKA
			69 S	SQTISIRD S	0.585	PKC
			73 S	SIRDSL NLE	0.794	PKA
			121 S	SLIFSLWKP	0.678	PKC
			159 T	KALITYRST	0.881	PKC
			162 S	ITYRSTIGR	0.534	PKC
			163 T	TYRSTIGRN	0.81	PKC
EFCAB9	NP_081307.2	216	22 S	YCLLSLRNV	0.85	PKC

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVIIg. Sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC en las subunidades de CatSper de *M. musculus* sin considerar las regiones transmembranales (continuación)

Subunidad	No. Identificación	No. aa	#x	Secuencia	Puntuación	Cinasa
			43 T	HHRNTLNDV	0.652	PKA
			107 S	MYRHSRPVF	0.689	PKA
			169 T	TIFCTDKSI	0.548	PKC
			172 S	CTDKSIDRK	0.726	PKC
			208 S	KIYSSMLSH	0.629	PKC
			211 S	SSMLSHRSI	0.788	PKC

Fosforilados por PKA; Fosforilados por PKC con probabilidad ≤ 0.75 ; Probabilidad ≈ 0.8 o mayor
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXVIII. Resumen de sitios predichos de fosforilación por PKA y por PKC (probabilidad ≥ 0.8) en las subunidades de CatSper de *M. musculus* sin considerar las regiones transmembranales

Subunidad	No. Identificación	No. aa	No. sitios de fosforilación	
			Por PKA	Por PKC
CatSper1	NP_647462.1	686	0	7
CatSper2	A2ARP9.2	588	2	1
CatSper3	NP_001239416.1	395	1	2
CatSper4	NP_808534.1	442	0	1
CatSper β	NP_766611.2	1109	1	4
CatSper γ	XP_006540153.1	1203	1	8
CatSper δ	NP_780559.2	805	0	5
CatSper ϵ	NP_780559.2	985	1	10
CatSper ζ	NP_001034583.1	194	2	3
EFCAB9	NP_081307.2	216	0	2
Total de sitios de fosforilación			8	43

Fosforilados por PKA; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Tabla SXIX. Análisis estadístico de experimentos de quimiotaxis

Experimentos (pH)	Fecha 2019	Normalidad p-value	t-test p-value		
			10 nM	100 nM	1000 nM
Spur (7.8)	abr-30	0.3104	1	0.96	0.44
		0.3032	0.96	1	0.45
		0.3022	0.44	0.45	1
		0.2091	0.55	0.57	0.86
Lpictus (7.4)	may-15	0.345	1	0.93	0.52
		0.1261	0.93	1	0.41
		0.9323	0.52	0.41	1
		0.3722	0.21	0.15	0.38

Dependiendo del valor de p de la prueba de normalidad (*Shapiro test*), se determinó si se realizaba un análisis estadístico paramétrico o no paramétrico. Como puede verse en los dos experimentos en las columnas del valor de p del *t-test* no hubo diferencia significativa en ninguno de los casos.

Tabla SXX. Análisis estadístico entre poblaciones representativas de todas las condiciones experimentales

Medio	N	n	Normalidad	Diferencia entre poblaciones mediante prueba Wilcoxon								
				AMA	AMA0Ca	AMA40K	DMSO	HC	PKI	Chel	KH7	IBMX
AMA	14	271	1.78E-05	1	6.00E-12	0.000513	0.7618	1.22E-05	1.95E-07	0.2431	0.7227	0.01017
AMA0Ca	14	296	0.00037428	6.00E-12	1	0.017590	2.74E-09	0.1268	0.6863	5.06E-11	1.51E-06	0.7612
AMA40K	14	147	0.07217641	0.000513	0.017590	1	0.002285	0.4927	0.03049	7.15E-05	0.003883	0.2344
DMSO	6	176	3.70E-05	0.7618	2.74E-09	0.002285	1	0.000151	1.97E-06	0.201	0.5733	0.01381
HC	3	146	0.1566594	1.22E-05	0.126800	0.4927	0.000151	1	0.09934	5.32E-06	0.00039	0.3484
PKI	3	70	0.3859757	1.95E-07	0.6863	0.03049	1.97E-06	0.09934	1	3.98E-08	5.11E-06	0.9326
Chel	3	113	0.01816291	0.2431	5.06E-11	7.15E-05	0.201	5.32E-06	3.98E-08	1	0.7384	0.003309
KH7	3	75	0.003765587	0.7227	1.51E-06	0.003883	0.5733	0.00039	5.11E-06	0.7384	1	0.01577
IBMX	2	23	0.2120924	0.01017	0.7612	0.2344	0.01381	0.3484	0.9326	0.003309	0.01577	1

