



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA
TRANSMEMBRANAL DE FIBROSIS CÍSTICA (CFTR), CANAL DE Cl^- EN LA MEMBRANA
PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN *Mus musculus***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

DULCE MARÍA FIGUEIRAS FIERRO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS-UNAM
DR. ROBERTO CARLOS MUÑOZ GARAY
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA
TRANSMEMBRANAL DE FIBROSIS CÍSTICA (CFTR), CANAL DE Cl^- EN LA MEMBRANA
PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN *Mus musculus***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

DULCE MARÍA FIGUEIRAS FIERRO

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS-UNAM
DR. ROBERTO CARLOS MUÑOZ GARAY
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM**

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2014



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/323/14

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **13 de enero de 2014**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **FIGUEIRAS FIERRO DULCE MARÍA** con número de cuenta **504008797** con la tesis titulada: "**Identificación y caracterización del regulador de la conductancia transmembranal de fibrosis cística (CFTR), canal de Cl en la membrana plasmática del espermatozoide de ratón *Mus musculus***", realizada bajo la dirección del (la) **DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL**:

Presidente:	DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
Vocal:	DR. ENRIQUE OTHON HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
Secretario:	DR. ROBERTO CARLOS MUÑOZ GARAY
Suplente:	Dr. RICARDO FÉLIX GRIJALVA
Suplente	Dr. FRANCISCO SEPÚLVEDA VALENZUELA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 05 de junio de 2014.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



Expreso mi profundo agradecimiento por la formación y el apoyo invaluable del Posgrado en Ciencias Biológicas-UNAM, como estudiante de Doctorado de esta institución.

La investigación fue realizada gracias a la beca de doctorado de CONACYT (2008 - 2011; becario: 49113), Programa UNAM-DGAPA (IN211809) (otorgado a Dr. Alberto Darszon), NIH: ROI HD44044 y HD038082 (otorgado a Dr. Pablo Visconti). El trabajo realizado en el Centro de Estudios Científicos (CECs), fue parcialmente apoyado por la comisión nacional de investigación científica y tecnológica (CONICYT) (otorgado a Dr. Francisco Sepúlveda).

Agradezco las observaciones, comentarios, asesorías y el tiempo empleado para la revisión de esta tesis por el comité tutor conformado por Dr. Arturo Hernández Cruz, Dr. Enrique Othon Hernández González, Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay, Dr. Ricardo Félix Grijalva y el Dr. Francisco Sepúlveda Valenzuela.

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección del Dr. Alberto Darszon Israel, en el Departamento de Genética del desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología-UNAM en Cuernavaca, Morelos, México.

AGRADECIMIENTOS

Expreso un profundo y especial agradecimiento a mi tutor el Dr. Alberto Darszon por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su instrucción y guía paciente y sabia en la realización de este proyecto de investigación, por sus consejos, apoyo y aliento académico durante todo mi proceso formativo. Su franqueza, honestidad, actitud seria y crítica con su trabajo y el de los demás deja una profunda huella en mí y representa un ejemplo de cómo debiera ser un investigador.

Parte de este trabajo se desarrolló en colaboración con el Dr. Francisco Sepúlveda, en el Centro de Estudios Científicos en Valdivia, Chile.

AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento al Dr. Marco Tulio González[†] por su participación y contribución como miembro de mi comité tutorial durante el primer semestre de doctorado.

Agradezco a la Dra. Claudia Treviño, Dra. Carmen Béltran, Dr. Takuya Nishigaki y al Dr. Ignacio López González por su importante contribución a mi formación académica y su constante apoyo y consejo.

A mis compañeros del laboratorio Darszon (a los que están y los que ya se han ido):

Ana Laura Cota, Ana Tusie, Ana Romarowski, Alejandra Solís, Arlet Loza, Aura Orloff,

Carmen Santana, Claudia Sanchez, Cesar Arcos, Edgar Garza, Enrique Balderas,

Esteban Monroy, Esperanza Mata, Fabio Herrera, Francisco Romero, Gerado De Blas,

Gerardo Orta, Héctor Ramírez Gómez, José Luis de la Vega Beltran, Jorge Luis

Alejandro Torres, Juan García, Julio César Chavéz, Marco Estrada, Martín Velázquez,

Ignacio López, Omar José, Oscar Sánchez, Paulina Torres, Rafael Baltierrez, Rocío

Servín, Pablo Martínez, Paulina Torres, Tatiana Luna, Verónica Loyo, Vilma Jiménez,

Yoloxochitl Sánchez.

Al Dr. Francisco Sepúlveda, a la Dra. María Isabel Niemeyer, al Dr. Pablo Cid, al Dr.

Carlos Flores y a todo su grupo de investigación por su gran disposición y apoyo tanto

en lo académico como en lo personal, por facilitarme el uso de las instalaciones en el

CECs, por hacer más agradable y ligera mi estancia con ustedes. Pero sobre todo, por

su importante contribución en mi formación académica.

A mis compañeros del laboratorio del Dr. Sepúlveda:

Bredford Kerr, Daniela Espinoza, Hugo Roa, Isabel Cornejo, Iván Ruminot, Johanna

Burgos, Karin Alegría, Marisol Costa, Mauricio Boquez, Sandra Villanueva, Robin

Gutiérrez, Rocío Valdebenito, Rodrigo Torres, Tamara Sotelo, Texia Riquelme, Viviana

Bustos así como al personal administrativo: Loreto Fernández.

Al Dr. Pablo Visconti y Dr. Jorge Arreola, por sus críticas y recomendaciones al

trabajo de investigación.

*Al Dr. Pedro Labarca por la disposición y apoyo en los aspectos técnicos en parte de
éste proyecto de investigación.*

AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento y agradecimiento a la Dra. Ma. Silvia González Arreola por su invaluable trabajo y apoyo como guía del grupo Pathwork México (Cuernavaca, Morelos).

A mi grupo de trabajo Pathwork México (Cuernavaca, Morelos) integrado por:

Manuela Menéndez, Leticia Zamora Alarrea[†], Ma. Antonieta Reguera, José Iglesias y Xochitl

Alvarado (observadora), bajo la dirección de la Dra. Ma. Silvia González Arreola.

A todos ustedes Gracias infinitas! por ser mis compañeros de camino, mis maestros.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial, le agradezco a la Q.F.B. Xochitl Alvarado Affrantranger por su invaluable apoyo, enseñanzas y guía tanto en lo académico como en lo personal.

Considero que eres una mujer y profesionista excepcional.

Gracias por mostrarme el camino.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi mamá y mi hermano, por su amor y apoyo incondicional. Por su paciencia, comprensión, motivación y constante aliento moral. Sin ustedes no me habría sido posible culminar mi sueño.

Son lo más valioso para mí.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	I
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xiv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Aspectos generales de la fecundación.....	1
1.2 Los gametos.....	1
1.2.1 El óvulo.....	2
1.2.2 El espermatozoide.....	3
1.2.3 Fisiología del espermatozoide.....	8
Capacitación.....	8
1.3 La Regulación de la movilidad.....	25
1.4 La Reacción Acrosomal.....	28
1.5 Fecundación en mamíferos.....	29
1.5.1 Aspectos específicos de la fecundación en mamíferos.....	30
1.5 Canales de Cl ⁻	30
1.5.1 Canal de Cl ⁻ CFTR.....	31
1.5.2 Interacción física y funcional entre CFTR y otras proteínas de transporte.....	33
1.5.3 Fibrosis Quística.....	35
1.5.4 Manifestaciones clínicas de la FQ.....	36
1.5.5 Los tipos de mutación del gene de CFTR.....	37
1.5.6 El modelo humano y de ratón de FQ.....	39
2 JUSTIFICACIÓN.....	42
3 HIPÓTESIS.....	43
4 OBJETIVOS.....	44
4.1 Objetivo General.....	44
4.2 Objetivos Específicos.....	44
5 METODOLOGÍA.....	45
5.1.1 Materiales y Métodos.....	45
RESULTADOS.....	50