N: número de erizos; n: número de trayectorias (ver pie de Figura 9); Se realizó prueba de *Shapiro-Wilk*, donde si p -value > 0.05 hay una distribución normal. Posteriormente se realizó estadística no paramétrica para determinar la diferencia entre poblaciones donde si p -value > 0.05 indica que no hay diferencia significativa y si p -value < 0.05 si hay diferencia significativa.

REFERENCIAS

- Alberts B. Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed., p. 1392). New York Garland Science.
- 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. *American Journal of Human Genetics*, 84(4), 505–510.
- Babcock, D. F. (2007). Wrath of the wraiths of CatSper3 and CatSper4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), 1107–1108.
- Beebe, S. J., Sandberg, M., Froyso, A., Hansson, V., & Jahnsen, T. (2015). Molecular Cloning of a Tissue- Specific Protein Kinase (C7) from Human Testis — Representing a Third Isoform for the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Molecular Endocrinology*, 4, (1), 465–475.
- Beltrán, C., Zapata, O., & Darszon, A. (1996). Membrane Potential Regulates Sea Urchin Sperm Adenylylcyclase. *Biochemistry* 2960(95), 7591–7598.
- Beltrán C., Vacquier D. V., Moy G., Chen Y., Buck J., Levin L. R. & Darzon A. (2007). Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction. *NIH Public Access*, 71(11), 3831–3840.
- Beltrán, C. (2019). 3',5'-Cyclic adenosine monophosphate in the physiology of sea urchin spermatozoa. *Spermatozoa: A view from Mexico*. 60-100. D. R. © Autonomous University of Oaxaca Benito Juárez, México. Eds. Arenas Ríos, E. and Fuentes Mascorro, G. First edition, 2019. ISBN: 978-607-9061-78-4.
- Bradham C. A., Foltz KR, Beane W. S., Arnone MI, Rizzo F., Coffman J. A., Mushegian A., Goel M., Morales J., Geneviere A. M., Lapraz F., Robertson A. J., Kelkar H., Loza-Coll M., Townley I. K., Raisch M., Roux M. M., Lepage T., Gache C., McClay DR, Manning G. 2006. The sea urchin kinome: A first look. *Dev Biol* 300:180–193.
- Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N. D., Naruse, M., Krähling, M., ... Strünker, T. (2012). The CatSper channel: A polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO Journal*, 31(7), 1654–1665.
- Böhmer M., Van, Q., Weyand I., Hagen, V., Beyermann M., Matsumoto, M., Hoshi, M., Hildebrand, E., & Kaupp, U. B. (2005). Ca²⁺ spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *THE EMBO JOURNAL*, 24(15), 2741–2752.
- Bookbinder, L. H., Moy, G. W., & Vacquier, V. D. (1990). Identification of sea urchin sperm adenylate cyclase. *Journal of Cell Biology*, 111(5), 1859–1866.

- Bracho, G. E., Fritch, J. J., & Tash, J. S. (1998). Identification of flagellar proteins that initiate the activation of sperm motility in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242(1), 231–237.
- Brokaw, C. J. (1979). Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella. *J Cell Biol* 82,401–411.
- Brown, S. G., Miller, M. R., Lishko, P. V., Lester, D. H., Publicover, S. J., Barratt, C. L. R., & Da Silva, S. M. (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.
- Brusca R., & Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates* (2nd ed., p. 865). Sinauer Associates, Incorporated.
- Calcagno, J. A., Pérez, A. F., Gil, D. G., & Rubilar, T. (2014). *El estudio de los invertebrados marinos* (1st ed., pp.295-316).
- 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 Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *PNAS*, 100(25), 1–5.
- 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.
- Carlson, A. E., Burnett, L. A., del Camino, D., Quill, T. A., Hille, B., Chong, J. A., ... Babcock, D. F. (2009). Pharmacological Targeting of Native CatSper Channels Reveals a Required Role in Maintenance of Sperm Hyperactivation. *PLoS ONE*, 4(8), e6844.
- Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U. & Nishizuka Y. 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257, 7847–7851.
- Christen, R., Schackmann, W., & Shapiro, M. (1982). Elevation of the Intracellular pH Activates Respiration and Motility of Sperm of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J Biol Chem*, 257(24), 14881–14890.
- Christen, R., Schackmann, R. W., & Shapiro, M. (1983). Metabolism of Sea Urchin Sperm. *J Biol Chem*, 258(9), 5392-5399.
- Chung, 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), 153.
- Chung, J., Shim, S., Everley, R. A., Gygi, S. P., Zhuang, X., & Clapham, D. E. (2014). Structurally Distinct Ca²⁺ Signaling Domains of Sperm Flagella Orchestrate Tyrosine Phosphorylation and Motility. *CELL*, 157(4), 808–822.

- 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 γ regulates the structural continuity of sperm Ca^{2+} signaling domains and is required for normal fertility. *ELife*, 6, 1–25.
- Cooper, D.M. (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochemical Journal*, 375(Pt 3), 517-529.
- Cooper, D.M.F. & Crossthwaite, A.J. (2006). Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8), 426-431.
- Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., Franke, U., & Ullrich, A. (1986). Multiple, Distinct Forms of Bovine and Human Protein Kinase C Suggest Diversity in Cellular. *Science*, 233(4766), 859-866.
- Cosson, M. P., Carre, D., & Cosson, J. (1984). Sperm chemotaxis in siphonophores spermatozoa induced by the attractant. *J Cell Sci*, 181, 163–181.
- Crenshaw, H. C. (1993a). Orientation by helical motion—I. Kinematics of the helical motion of organisms with up to six degrees of freedom. *Bulletin of Mathematical Biology*, 55, 197–212.
- Crenshaw, H. C. (1993b). Orientation by helical motion-III. Microorganisms can orient to stimuli by changing the direction of their rotational velocity. *Bulletin of Mathematical Biology*, 55, 231–255.
- Crenshaw, H. C., & Edelstein-Keshet, L. (1993c). Orientation by helical motion-II. Changing the direction of the axis of motion. *Bulletin of Mathematical Biology*, 55, 213–230.
- Darszon, A., Acevedo, J. J., Galindo, B. E., Hernández-González, E. O., Nishigaki, T., Treviño, C. L., Wood C., & Beltrán, C. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*, 131(6), 977–988.
- Darszon, A., Guerrero, A., Galindo, B. E., Nishigaki, T., & Wood, C. D. (2008). Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 595–606.
- Darszon A., Nishigaki T., Beltran C., Treviño C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev*, 91,1305–1355.
- Darszon, A., Sánchez-cárdenas, C., Orta, G., Sánchez-Tusie, A. A., Beltrán, C., López-gonzález, I., ... Treviño, C. L. (2012). Are TRP channels involved in sperm development and function? *Cell Tissue Res*, 349(3), 749-764.
- Espinal J., Aldana M, Guerrero A., Wood C, Darszon A., Martínez-Mekler G. (2011). Discrete Dynamics Model for the Sperm-Activated Ca^{2+} Signaling Network Relevant to Sperm Motility. *PLoS One* 6, e22619.