5.2	<i>Contribución de canales de Cl⁻ a la corriente macroscópica de los espermatozoides testiculares.</i>	51
5.2.1	<i>Efecto de bloqueadores de canales aniónicos sobre las corrientes de Cl⁻ de los espermatozoides testiculares.</i>	52
5.2.2	<i>Permeabilidad del CFTR a Cl⁻, Br⁻, I⁻ y HCO₃⁻</i>	55
5.2.3	<i>Caracterización de corrientes del CFTR en los espermatozoides testiculares.</i>	59
5.2.4	<i>Efecto del análogo permeable de AMPc (8Br-AMPc) sobre la corriente de Cl⁻ de los espermatozoides testiculares</i>	69
5.2.5	<i>Efecto del CFTR_{inh}-172, inhibidor selectivo del CFTR, sobre las corrientes de Cl⁻ activadas por db-AMPc en los espermatozoides testiculares</i>	69
5.2.6	<i>Dependencia a ATP de las corrientes de Cl⁻ estimuladas por db-AMPc en los espermatozoides testiculares</i>	71
5.2.7	<i>Actividad funcional del CFTR en estado basal de los espermatozoides testiculares</i>	76
5.2.8	<i>Efecto del análogo de GMPc permeable (8Br-GMPc) sobre las corrientes de Cl⁻ en los espermatozoides testiculares</i>	78
6.1.8	<i>Efecto de la genisteína sobre las corrientes de Cl⁻ en los espermatozoides testiculares.</i>	81
6.1.9	<i>Corrientes de espermatozoides testiculares del ratón nulo en CFTR ($\Delta F508$-CFTR).</i>	85
6.2	<i>Corrientes del CFTR en los espermatozoides epididimales</i>	88
6	DISCUSIÓN	91
7	CONCLUSIONES	102
8	PERSPECTIVAS	104
9	BIBLIOGRAFÍA	105
10	APÉNDICE	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la espermatogénesis.	4
Figura 2: Esquema de la morfología del espermatozoide de ratón.	7
Figura 3: Esquema del tracto reproductor femenino de mamíferos.	9
Figura 4: Eventos asociados a la capacitación.	11
Figura 5: Patrones de movilidad activada e hiperactivada en espermatozoides de ratón.	26
Figura 6: Modelo de la estructura propuesta para el regulador de la conductancia transmembranal de fibrosis quística (CFTR).	32
Figura 7: Efecto de la concentración de Cl^- extracelular en las corrientes de espermatozoides testiculares.	54
Figura 8: Inhibición de las corrientes de Cl^- por DPC y AN en espermatozoides testiculares.	56
Figura 9: Selectividad del CFTR a Br^- , Cl^- , I^- y HCO_3^- en espermatozoides testiculares.	58
Figura 10: El DPC inhibe las corrientes de Cl^- estimuladas por db-AMPC en espermatozoides testiculares.	63
Figura 11: El DPC inhibe las corrientes de Cl^- activadas por db-AMPC dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y voltaje de los espermatozoides.	64
Figura 12: Curvas Dosis respuesta de la estimulación y bloqueo por db-AMPC y DPC, respectivamente de las corrientes de Cl^- en el espermatozoide testicular.	54
Figura 13: El CFTR _{inh} -172 inhibe las corrientes de Cl^- estimuladas por 8Br-AMPC.	73
Figura 14: Inhibición de las corrientes de Cl^- estimuladas por db-AMPC por CFTR _{inh} -172, inhibidor selectivo del CFTR en espermatozoides testiculares.	74
Figura 15: Dependencia a ATP intracelular de la corriente de Cl^- activada por db-AMPC es espermatozoides testiculares.	75
Figura 16: Los canales CFTR están parcialmente activos en espermatozoides testiculares.	77
Figura 17: El DPC y CFTR _{inh} -172, dos antagonistas del CFTR, bloquean las corrientes de Cl^- estimuladas por GMPc permeable (8Br-GMPc) en el espermatozoide testicular.	80
Figura 18: La genisteína incrementa las corrientes de Cl^- en espermatozoides testiculares.	83
Figura 19: El dimetilsulfóxido no afecta a las corrientes de Cl^- en espermatozoides testiculares.	85

Figura 20: Las corrientes aniónicas de los espermatozoides testiculares del ratón mutante CFTR-ΔF508 no son estimuladas por AMPc permeable (db-AMPc) ni inhibidas por CFTR_{inh}-172..... 87

Figura 21: Los canales CFTR son funcionales en espermatozoides epidídimaes 90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Mutaciones en el gene del CFTR 38

Tabla 2: Fenotipo de FQ en humanos y modelos de ratón 41

Tabla 3: Potencial reverso de la corriente (E_{rev}) obtenido de las corrientes en espermatozoides testiculares y valores teóricos del potencial de inversión de Cl (E_{Cl}) a distintas concentraciones de Cl extracelular...... 55

Tabla 4: Permeabilidad del CFTR a aniones extracelulares en el 59

ABREVIATURAS

ABC, Transportadores de tipo ABC.

ACs, AC soluble

AC, Adenilato ciclasa

ACt, AC de membrana

ADAM15, proteína esencial en la unión de espermatozoide-óvulo.

ADN, ácido desoxirribonucleico.

ADP, adenosina difosfato

AMPc, adenosin monofosfato cíclico.

8Br-AMPc,

[AMPc]_i concentración de AMPc intracelular.

8Br-GMPc,

AN, ácido níflumico.

ATPasas, adenosin trifosfato sintasas

ATP-Mg, adenosin trifosfato Mg²⁺.

BK, canal de K⁺ conocido también como “Big” potassium channel” o “maxi-K”.

BSA, suero albúmina bovino.

[Ca²⁺]_c, concentración de Ca²⁺ citosólico.

[Ca²⁺]_i, concentración de Ca²⁺ intracelular.

CaCCs, canales de Cl⁻ regulados por Ca²⁺.

CAUV, ausencia congénita de útero y vagina.

CatSper, canal de Ca²⁺ ligeramente dependiente de voltaje.

CBAVD, ausencia congénita bilateral del *Vas Deferens*.

CCD, diarrea congénita con pérdida de Cl⁻.

CFTR o *Cftr*, regulador de la conductancia transmembranal de fibrosis quística (proteína o gen, respectivamente), canal de Cl⁻.

CFTR-ΔF508, mutación más frecuente de CFTR.

CFTR_{inh}-172, Inhibidor de CFTR.

CFTRTM 1Unc, modelo de ratón de fibrosis quística producido en la universidad del Norte de Carolina, Chapel Hill.

Cinasa Src-c, tirosina quinasa c.

Cl_e, Cl⁻ externo.

Cl_i, Cl⁻ intracelular.

CIC-0 y CIC-1, canales de Cl⁻ regulados por voltaje.

CCDV, canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje.

C57BI/6J, fondo genético del ratón mutante ΔF508-CFTR, utilizado en este trabajo.

Db-AMPC, análogo de AMPC permeable a membrana.

Db-GMPc, análogo de GMPc permeable a membrana.

DIDS, 4,4'-diisotio-cianatoistilbeno-2,2'-ácido disulfónico.

Dlg, proteína "Discs large", supresora de tumores en *Drosophila*. Una de las primeras proteínas donde se descubrió el dominio PDZ.

DP, diferencia de potencial

DPC, difenilamina-2- ácido carboxílico.

DMSO, dimetilsulfóxido.

EGTA, ácido tetra acético etileno glycol-bis(β-aminoetil éter).

Em, potencial de membrana

↓**Em**, hiperpolarización de la membrana plasmática

ENaC, canal de Na⁺ epitelial

Ext, exterior

Ezrina, miembro de la familia de proteínas ERM, la cual incluye a radixina y moesina. Las proteínas ERM asocian el citoesqueleto de actina a proteínas de la membrana plasmática y funcionan como traductores de señales en respuesta a la remodelación del citoesqueleto.

FQ, fibrosis quística.

GABA, ácido γ-aminobutírico.

GMI, gangliósido.

CFTR-G551D, la tercera mutación más común asociada a fibrosis quística.

CFTR-G551S, mutación asociada a fibrosis quística.

CFTR-G542X, mutación asociada a fibrosis quística.

HCO₃⁻, bicarbonato

HEPES, ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina-N- [2-etanosulfónico])

HP, potencial de mantenimiento

HS, solución fisiológica.

Int, interior

IP, insuficiencia pancreática.

IP3, inositol trifosfato.

IZUMO, proteína esencial en la fusión espermatozoide-óvulo.

K_{ATP}, canales de K⁺ regulados por ATP.

[K⁺]_e, concentración de K⁺ extracelular.

K_D, constante de disociación.

KDa, kilodaltones.

KHz, kiloHertz.

K_{ir}, canal de K⁺ rectificador entrante.

Kg, kilogramo.

M, Molar

MeSO₃, metano sulfonato.

mg, miligramos.

ml, mililitro.

mM, milimolar.

Moesina, miembro de la familia de proteínas ERM, la cual incluye a “*ezrin* y *radixin*”. Las proteínas ERM asocian el

citoesqueleto de actina a proteínas de la membrana plasmática y funcionan como traductores de señales en respuesta a la remodelación del citoesqueleto

mOsm, miliosmoles.

ms, milisegundos.

mV, milivoltios.

MΩ, megaOhms.

nM, nanomolar.

NA, ácido níflúmico.

nm, nanómetros.

NBC, cotransportador Na⁺/HCO₃⁻.

NBD, dominio de unión a nucleótido.

NHERF-1, isoforma del factor regulatorio 1 del intercambiador Na⁺/H⁺. Funciona como una proteína de andamiaje.

NKCC, Cotransportador Na⁺/K⁺/Cl⁻.

NMDG, N-metil-D-glucamina.

pA, picoamperios.

Patch-Clamp, fijación de voltaje en microáreas de membrana.

PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

PDZ domain, dominio estructural de 80-90 aminoácidos que se encuentra en proteínas de señalización de diversos organismos. Estos dominios median la interacción proteína-proteína mediante la asociación a una secuencia péptica corta, localizada en la región carboxilo terminal de la proteína blanco, ayudan a anclar proteínas transmembranales al citoesqueleto y mantienen unidos los complejos de señalización.

pF, picofaradios .

pH_e, pH extracelular.

pH_i, pH intracelular.

P_i, pirofosfato inorganico.

PK, piruvato quinasa.

PKA, proteína quinasa dependiente de AMPc.

PKC, proteínas cinasas del tipo C.

PSD95, proteína de densidad postsináptica. Una de las primeras proteínas donde de descubrió el dominio PDZ.

PTK, proteína tirosina cinasa

P_K/P_{Na}, permeabilidad selectiva de K⁺ sobre la permeabilidad selectiva a Na⁺

pS, picosiemens.

R, constante de los gases.

RA, reacción acrosomal.

Radixina, miembro de la familia de proteínas ERM, la cual incluye a ezrina y moesina. Las proteínas ERM asocian el citoesqueleto de actina a proteínas de la membrana plasmática y funcionan como traductores de señales en respuesta a la remodelación del citoesqueleto.

ARN, ácido ribonucléico.

RDV, regulación de la disminución del volumen celular.

s, segundo,

SLC26A2, intercambiador aniónico Cl⁻/HCO₃⁻; 2:1.

SLC26A3, intercambiador aniónico Cl⁻/HCO₃⁻; 2:1.

SLC26A6, intercambiador aniónico Cl⁻/HCO₃⁻; 1:2.

SLC26A8, intercambiador aniónico Cl⁻/HCO₃⁻.

SLC4A2/AE2, intercambiadores aniónicos Cl⁻/HCO₃⁻, independientes de Na⁺.

SLO, familia de canales de K^+ de alta conductancia.

SLO1, canal de K^+ conocido también como “*Big potassium channel*” o maxi- K^+ activado por Ca^{2+} .

SLO3, canal de K^+ de alta conductancia, sensible a pH y Ca^{2+} .

sNHE, intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide.

Src-c, tirosina quinasa

TMD, dominio transmembranal.

TMEM16A, canal de CaCCs.

TMEM16A_{inh}, el inhibidor más específico para el TMEM16A.

TMS, segmento transmembranal.

TRF, tracto reproductor femenino.

µm, micra.

µl, microlitros.

µM, micromolar.

YAP65, proteína que se asocia a Src.

ZO-1, proteína de la “*zonula occludens*”. Una de las primeras proteínas donde se descubrió el dominio PDZ.

ZP, matriz de proteínas altamente glicosiladas que rodea al ovocito de mamíferos. Está compuesta por varias glicoproteínas, agrupadas en tres familias: ZP1, ZP2 y ZP3 (en ratón).
Inducen RA

RESUMEN

Los espermatozoides epididimales de los mamíferos deben pasar por un proceso de maduración conocido como capacitación, éste proceso ocurre en el tracto reproductor femenino para fecundar al óvulo. La capacitación de los espermatozoides es regulada por una vía dependiente de AMPc/PKA y este proceso está asociado al incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), pH intracelular (pH_i), Cl^- intracelular, fosforilación de tirosinas e hiperpolarización del potencial de membrana plasmática, en algunas especies. Una vez capacitados, los espermatozoides responden a componentes de la zona pelúcida (ZP) del óvulo con cambios de permeabilidad iónica que resultan en la Reacción acrosomal (RA). La membrana plasmática del espermatozoide se transforma gracias a esta reacción exocitótica para poder fusionarse con el óvulo. Existe amplia evidencia de la participación necesaria de diversos tipos de canales iónicos en la RA del espermatozoide. Los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de estos cambios de permeabilidad iónica no se conocen en su totalidad. Los resultados sugieren que en el espermatozoide de ratón la hiperpolarización de la membrana plasmática asociada a capacitación es regulada por una vía dependiente de AMPc/Proteína quinasa A (PKA), la cual involucra la activación de canales de K^+ de rectificación entrante (K_{ir}), así como la inhibición de canales de Na^+ (ENaCs). Por otra parte, se sabe que el Cl^- externo es necesario para la capacitación asociada a un incremento en la fosforilación de tirosinas, hiperactivación, inducción de la RA y fertilización. En conjunto, estos datos sugieren que el Cl^- juega un papel crucial en la regulación de este proceso.

El regulador de la conductancia transmembranal de fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés), es un canal de Cl^- regulado por AMPc/PKA y ATP, desempeña un papel

crucial en el transporte de Cl^- y HCO_3^- en diversos tipos celulares e interactúa con otras proteínas mediante complejos funcionales multimoleculares, los cuales entre otras funciones, modulan el transporte iónico. La ausencia o las mutaciones en el gene CFTR generan fibrosis quística (FQ), un padecimiento autosómico recesivo letal, el más común en la población caucásica. La ΔF508 es la mutación más frecuente en el canal CFTR y genera un fenotipo de FQ severo debido a que la proteína es degradada antes de llegar a la membrana apical de las células epiteliales. Algunos de los síntomas de la FQ incluyen sudor excesivamente salado, dificultad para digerir y extraer nutrientes de los alimentos, enfermedades pulmonares, insuficiencia pancreática e infertilidad, entre otros.

Dado que los canales iónicos desempeñan un papel crítico en la movilidad, maduración e inducción de la RA del espermatozoide y que el canal CFTR ha sido identificado tanto por detección inmunológica como por el uso de inhibidores específicos en los espermatozoides de humano y ratón; en el presente trabajo investigamos la presencia funcional del canal CFTR, así como el efecto de agonistas e inhibidores de dicho canal en los espermatozoides testiculares y epididimales de ratón.