- Espinal-Enrriquez J, Darszon A, Guerrero A, Martínez-Mekler G. (2014). *In Silico* Determination of the Effect of Multi-Target Drugs on Calcium Dynamics Signaling Network Underlying Sea Urchin Spermatozoa Motility. *PLoS One* 9, e104451.
- Espinal-Enrriquez, J., Priego-Espinosa, D. A., Darszon, A., Beltrán, C., & Martínez-Mekler, G. (2017). Network model predicts that CatSper is the main Ca²⁺ channel in the regulation of sea urchin sperm motility. *Scientific Reports*, 7(1), 4236.
- Esposito, G., Jaiswal, B. S., Xie, F., Krajnc-Franken, M. A. M., Robben, T. J. A. A., Strik, A. M., ... Gossen, J. A. (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9), 2993–2998.
- Francis SH, Poteet-Smith C, Busch JL, Richie-Jannetta R, Corbin JD. (2002). Mechanisms of autoinhibition in cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Front Biosci* 7, d580-592.
- Fukuda, N., Yomogida, K., Okabe, M., & Touhara, K. (2004). Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *J Cell Sci*, 117, 5835–5845.
- Galindo, B. E. (2000). Participación de un canal de K⁺ directamente modulado por GMPc en la respuesta inducida por el speract en el espermatozoide de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Galindo, B. E., Neill, A. T., & Vacquier, V. D. (2005). A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella. *Biochem Biophys Res Commun*, 334, 96–101.
- Garbers D. L. & Kopf G. S. (1980). The regulation of spermatozoa by calcium cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Research*, 13, 251-306.
- Garcia, M. L. & Kaczorowski, G. J. (2016). Ion channels find a pathway for therapeutic success. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(20), 5472–5474.
- García-Rincón J, Darszon A, & Beltrán C. (2016). Speract, a sea urchin egg peptide that regulates sperm motility, also stimulates sperm mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1857, 415–426.
- Gauss, R., Seifert, R., Kaupp, U. B., & Ju, D.-. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature*, 393(6685), 583-587.
- Gunaratne H. J., Neill A. T, Vacquier V. D., (2006) Plasma membrane calcium ATPase is concentrated in the head of sea urchin spermatozoa. *J Cell Physiol* 207, 413 – 419

- Guerrero, A., Nishigaki, T., Carneiro, J., Tatsu, Y., Wood, C. D., & Darszon, A. (2010a). Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental Biology*, 344(1), 52–65.
- Guerrero, A., Wood, C. D., Nishigaki, T., Carneiro, J., & Darszon, A. (2010b). Tuning sperm chemotaxis. *38*, 1270–1274.
- Guerrero A., Gadêlha H., Ramírez-Gómez H.V., Ramírez R., Beltrán C., Tuval I. (2020) Chapter 12 Motility and Guidance of Sea Urchin Sperm. In: Yoshida M., Asturiano J. (eds) *Reproduction in Aquatic Animals*. Springer, Singapore
- Hanks, S.K. & Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 9, 576-596.
- Hanoune J. & Defer N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 145–174.
- Hansbrough, J.R. & Garbers, D.L., (1981). Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 256, 1447–1452.
- Hunter, T. (1987). A Thousand and One Protein Kinases Review. *Cell*, 50(January), 823–829.
- Hwang, J. Y., Mannowetz, N., Zhang, Y., Everley, R. A., Gygi, S. P., Bewersdorf, J., ... Chung, J.-J. (2019). Dual Sensing of Physiologic pH and Calcium by EFCAB9 Regulates Sperm Motility. *Cell*, 1–15.
- Inoue M, Kishimoto A, Takai Y. & Nishizuka Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem* 252, 7610–6.
- Johnson C. H., Clapper D. L., Winkler M. M., Lee H. C. & Epel D. (1983). A volatile inhibitor immobilizes sea urchin sperm in semen by depressing the intracellular pH. *Dev Biol* 98, 493–501.
- Johnson L. N., Noble M. E. & Owen D. J. (1996). Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation. *Cell* 85, 149–158.
- Kaupp, U. B., Solzin J., Hildebrand E., Brown J. E., Helbig A., Hagen V., Beyermann M., Pampaloni F. & Weyand I. (2003). The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nature Genetics*, 19(3), 241–247.
- Kaupp, U. B. (2012). 100 Years of Sperm Chemotaxis. *The Journal of General Physiology*, 140(6), 583–586.