Nuestros registros electrofisiológicos de fijación de voltaje en micro áreas de membrana en el espermatozoide testicular de ratón muestran que la mayor contribución a la corriente registrada, al menos en nuestras condiciones experimentales, corresponde a Cl^- en el espermatozoide testicular y epididimal. De manera interesante, identificamos una corriente selectiva a Cl^- en la membrana dependiente de ATP, estimulada por AMPc, GMPc y Genisteína (agonista del CFTR, a baja concentración), e inhibida por DPC y CFTR_{inh}-172, dos antagonistas del CFTR bien caracterizados. Además, los resultados nos permiten proponer que el CFTR podría tener una actividad basal, debido al bloqueo parcial de la corriente tanto por DCP como CFTR_{inh}-172, respectivamente en el espermatozoide. Consistente con lo anterior, la corriente de Cl^- activada por AMPc e inhibida por CFTR_{inh}-172 no se observa en

los registros de espermatozoides testiculares del ratón mutante nulo en CFTR, $\Delta F508$ -CFTR, indicándonos que éste canal es el componente responsable de estas corrientes.

En este sentido, la corriente resistente a DPC registrada en nuestras condiciones experimentales refleja la contribución de otros canales iónicos presentes en el espermatozoide. Al analizar la posible contribución de otros canales de Cl^- en la corriente de los espermatozoides testiculares mediante el uso de un bloqueador de canales aniónicos, ácido niflúmico (AN), inhibidor de los CaCCs, nuestros resultados indican que parte de la inhibición de la corriente de Cl^- es por un componente sensible a este inhibidor. Por otra parte, el patrón de selectividad iónica que se obtuvo del canal fue: $\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{HCO}_3^-$, con base a estos resultados se pudo establecer que el canal muestra un patrón de selectividad similar al reportado previamente para el canal CFTR expresado heterológamente. Nuestros resultados indican que la magnitud de la estimulación de la corriente de Cl^- por genisteína, depende de su concentración ya que a concentraciones más altas de genisteína (50 μM) tienen menor efecto estimulante, esto es porque al parecer hay dos sitios de unión para genisteína, uno de alta afinidad que estimula y uno de menor afinidad que inhibe al CFTR. Estos resultados son consistentes con los datos reportados para la respuesta del CFTR a genisteína.

De la misma forma, en este trabajo analizamos la posibilidad de que las corrientes tipo CFTR prevalecieran en los espermatozoides durante la maduración epididimal. Los experimentos revelan que hay corrientes de Cl^- en los espermatozoides epididimales que son estimuladas por db-AMPC y bloqueadas por CFTR_{inh}-172, de manera similar a aquellas obtenidas en los espermatozoides testiculares con características consistentes con la presencia del canal CFTR en espermatozoides más maduros. Estos hallazgos indican la presencia de canales CFTR funcionales que se conservan en el espermatozoide maduro durante su tránsito a partir del testículo hasta el epidídimo. Por último, otro componente de las corrientes de Cl^- del presente trabajo, es semejante a lo reportado en las células de Paneth del cobayo, que

carecen del canal CFTR. Estas células despliegan corrientes con características muy similares a las del CFTR debido a que son estimuladas por db-AMPC, dependientes de ATP y bloqueadas por DPC, inclusive a potenciales positivos. Además, una corriente selectiva a Cl^- que muestra características del CFTR, también fue identificada en la gota citoplasmática de los espermatozoides epididimales de ratón. En conjunto, estos resultados sugieren que el CFTR está involucrado en el incremento en la concentración de Cl^- intracelular ($[\text{Cl}^-]_i$), inducido por db-AMPC en espermatozoides no capacitados, lo cual es consistente con otros datos funcionales que indican que los canales CFTR participan durante la capacitación de los espermatozoides.

Este trabajo constituye el primer reporte de la presencia funcional del canal CFTR en los espermatozoides testiculares y epididimales de ratón.

SUMMARY

Mammalian epididymal sperm need to undergo a maturational process in the female reproductive tract, named capacitation, to become competent to fertilize the female gamete and generate a new individual. This complex process involves increases in intracellular pH (pH_i), Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$), protein tyrosine phosphorylation and plasma membrane hyperpolarization in some species. Sperm capacitation depends on a cAMP/protein kinase A (PKA) pathway and prepares sperm to undergo a physiologically induced exocytotic process known as acrosome reaction (AR), which is accompanied by the development of a hyperactivated motility; an asymmetric mode of flagellar beating. In mouse sperm, the capacitation-associated hyperpolarization is thought to result from activity changes in K^+ channels (Slo3), K^+ channels inward rectifiers (Kir), and amiloride sensitive epithelial Na^+ channels (ENaCs). On the other hand, it is known that external Cl^- is required for capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation, hyperactivation, the zona pellucida (ZP)-induced AR and fertilization. Furthermore, it has been shown that $[\text{Cl}^-]_i$ increases during capacitation. Altogether, these data suggest that Cl^- has an essential role in the regulation of this process.

The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), is a Cl^- -selective ion channel, regulated by cAMP-dependent PKA and ATP, which plays an important role in Cl^- and HCO_3^- transport in several organs. In these organs, CFTR assembles into large, dynamic macromolecular complexes that contain signaling molecules, PDZ-domain-containing proteins, myosin motors among others components. Cystic Fibrosis (CF) is the most common lethal genetic disorder in caucasian population and it is caused by mutations in the gene encoding for the CFTR protein. Symptoms of CF include excessively

salty sweat, difficulty digesting food and extracting nutrients, lungs disease, pancreatic insufficiency, infertility, and others.

Since ion channels play a critical role in the maturation, motility, and AR induction in sperm and CFTR channel has been identified either by immunological detection or using specific inhibitors in human and mouse sperm, in this study we investigated the functional presence of CFTR channel in epididymal and testicular mouse sperm.

Our whole-cell patch-clamp recordings from testicular mouse sperm revealed a Cl^- selective component to membrane current that is ATP-dependent, stimulated by cAMP, cGMP and genistein (a CFTR agonist, at low concentrations), and inhibited by DPC and CFTR_{inh}-172, two well-known CFTR antagonists. Furthermore, the Cl^- current component activated by cAMP and inhibited by CFTR_{inh}-172 is absent in recordings on testicular sperm from mice possessing the CFTR ΔF508 loss-of-function mutation, indicating that CFTR is responsible of this component. On the other hand, our results suggest that there are basally active CFTR channels. A Cl^- selective like current component displaying CFTR characteristics was also found in wild type epididymal sperm bearing the cytoplasmatic droplet. These findings indicate that functional CFTR channels are present in mouse sperm mature in transit from the testicle through the epididymis. Furthermore, these findings are consistent with other functional data, indicating that CFTR channels play a fundamental role during capacitation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de la fecundación

La fecundación es uno de los eventos biológicos más importantes. Ésta permite la generación de nuevos individuos, la recombinación genética, así como el incremento en la probabilidad de la preservación de las especies en el tiempo. Los gametos requieren para su encuentro y fusión una serie de eventos de señalización complejos, los cuales dan inicio al programa de desarrollo. Se conocen dos tipos de reproducción, la asexual y sexual. La asexual se define como la generación de nuevos organismos genéticamente idénticos a partir de un sólo progenitor. Este tipo de reproducción no involucra la participación de gametos. En contraste, la reproducción sexual implica la participación de los gametos (femenino y masculino) de dos individuos de la misma especie, dando origen a un nuevo individuo con carga genética diferente a la de los padres (por recombinación del material genético de los gametos) (Yanagimachi, 1994). La posibilidad de generar nuevas combinaciones de genes, y por consiguiente de una diversidad genética prácticamente infinita, les confiere a los organismos de reproducción sexual ventajas evolutivas sobre los organismos de reproducción asexual, quienes tienen menos diversidad genética (Lodish *et al.*, 2007).

1.2 Los gametos

Los gametos son células germinales maduras que poseen un juego de cromosomas haploides capaces de iniciar la formación de un nuevo individuo por fusión con otro gameto. Estrictamente hablando, el término gameto se aplica sólo antes de la fecundación (Harper, 1994; Wassarman y Albertini, 1994; Eddy y O'Brien, 1994). Al momento de la

ovulación, el óvulo ya sufrió la primera división meiótica con la exclusión del primer cuerpo polar y llega al estado de metafase de la segunda división meiótica, donde se detiene hasta que ocurra la activación. Dicho proceso se inicia después de que el espermatozoide penetra la capa vitelina y se fusiona con la membrana plasmática del óvulo. Los espermatozoides eyaculados se producen a través de dos divisiones meióticas que dan origen a cuatro espermatozoides a partir de un espermatocito primario. El espermatozoide desempeña un papel crucial en este proceso muy especializado. El espermatozoide de mamífero debe de pasar por un proceso de maduración complejo en el tracto genital femenino durante un periodo de tiempo definido conocido como capacitación. Dicho evento es indispensable para la fecundación (Chang, 1951; Austin, 1952).

1.2.1 El óvulo

En los mamíferos, la ovogénesis se desarrolla tempranamente durante el desarrollo fetal y en el adulto sexualmente maduro. La ovogénesis se inicia con la formación de células germinales primordiales que armónicamente se transforman en ovogonias (de feto), luego en ovocitos y finalmente en óvulos (en el adulto). A través de la vida reproductiva de los mamíferos, los ovarios contienen un número limitado de ovocitos no crecidos y crecidos detenidos en la primera profase meiótica. Sin embargo, sólo los ovocitos crecidos completamente sufren meiosis y son ovulados durante cada ciclo reproductivo (estro). Las gonadotropinas pituitarias controlan el reclutamiento de ovocitos crecidos. El volumen de un ovocito de ratón se incrementa hasta 300 veces en la fase de crecimiento de 2 ó 3 semanas. Este crecimiento del ovocito indica un periodo de intensa actividad metabólica y refleja también cambios marcados en su ultraestructura como el surgimiento de nuevos organelos (gránulos corticales, zona pelúcida) (Wassarman y

Albertini, 1994). El óvulo humano, mide aproximadamente 100 μM de diámetro, posee un núcleo, nucléolo, mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y gránulos corticales (Gilbert, 2006; Wassarman y Albertini, 1994). El óvulo está cubierto por una capa extracelular constituida de glicoproteínas llamada ZP (matriz de proteínas altamente glicosiladas) y ésta a su vez se encuentra rodeada por una gran cantidad de células foliculares, denominadas células del *cumulus oophorus*, que a su vez forman la capa de la corona radiada.

1.2.2 El espermatozoide

Espermatogénesis

La espermatogénesis, o formación de los gametos masculinos, es un proceso complejo, continuo y finamente regulado que consiste en una serie de divisiones celulares que concluyen en la formación de células haploides (meiosis), las cuales llevan a cabo un proceso de especialización celular denominada espermiogénesis que da lugar a la formación de espermatozoides maduros. En los mamíferos, la espermatogénesis se lleva a cabo de forma continua durante toda la vida del organismo adulto y se caracteriza por la etapa mitótica y meiótica, las cuales involucran a tipos celulares perfectamente definidos. La primera etapa tiene como objetivo la autorrenovación de las células germinales denominadas espermatogonias (Krester y Kerr, 1988; Garner y Hafez, 1987), las cuales son responsables de generar a los siguientes tipos celulares para la meiosis, fase donde ocurre la reducción del número de cromosomas que contienen cada una de las células como consecuencia de las dos divisiones celulares consecutivas características de este tipo de división celular (Wolgemuth *et al.*, 2013)

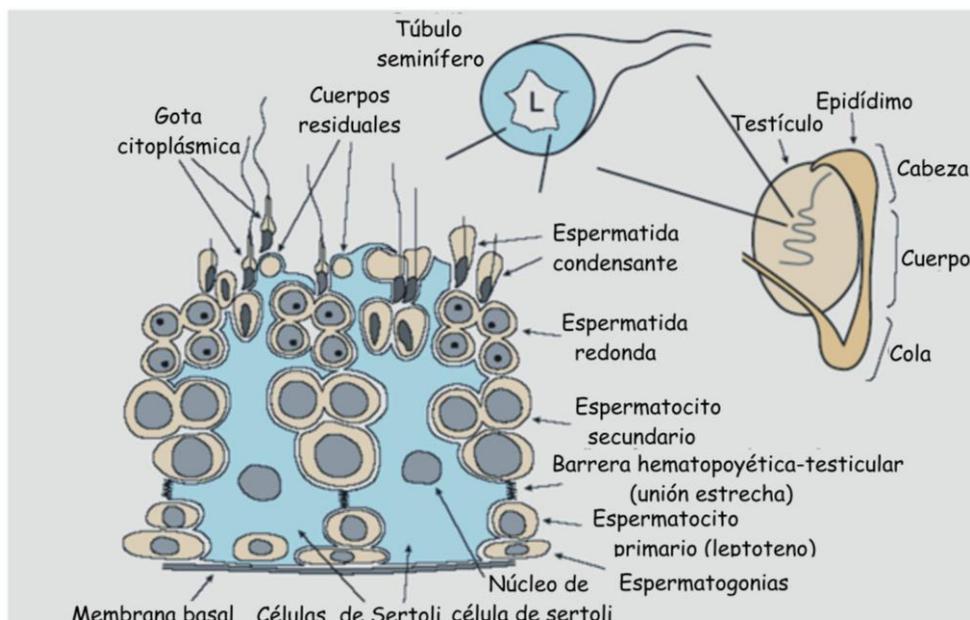


Figura 1: Esquema de la espermatogénesis.

La espermatogénesis comienza en el compartimento basal y continúa hasta el lumen de los túbulos seminíferos, estructural y funcionalmente con células nodrizas esenciales, llamadas células de Sertoli. Las espermatogonias residen en el compartimento basal y proliferan. Los espermátocitos primarios (leptoteno) se diferencian a partir de las espermatogonias. Los espermátocitos secundarios (paquíteno y diploteno) son generados por la primera meiosis, transformándose en espermátidas redondas por la segunda meiosis. Las espermátidas alargadas son células en proceso de espermiación experimentando la transformación morfológica notable del núcleo y el cuerpo celular. En el proceso final de la espermiación, la mayoría del citoplasma se eliminará (fagocitado por las células de Sertoli) para formar espermatozoides completamente desarrollados (el citoplasma residual se conoce como gota citoplásmica). En medio: Túbulo seminífero y su sección transversal. Los espermatozoides recién generados en el testículo son transportados hacia el epidídimo a través del lumen del túbulo (L). Derecha: Testículo y epidídimo. El testículo está repleto de túbulos seminíferos, uno de ellos se representa como una línea gris dentro del testículo. El epidídimo consta de túbulos individuales altamente empaquetados. Este órgano se puede dividir en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. El tránsito de los espermatozoides a lo largo de los túbulos epididimales es un requisito para su maduración (modificado de Darszon, *et al.*, 2011).

Espermiogénesis

La espermiogénesis es un proceso de diferenciación celular que inicia con las espermátidas condensantes y que concluye con la formación de los espermatozoides (Krester y Kerr, 1988; Garner y Hafez, 1987). De manera inicial, las espermátidas

condensantes son células esféricas con un diámetro de 8 a 10 μm , de citoplasma, núcleo pequeño con cromatina homogénea y con un prominente nucleólo central. Es en esta etapa donde aparecen los flagelos (Bellvé, 1993). La observación del desarrollo acrosómico utilizando la tinción de PAS (ácido periódico de Schiff) ha permitido describir 4 fases de la espermiogénesis: La fase de Golgi, la de capuchón, la acrosómica y la de espermiación (Krester y Kerr, 1988; Duane *et al.*, 1989). La serie de cambios morfológicos durante la espermiogénesis, resulta en la transformación de una célula esférica (la espermátida condensante, ver **figura 1.2.2**) a una célula alargada con la formación de nuevos organelos como el acrosoma y el flagelo, también ocurre reorganización y eliminación de la mayor parte del citoplasma así como la supercondensación del material genético que en conjunto, con los cambios en el citoesqueleto dan al núcleo la forma característica de cada especie. Al final de la espermiogénesis, el espermatozoide se libera al lumen de los túbulos seminíferos para comenzar su travesía por el tracto reproductor masculino (ver **figura 1.2.2**).