- Kennelly PJ, Krebs EG. 1991. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266, 15555–15558.
- Kopperud, R., Christensen, A. E., Kjærland, E., Viste, K., Kleivdal, H., & Døskeland, S. O. (2002). Formation of Inactive cAMP-saturated Holoenzyme of cAMP-dependent Protein Kinase under Physiological Conditions. *J Biol Chem*, 277(16), 13443–13448.
- Latorre, R., & Brauchi, S. (2009). Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Q Rev Biophys*, 42(3), 201–246.
- Lee, H. C., Johnson, C. & Epel, D. (1983). Changes in Internal pH Associated with Initiation of Motility and Acrosome Reaction of Sea Urchin Sperm, 45, 31–45.
- Lee, H. C. & Garbers, D. I. (1986). Modulation of the Voltage-sensitive Na⁺ / H⁺ Exchange in Sea Urchin Spermatozoa through Membrane Potential Changes Induced by the Egg Peptide Speract. *J Biol Chem*, 261(34), 16026-16032.
- Lillie, F. R. (1912). The production of sperm iso-agglutinins by ova. *Science* 36, 527-530.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387–392.
- Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J. J., & Clapham, D. E. (2012). The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annual Review of Physiology*, 74, 453–475.
- Lishko, P. V., & Mannowetz, N. (2018). CatSper: a unique calcium channel of the sperm flagellum. *Current Opinion in Physiology*, 2, 109–113.
- 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.
- Loyo-Celis, V., Orta, G., Beltrán, C. and Darszon, A. (2021) Electrophysiological characterization of CatSper channel in sea urchin sperm. Manuscrito en preparación.
- Loza-Huerta A. (2007). Identificación del tipo de adenilil ciclasas que participan en la regulación de la movilidad del espermatozoide de erizo de mar. (Tesis de licenciatura). Universidad de Colima-Facultad de Químico-Farmacéutico Biólogo, México.
- Loza-Huerta A. (2013a). Identificación de proteínas en complejos de señalización que modifican su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Loza-Huerta, A., Vera-Estrella, R., Darszon, A., & Beltrán, C. (2013b). Certain *Strongylocentrotus purpuratus* sperm mitochondrial proteins co-purify with low density detergent-insoluble membranes and are PKA or PKC-substrates

- possibly involved in sperm motility regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(11), 5305–5315.
- Loza-Huerta, A., Darszon, A. and Beltrán, C. (2021). Crosstalk between protein kinase A and C regulates sea urchin sperm motility. Enviado: Zygote - ZYG-2021-0007 Submission Confirmation. Enero 28.
- Mathews C.K., Van Holde K.E. y Ahern K.G. (2014). Bioquímica. 4ª Edición, Editorial PEARSON.
- Miller, R. L. (1977). Chemotactic behavior of the sperm of chitons (Mollusca: Polyplacophora). *J Exp Zool*, 202(2), 203-211.
- Miller, R. L. (1982). Sperm Chemotaxis in Ascidians. *Integrative and Comparative Biology*, 22(40), 827–840.
- Miller, R. L. (1985). Sperm chemo-orientation in the metazoa. In C. B. Metz & A. Monroy (Eds.), *Biology of fertilization* (pp. 275–337). *New York: Academic Press*
- Neill, A. T., Moy, G. W., & Vacquier, V. D. (2004). Polycystin-2 Associates with the Polycystin-1 Homolog, suREJ3, and localizes to the acrosomal region of Sea Urchin Spermatozoa. 477, 472–477.
- Newton A. C. (1993). Interaction of Proteins with lipid headgroups: Lessons from Protein Kinase C. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22, 1–25.
- Nishigaki, T., Wood, C. D., Tatsu, Y., Yumoto, N., Furuta, T., Elias, D., ... Darszon, A. (2004). A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca²⁺ before its increase. *Dev Biol*, 272(2), 376-88.
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A. L., Romero, F., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(3), 1149–1158.
- Nishizuka Y., (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*, (9), 484-496.
- Nishizuka Y., (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, (308), 693-698.
- Ono, Y. (1989). Protein kinase C ζ subspecies from rat brain: Its structure, expression, and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(9), 3099–3103.
- Orta, G., De La Vega-Beltrán, J. L., Martín-Hidalgo, X. D., Santi, C. M., Visconti, P. E., & Darszon, X. A. (2018). CatSper channels are regulated by protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16830–16841.
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., ... 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 of the United States of America*, 104(4), 1219–1223.
- 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 of the United States of America*, 98(22), 12527–12531.
- 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 of the United States of America*, 100(25), 14869–14874.
- Rahban, R., & Nef, S. (2020). CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518(September), 110951.
- Ralt, D., Manor, M., Cohen-dayag, A., Tur-kaspa, I., Ben-shlomo, I., & Hashomer, T. (1994). Chemotaxis and Chemokinesis of Human Spermatozoa to Follicular Factors. *Biol Reprod*, 785, 774–785.
- Ramírez-Gómez, H. V., Jimenez Sabinina, V., Velázquez Pérez, M., Beltran, C., Carneiro, J., Wood, C. D., ... Guerrero, A. (2020). Sperm chemotaxis is driven by the slope of the chemoattractant concentration field. *ELife*, 9, 1–32.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., ... Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603-609.
- Rennhack, A., Schiffer, C., Brenker, C., Fridman, D., Nitao, E. T., Cheng, Y. M., ... Strünker, T. (2018). A novel cross-species inhibitor to study the function of CatSper Ca²⁺ channels in sperm. *British Journal of Pharmacology*, 175(15), 3144–3161.
- Riffell, J. A., Krug, P. J., & Zimmer, R. K. (2002). Fertilization in the sea: the chemical identity of an abalone sperm attractant. *J Exp Biol*, 205, 1439–1450.
- Rodríguez, E. & Darszon, A. (2003). Intracellular sodium changes during the speract response and the acrosome reaction in sea urchin sperm. *J Physiol*, 546(Pt 1):89-100.
- Rybalkin S. D., Yan C., Bornfeldt K. E. & Beavo J. A. (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 93, 280–291.
- Seifert R., Flick M., Bönigk W., Alvarez L., Trötschel C., Poetsch A., Müller A., Goodwin N., Pelzer P., Kashikar N. D., Kremmer E., Jikeli J., Timmermann B., Kuhl H., Fridman D., Windler F., Kaupp U. B. & Strünker T. (2015). The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm. *EMBO J* 34:379–392.

- Shapiro B. M., & Tombes R. M., (1985). A biochemical pathway for a cellular behaviour: pHi, phosphorylcreatine shuttles, and sperm motility. *Bioessays* 258(9), 100-103.
- Shiba, K., Ohmuro, J., Mogami, Y., Nishigaki, T., Wood, C. D., Darszon, A., ... Baba, S. A. (2005). Sperm-Activating Peptide Induces Asymmetric Flagellar Bending in Sea Urchin Sperm. *Zoological Science*, 22(3), 293–299.
- Shiba, K., & Inaba, K. (2014). Distinct roles of soluble and transmembrane adenylyl cyclases in the regulation of flagellar motility in *Ciona* sperm. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 13192–13208.
- Shoji S, Titani K, Demaille JG, Fischer EH. 1979. Sequence of two phosphorylated sites in the catalytic subunit of bovine cardiac muscle adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 254:6211–6214.
- Singh, A. P., & Rajender, S. (2014). CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 30(1), 28–38.
- Smith, J. F., Syritsyna, O., Fellous, M., Serres, C., Mannowetz, N., Kirichok, Y., & Lishko, P. V. (2013). Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 6823–6828.
- Steinberg, R. A., Cauthron, R. D., & Symcox, M. M. (1993). Autoactivation of Catalytic (Co) Subunit of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase by Phosphorylation of Threonine. *Mol Cell Biol*, 197, 13(4), 2332–2341.
- 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), 382–387.
- Su Y-H & Vacquier V. D. (2002). A flagellar K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchanger keeps Ca²⁺ low in sea urchin spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci* 99:6743–6748.
- Su Y-H & Vacquier V. D. (2006). Cyclic GMP-specific Phosphodiesterase-5 Regulates Motility of Sea Urchin Spermatozoa. *Mol Biol Cell* 17:114–121.
- Sun, X. hong, Zhu, Y. ying, Wang, L., Liu, H. ling, Ling, Y., Li, Z. li, & Sun, L. bo. (2017). The Catsper channel and its roles in male fertility: A systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15(1), 1–12.
- Suzuki, N. (1995). Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zoolog. Sci.* 12, 13–27.
- Tash J. S. & Means A. R. (1982). Regulation of Protein Phosphorylation and Motility of Sperm by Cyclic Adenosine Monophosphate and Calcium. *Biol Reprod* 26:745–763.