Morfología del espermatozoide

El espermatozoide presenta importantes variaciones tanto en forma como en tamaño entre las diferentes especies de mamíferos, pero en términos generales se compone por: la cabeza y el flagelo o cola, los cuales se unen al cuello (Gartner y Hiatt, 2002) (ver **fig. 1.2.2.1**). Esto hace parecer al espermatozoide como una célula simple, sin embargo, de manera contraria su forma y función son altamente especializadas para poder cumplir con su objetivo, llevar la información genética al óvulo para así activarlo y comenzar el desarrollo de un nuevo organismo. En la cabeza (2-5 μm) se encuentra el núcleo y el

acrosoma (vesícula ácida derivada del Golgi), ambos rodeados de una pequeña cantidad de citoplasma. A diferencia de una célula somática que contiene cada cromosoma en dos copias (diploide), el núcleo del espermatozoide contiene los cromosomas sin copia (aploide), los cuales se presentan altamente condensados. Por otra parte, el acrosoma es un organelo que cubre la parte anterior de núcleo, está delimitado por las membranas acrosomal interna y externa, y contiene enzimas hidrolíticas (hialuronidasa y acrosina, entre otras) que le permiten al espermatozoide penetrar las capas más externas del óvulo. Por otro lado, el flagelo está compuesto por la pieza media, la pieza principal y la terminal. La pieza media posee una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal, que proveen de energía al espermatozoide, produciendo trifosfato de adenosina (ATP). A lo largo de la pieza media y principal se encuentra el axonema que provee de movimiento al espermatozoide debido a la hidrólisis del ATP (Eddy y O'Brien, 1994).

Varios reportes han demostrado que una vez que el espermatozoide ha alcanzado su madurez es incapaz de sintetizar proteínas (Dun *et al.*, 2012), las proteínas necesarias para su función se generan únicamente durante su diferenciación en el testículo (Baker, 2011). Otro de los órganos que conforman el sistema reproductor masculino, es el epidídimo. Este se puede dividir en tres regiones principales: La cabeza (*caput*), el cuerpo (*corpus*) y la cola (*cauda*). De esta manera, a medida que el espermatozoide avanza por el epidídimo ocurren una serie de cambios fisiológicos en esta célula, necesarios para afrontar la variedad de ambientes cambiantes durante su siguiente recorrido, el tracto reproductor femenino (TRF). El viaje del espermatozoide por el epidídimo requiere de un tiempo de transporte relativamente largo, en algunas especies toma de 10-13 días (excepto en los espermatozoides de humano, los cuales requieren de un tiempo menor de transporte de 2 a 6 días) a lo largo de los ductos especializados, donde continúa el proceso de maduración de

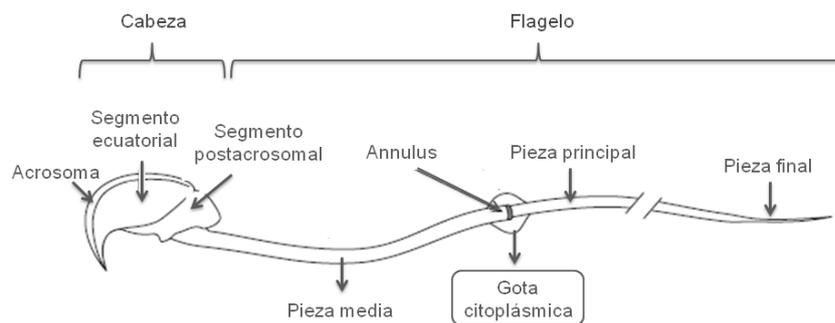


Figura 2: Esquema de la morfología del espermatozoide de ratón.

El espermatozoide de ratón puede dividirse básicamente en dos partes principales: La cabeza y el flagelo. La cabeza a su vez, consta del acrosoma, del segmento ecuatorial, del segmento postacrosomal y núcleo que contiene el ADN. A su vez, el flagelo se divide en pieza media (región donde se ubican las mitocondrias), pieza principal y pieza terminal. La estructura que separa la pieza media de la pieza principal en el flagelo del espermatozoide se conoce como *annulus*. La gota citoplásmica es otro de los orgánulos presentes en el flagelo del espermatozoide, se localiza de manera inicial en la unión del flagelo y la cabeza, para posteriormente desplazarse a lo largo de la pieza media del flagelo, éste es un rasgo característico de la maduración del espermatozoide (modificado de Darszon *et al.*, 2011).

dicho tipo celular (Dacheux *et al.*, 2012; Hunh y Suarez, 2010; Turner, 2008). (Fig 1.2.2).

Durante su almacenamiento en el epidídimo, el pH_i del espermatozoide es relativamente ácido (~ 6.5) lo que probablemente contribuye al mantenimiento del estado no capacitado (Parrish *et al.*, 1989; Zeng *et al.*, 1996; Muñoz-Garay *et al.*, 2001) y a prolongar la viabilidad del gameto (Yanagimachi, 1994a). En esta etapa de maduración, ocurren cambios funcionales en procesos metabólicos así como en eventos de fosforilación y defosforilación de las proteínas motoras (microtúbulos conectados a dineínas) del axonema, entre otros que dan como resultado la activación de la motilidad (Darszon *et al.*, 2006). De manera interesante, los espermatozoides que se localizan en el *caput* del epidídimo son menos móviles y tienen menor capacidad de llevar a cabo la capacitación, por lo tanto de fecundar en comparación con aquellos que provienen del *corpus* y de la *cauda* epididimal. Por otra parte, los espermatozoides testiculares que transitan hacia el

epidídimo, encuentran un incremento en la osmolaridad del medio externo que va de 280 mmol/kg (fluido de la red testicular) a 400 mmol/kg (fluido de la cauda epididimal) (Yeung *et al.*, 2006). Finalmente, cuando los espermatozoides pasan del semen al mucus cervical experimentan otro cambio importante en la osmolaridad (la osmolaridad en vasos deferentes es de 342 mmol/kg mientras que en el mucus es de 287 mmol/kg) (Yeung *et al.*, 2006). Por lo anterior, para contrarrestar el estrés osmótico que experimenta el espermatozoide, utiliza el mecanismo de regulación de la disminución del volumen (RVD, por sus siglas en inglés), el cual involucra la entrada y salida de agua y osmolitos (Yeung *et al.*, 2006) y probablemente la participación de canales de Cl^- y K^+ . De manera interesante, los espermatozoides localizados en la *cauda* epididimal poseen mayor capacidad para regular su volumen en contraste con los espermatozoides de las otras regiones epididimales.

1.2.3 Fisiología del espermatozoide

Capacitación

Cuando los espermatozoides son liberados del epitelio seminífero aún son inmaduros es decir, incapaces de fertilizar al óvulo (Chang, 1951; Austin, 1952; revisado en Yanagimachi, 1994). Para ello, el espermatozoide debe de completar una serie de procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos denominados capacitación. La capacitación es un fenómeno de maduración del espermatozoide de mamífero, con la cual adquiere la capacidad de fecundar al óvulo. Fisiológicamente, este proceso ocurre en el TRF, específicamente en una región del oviducto denominada istmo (**Fig.1.2.3**), durante un periodo de tiempo definido, donde las secreciones sitio específicas de los componentes del

fluido del tracto genital promueven este proceso de maduración (Lakoski *et al.*, 1988; Yanagimachi, 1994). No todos los espermatozoides se capacitan y salen del istmo al mismo tiempo. Esto podría deberse a las diferencias fisiológicas propias de cada espermatozoide (Yanagimachi, 1994; revisado en Knobil *et al.*, 1994).

En la actualidad, la capacitación se considera como un proceso que prepara al espermatozoide para la reacción acrosomal (RA), donde la hiperpolarización puede regular la capacidad del espermatozoide para generar aumentos transitorios de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), durante la RA (Zeng *et al.*, 1995; Florman *et al.*, 1998; Arnoult *et al.*, 1999; Muñoz-Garay *et al.*, 2001; Acevedo *et al.*, 2006) Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos moleculares involucrados en la capacitación (Baldi *et al.*, 1996; Visconti y Kopf, 1998; Wassarman *et al.*, 2001).