- Tash, J. S., & Means, A. R. (1983). Cyclic Adenosine 3',5' Monophosphate, Calcium and Protein Phosphorylation in Flagellar Motility. *Biology of Reproduction*, 28(1), 75–104.
- Tatsu, Y., Nishigaki, T., Darszon, A., Yumoto, N., & Gene, D. (2002). A caged sperm-activating peptide that has a photocleavable protecting group on the backbone amide. *525*, 20–24.
- Taylor, S. S., Yang, J., Wu, J., Haste, N. M., & Anand, G. (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics, *1697*, 259–269.
- Vacquier, V. D. (1986). Activation of sea urchin spermatozoa during fertilization. (February), 77–81.
- Vacquier, V. D. (1998). Evolution of Gamete Recognition Proteins. *Science*, 281(5385), 1995–1998.
- Vacquier V. D., Loza-Huerta, A., Garcia-Rincon, J., Darzon, A., & Beltran C. (2014). Soluble adenylyl cyclase of sea urchin spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Basis of Diseases*, 1842(12), 2621-2628.
- Velázquez-Pérez, M., Héctor Ramírez, Adán Guerrero, Alberto Darszon and Carmen Beltrán (2016) CatSper, a specific cation channel of sperm is involved in sperm chemotaxis in sea urchin. XXXI Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Aguascalientes, Ags. Noviembre 6-11.
- 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.
- Wang, H., McGoldrick, L. L., & Chung, J.-J. (2020). Sperm ion channels and transporters in male fertility and infertility. *Nature Reviews Urology*, 18, 46–66.
- Ward, G.E., Brokaw, C.J., Garbers, D.L., Vacquier, V.D., (1985). Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J. Cell Biol.* 101, 2324–2329.
- Ward G. E., Moy G. W. & Vacquier V. D. (1986). Phosphorylation of membrane-bound guanylate cyclase of sea urchin spermatozoa. *J Cell Biol* 103, 95–101.
- White, D., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2007). Protein kinase C is an important signaling mediator associated with motility of intact sea urchin spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 210(22), 4053–4064.
- Williams, H. L., Mansell, S., Alasmari, W., Brown, S. G., Wilson, S. M., Sutton, K. A., ... Da Silva, S. M. (2015). *Specific loss of CatSper function is sufficient to compromise fertilizing capacity of human spermatozoa. Human Reproduction*, 30(12), 2737–2746.
- Wood, C. D., Darszon, A., & Whitaker, M. (2003). Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *J Cell Biol*, 161(1), 89–101.

- Wood, C. D., Nishigaki, T., Furuta, T., Baba, S. A., & Darszon, A. (2005). Real-time analysis of the role of Ca²⁺ in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *Journal of Cell Biology*, 169(5), 725–731.
- Wood, C. D., Nishigaki, T., Tatsu, Y., Yumoto, N., Baba, S. A., Whitaker, M., & Darszon, A. (2007). Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca²⁺ spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Developmental Biology*, 306(2), 525–537.
- Wu, L., Sweet, T., & Clapham, D. E. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family, 62(3), 381–404.
- Xie, F., Garcia, M. A., Carlson, A. E., Schuh, S. M., Babcock, D. F., Jaiswal, B. S., ... Conti, M. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Developmental Biology*, 296(2), 353–362.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371–372.
- Yoshida M, Inaba K, Ishida K, Morisawa M. (1994). Calcium and Cyclic AMP Mediate Sperm Activation, but Ca²⁺ Alone Contributes Sperm Chemotaxis in the Ascidian, *Ciona savignyi*. (ascidian/sperm motility/chemotaxis/calcium/cAMP). *Dev Growth Differ* 36, 589–595.
- Yoshida, M., Murata, M., Inaba, K., & Morisawa, M. (2002). A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23), 14831–14836.
- Yonemoto W., Garrod S. M. & Bells S. M., Taylor SS. (1993). Identification of Phosphorylation Sites in the Recombinant Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase. 268, 18626–18632.
- Zapata, O., Beltran, C., Parys, J. B., Chen, J. L., Longo, F. J., & Darszon, A. (1997). Inositol triphosphate receptors in sea urchin sperm. *Zygote*, 5(4), 355-64.
- Zimmermann, B., Chiorini, J. A., Ma, Y., Kotin, R. M., & Herberg, F. W. (1999). PrKX Is a Novel Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase Regulated by the Regulatory Subunit Type I. *J Biol Chem*, 274(9), 5370–5378.

Cuernavaca, Morelos a 19 de enero de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **José Daniel Ángeles Salazar**, con el título del trabajo: **Participación de CatSper y de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) en la quimiotaxis del espermatozoide de erizo de mar.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por **Tesis**, como lo marca el artículo 4° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: BIÓL. HUGO SUÁREZ CONTRERAS

SECRETARIO: DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

VOCAL: DRA. MA. DEL CARMEN BELTRÁN NÚÑEZ

SUPLENTE: DR. HÉCTOR VICENTE RAMÍREZ GÓMEZ

SUPLENTE: M. EN C. YOLOXOCHITL SÁNCHEZ GUEVARA

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

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

Sello electrónico

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2021-01-22 00:05:36 | Firmante

XHna0+q+50jq6GEeoMoUSaoALH/bHth+A0TZsQBpXKOHkvgWjsrI0XbLQYZz/CND1Ilt3b5Ns3VZFGdur3peDo2B0+De33CQQ48VEjQAokhcFsO1qO/TbsxWYst6igwlxhV/gjX63zWNWooE1BVi4NRSem4sDeqBwCxCghjP6a+C2VUWf42IM2dK8ux3crLZGukYveA5u+GzxEYvPyRu+Pz+Am3IgcqJ5xk7dgpqenf3Xai+PpISAJ7FNofKCuv7UoT8HirB6oBmq1evrWBy2PAvc8t6lGXucokQ7trdEFeGiZfJdCxiWnOcs+MzWwjjVMAIPtg83138DRNV4lZimw==

HUGO SUAREZ CONTRERAS | Fecha:2021-01-29 13:50:08 | Firmante

BUr3ojasp3pqyCxzDiL6Wjfn4Ek3NEuptDVQWjQ+wYaCya4+DoNcVRawBDJ8dNWtwgXxvcidufaWuqiVJ3g9HBNVccmOt70ot3qBppsO7qn8BtZr7eydOjgPsq5g4lxUmP+FCZBEoJYgDBIDgdjZEh5x0Voo/bH+2BtAFyqojq10yn13qP43X5CUL4yaPGxwC6kCPLnQCiNHMX6nDBBrUIRp4Sj4hxp2MwalciwVqk7DtvhzHW3m1p5iVvgh8LsU5i4SyWe3L8X6n8CegAift4wf16DCiYG8fllbh3q16/cAHATueu3MRm+wPeUKOrwpuRiv9t74nazhqmXMEVQ==

MA DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ | Fecha:2021-02-01 09:48:44 | Firmante

illnwleerN83XY7oznKPMYvX1U5huZAC+u55GyuZtMsJK2aBUZgrWlyml2+FO9mGvJKoG7CRvvy8bc2aZ/J96GkViBgKPvxSzDeYdlQK1NF5nfiyWODWoXanlEdsh5xX8v1f6IPzF4AdGujiV3tz6lPcQ3xSshwtDRtjerAm2OUkVmM65wfh++HrxgXJzD1cQcSMG9cUF2AuRIVGLVj7GgGzLEUBQibQP5yEJ3F7OjCvnp93nn2+2S/+FwteITs/fGkiCiRtaHduptjuqp77eEIDpx/f5Kl9pjt/BMXzuMzP1aaNdBBol1dMxwByTp5qhgxs2fbshRyRt3W8fg==

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



ofGAYI

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/SCoU6s8M1SIiHoEDxX9ZePv7GOjoMjEZ>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

YOLOXOCHITL SÁNCHEZ GUEVARA | Fecha:2021-02-04 16:14:06 | Firmante

pJ0ENAhVvWVsYQ/wD1lzzJ0h7h9/CE9waRqDj17fDvqdDofCibJ1nb+5UZXSIDbLn5ol3NUz98kjDTPZZv1iVRwIO/bL8hTTnSCnwJYAnojJZ/Lxl4gbL9JgPF/td8IQIMwFFRCV13mB98K9ZHGDgdihPpGGUQqBhTJuqj0veFOk79sl9ZrEbAQcTntXaRZiR0KyM00poQSKZtUmugUD68im4MIAPza60mqCTQuKcj4cwp4YkNpU0GYw+Dua20s3/Zq1TozYcGrJHA5YC9JW0YhMsl/857K9Ws79jwVB/nKMC2gbghwZZwxLv+sihvCnOY6kZvMltxY7fFJAGwKwdg==

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



6FSUwr

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/svIL34KnrFgXidABJh98y0HWaFJflug9>