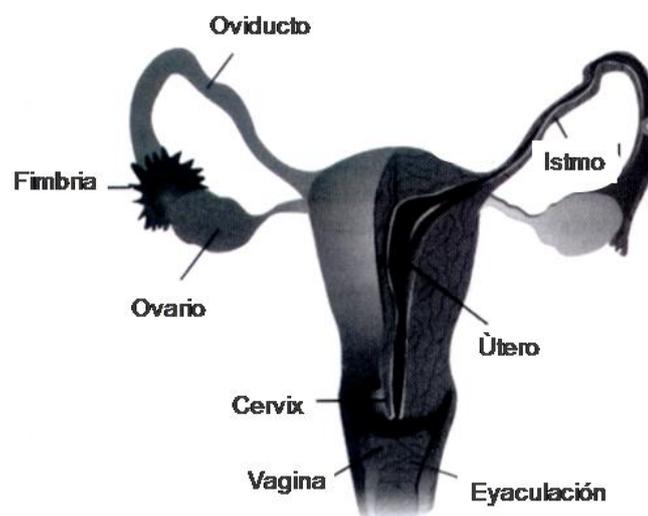


Figura 3: Esquema del tracto reproductor femenino de mamíferos.

Se muestran las distintas regiones del sistema reproductor femenino, así como el lugar donde se encuentra el óvulo y las células del *cumulus oophorus* que le rodean (Modificado de Kaupp *et al.*, 2008).

Hasta el momento, sabemos que en el espermatozoide de ratón la capacitación incluye la reorganización de la membrana plasmática, incremento en la fosforilación de proteínas, hiperpolarización del potencial de membrana plasmática, incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, de pH intracelular (pH_i) y movilidad hiperactivada (Darszon *et al.*, 2005; Visconti *et al.*, 2002).

Uno de los eventos que acompaña a la capacitación del espermatozoide es la señalización intracelular. Dicho suceso puede estar acoplado a cambios en la concentración iónica durante la capacitación. El cambio en el metabolismo de nucleótidos cíclicos así como la fosforilación de proteínas son eventos implicados en diversas funciones del espermatozoide, que comprenden el inicio y mantenimiento de la movilidad (Garbers y Kopf, 1980; Tash y Means, 1983; Lindemann y Kanous, 1989; Yanagimachi, 1994), capacitación (Berger y Clegg, 1983; Stein y Fraser, 1984; Monks *et al.*, 1986) e inducción de la RA (Garbers y Kopf, 1980; Kopf y Gerton, 1991). De manera interesante, el espermatozoide posee una adenilato ciclasa soluble (ACs) específica de este tipo celular (Sinclair *et al.*, 2000), y distinta de las AC de membrana (ACt) de las células somáticas. La ACs se activa por bicarbonato (Chen *et al.*, 2000; Cann, 2004; Livera *et al.*, 2005) y es independiente de proteínas G o pH_i (revisado en Darszon *et al.*, 2001). Como una consecuencia de la activación de las ACs, se ha reportado un aumento en el nivel de adenosin monofosfato cíclico (AMPc, por sus siglas en inglés) intracelular $[AMPc]_i$, asociado a la capacitación (Visconti y Tezón, 1989; Visconti *et al.*, 1995). Como se sabe, este incremento activaría a una proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) (Visconti *et al.*, 1999), la cual participa en los eventos de fosforilación de distintas proteínas presentes en el espermatozoide (Harrison, 2004) involucradas en una o más de las cascadas de señalización que aún quedan por definir (revisado en Gadella y Harrison, 2000). Más aún, la PKA probablemente también participa en

la activación de una proteína tirosina cinasa (PTK) (revisado en Darszon *et al.*, 2001), la cual fosforila a un subgrupo de proteínas específicas (Demarco *et al.*, 2003). Así, las cinasas estimuladas, a través de fosforilación modifican la estructura de algunas proteínas de membrana y/o axonema del espermatozoide (Huacuja *et al.*, 1977; Hyne y Edwards, 1985). Además, PKA también interviene en eventos implicados en la reorganización de la composición lipídica de la membrana del espermatozoide inducida por el HCO_3^- , uno de los componentes claves para la capacitación (Gadella y Harrison, 2000) y en el ratón va de la mano de la hiperpolarización del espermatozoide (Y. Zeng *et al.*, 1995). Sin embargo, aún no entendemos por completo el papel del AMPc en el proceso de la capacitación, en la hiperpolarización y en la RA. Así pues, la fosforilación durante la capacitación del espermatozoide de ratón y humano depende de Ca^{2+} y HCO_3^- externos (Visconti *et al.*, 1995a; b; Baldi *et al.*, 1996; Luconi *et al.*, 1996; Naz *et al.*, 1996; Emiliozzi y Fenichel, 1997).

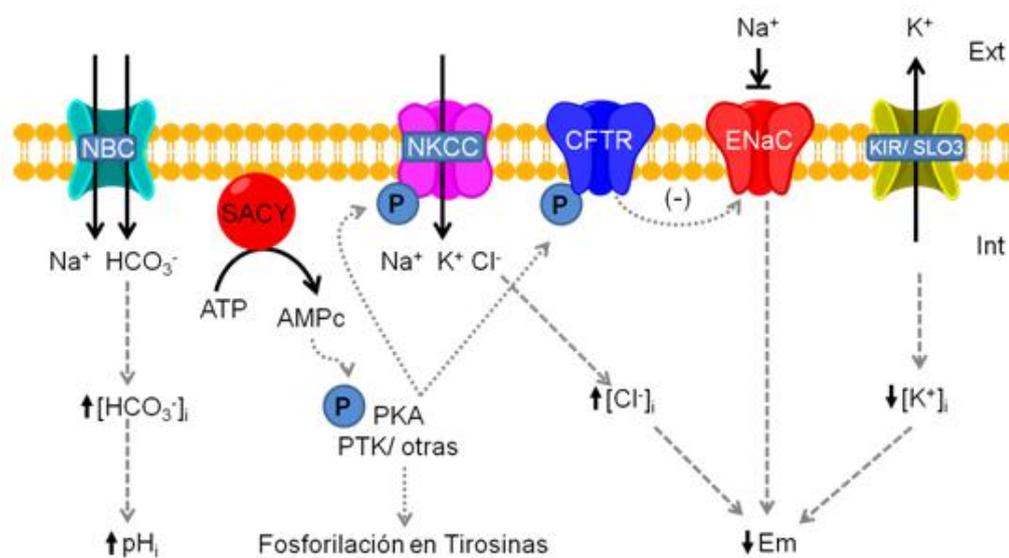


Figura 4: Eventos asociados a la capacitación.

El espermatozoide experimenta una serie de cambios en las concentraciones iónicas intracelulares en el tracto reproductor femenino. Los mecanismos de transporte

responsables de dichos cambios se localizan en la membrana plasmática. Entre ellos encontramos al NBC, encargado del transporte de HCO_3^- hacia el interior de la célula; este HCO_3^- activa a la ACs, la cual sintetiza AMPc. El incremento en el nivel de AMPc activa a cinasas como PKA y PKT, las cuales fosforilan diversas proteínas, entre ellas transportadores y canales de Cl^- y HCO_3^- (p.ej. CFTR y NKCC, entre otros), lo que favorece la entrada de dichos iones a la célula. El cierre de los canales ENaC vía CFTR, en conjunto con la apertura de canales de K^+ (Kir/SLO3) podrían en parte, hiperpolarizar el potencial de membrana durante la capacitación. NBC: cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$; ACs: Adenilato ciclasa soluble; NKCC: Cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$; CFTR: Regulador de la conductancia transmembranal asociado a Fibrosis quística; ENaCs: Canal de Na^+ epitelial; Kir: Canal de K^+ rectificador entrante; PKA: Proteína cinasa A; PKT: Proteína tirosina cinasa; $\downarrow E_m$: hiperpolarización de la membrana plasmática (Chávez *et al.*, 2012).

Durante su almacenamiento en el epidídimo, el pH_i del espermatozoide es relativamente ácido (~ 6.54) lo que podría contribuir al mantenimiento del estado no capacitado (Parrish *et al.*, 1989; Zeng *et al.*, 1996; Muñoz-Garay *et al.*, 2001) y a prolongar la viabilidad del gameto (Yanagimachi, 1994a). Además, el pH_i ácido también podría funcionar como un regulador negativo de canales como CatSper, Slo3 y Kir que se discutirán posteriormente, lo que mantendría un potencial de membrana (E_m) depolarizado y de manera indirecta, evitaría la entrada de Ca^{2+} y con ello la RA. Por otro lado, se ha reportado que el potencial de reposo de la membrana plasmática en el espermatozoide de ratón, antes de la capacitación es de aproximadamente -40 mV; esto es relativamente depolarizado y depende de la concentración extracelular de Na^+ ($[\text{Na}^+]_o$), lo que sugiere que el Na^+ contribuye de manera importante en la regulación del E_m del espermatozoide (Hernández-González *et al.*, 2006; Escoffier *et al.*, 2012). De manera contraria, la permeabilidad a Na^+ se ve reducida durante la capacitación, contribuyendo en parte, a la hiperpolarización (Hernández-González *et al.*, 2006; Escoffier *et al.*, 2012). Uno de los posibles candidatos que contribuyen en parte, a generar esta depolarización del E_m es un canal de Na^+ epitelial (ENaC). Esto se debe a que la depolarización inducida por Na^+ se activa por acidificación externa (pH_e 6.8) y se inhibe por amilorida (un compuesto que bloquea a estos canales a concentraciones submicromolares), lo que genera una

hiperpolarización del E_m en espermatozoides no capacitados de ratón a niveles similares a los observados en condiciones capacitantes (Hernández-González *et al.*, 2006). En este sentido, se han detectado algunas de las subunidades que conforma a ENaC en espermatozoides maduros mediante “western blot” e inmunofluorescencia (Hernández-González *et al.*, 2006). Por otro lado, otro de los posibles candidatos para generar dicha depolarización es el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. De esta manera, una vez iniciada la capacitación el pH_i se incrementa (de 6.5 a 6.7) (Vredenburg-Wilberg y Parrish, 1995; (Y. Zeng *et al.*, 1996) por la participación del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ (Y. Zeng *et al.*, 1996).

El resultado de varias investigaciones sugiere que tanto canales de K^+ como de Cl^- participan en algunas de las principales funciones del espermatozoide. Como se mencionó previamente, la hiperpolarización del E_m es un evento clave en la capacitación de espermatozoides de bovino y ratón (Arnoult *et al.*, 1996; Arnoult *et al.*, 1999; Demarco *et al.*, 2003; Muñoz-Garay *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 1995), hasta ahora, no se había demostrado que en los espermatozoides de humano ocurra una hiperpolarización. Esto pudiera deberse al hecho de que una fracción mucho menor de espermatozoides de humano se capaciten en un periodo de tiempo determinado en comparación con los espermatozoides de ratón (Cohen-Dayag *et al.*, 1995). Por lo que lograr registrar los cambios en el voltaje de membrana en una fracción de espermatozoides había resultado complicado. Sin embargo, recientemente nuestro grupo observó que una subpoblación de espermatozoides de humano se hiperpolariza en el medio capacitante para la fecundación *in vitro*, lo anterior utilizando la técnica de citometría de flujo (López-González *et al.*, 2014). Este evento correlaciona con otros dos fenómenos bien caracterizados en el proceso de capacitación, como son el incremento en el pH y Ca^{2+} intracelular. Esta

hiperpolarización en el potencial de membrana del espermatozoide se borra en presencia de K^+ externo (60 mM), lo cual indica la participación de canales de K^+ durante este cambio en el potencial de membrana. Para determinar a las entidades moleculares participantes en este evento se utilizaron diversos inhibidores de canales de K^+ como caribdotoxina, slotoxina e iberotoxina (bloqueadores para SLO1) y clofilium (bloqueador más específico para SLO3). Los antagonistas de canales de K^+ , previamente mencionados inhiben la hiperpolarización del potencial de membrana, lo que sugiere fuertemente que ambos miembros de la familia Slo podrían estar participando en este evento.

Se ha propuesto, que la hiperpolarización va desde -50 a -80 mV (Arnoult *et al.*, 1999; Demarco *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 1995; Muñoz-Garay *et al.*, 2001). Como en otras células, los espermatozoides pueden mantener gradientes iónicos a través de la membrana plasmática debido a la presencia funcional de distintas entidades moleculares que transportan a dichos iones. Así, la concentración de K^+ en el interior del espermatozoide es alta en comparación con el exterior, donde la concentración de Na^+ es elevada. Este gradiente se mantiene gracias a la actividad de una Na^+/K ATPasa. De acuerdo a Babcock (1983), las concentraciones intracelulares de K^+ y Na^+ en el espermatozoide (de la región caudal del epidídimo) de bovino son aproximadamente 120 y 14 nM, respectivamente. Las concentraciones iónicas en el interior y exterior de la célula se mantienen constantes hasta antes de la capacitación, donde el K^+ tiende a disminuir y el Na^+ a incrementarse en el interior celular. Sabemos que el E_m del espermatozoide está regulado principalmente por la relación de permeabilidad entre los canales de K^+ de alta conductancia, SLO3 (Santi *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011; Chávez *et al.*, 2013) canales de la gran familia de SLO conocidos también como “Big potassium (BK) channel” o “maxi-K”. Su nombre proviene del gene

que codifica para este canal, clonado por primera vez en *Drosophila* y los canales de K^+ rectificadores entrantes (K_{ir}) (Muñoz-Garay *et al.*, 2001; Acevedo *et al.*, 2006). Estos últimos se inhiben por acidificación intracelular y por sulfonilureas (p.ej. tolbutamida y glibenclamida). Los canales Slo3 se activan por alcalinización (al igual que los K_{ir}) y por AMPc. De manera interesante, los espermatozoides de ratones nulos en *Slo3* no experimentan la hiperpolarización asociada a la capacitación. Además, el porcentaje de RA en los espermatozoides está disminuido y son infértiles. Por otro lado, antes de iniciar la capacitación, el canal K_{ir} presenta una baja probabilidad de apertura a $pH_i \sim 6.4$. No obstante, una vez iniciada la capacitación el espermatozoide presenta una serie de cambios que incluye entre otros, incrementos de pH_i (~ 6.7) (Zeng *et al.*, 1996) así como de la $[AMPc]_i$ (Visconti y Tezón, 1989; Visconti, *et al.*, 1995), los cuales podrían aumentar la probabilidad de apertura de estos canales cambiando de este modo la relación de permeabilidad con respecto al canal SLO3. El hecho de que el canal SLO3 sea pobremente selectivo para K^+ con respecto a Na^+ ($P_K/P_{Na} \sim 5$), permite establecer que en concentraciones fisiológicas de Na^+ y K^+ intracelulares y extracelulares (Espinosa *et al.*, 1995), el canal genera un E_m de ~ -45 mV, lo cual indica que el Slo3 no determina por completo el E_m de la célula. Considerando que el E_K es negativo respecto al E_m de reposo, la apertura de canales de K^+ como los K_{ir} (con alta selectividad por K^+) desplazaría el E_m hacia el E_K (~ -90 mV) hiperpolarizando el E_m ; mientras que el cierre de canales de K^+ generaría una depolarización. De este modo, K_{ir} contribuiría en parte, a la hiperpolarización del E_m durante la capacitación como fue reportado por Arnoult (1996) (ver modelo en la **figura 1.2.3.1**). Por otra parte, entre los distintos tipos de canales rectificadores salientes encontramos a los canales de K^+ regulados por ATP (K_{ATP}), los cuales también participan en el proceso de capacitación. Los K_{ATP} se inhiben por un alto nivel de ATP intracelular depolarizando el E_m . Estudios previos han mostrado que durante la capacitación el

contenido de ATP en los espermatozoides disminuye (Baker *et al.*, 2004). Esto aumentaría la probabilidad de apertura de los K_{ATP} y contribuiría en parte, a la hiperpolarización del E_m , lo cual es consistente con lo que hasta la fecha, se ha propuesto para el comportamiento del E_m durante la capacitación. Además, los K_{ATP} son regulados por CO_2/pH . La activación máxima del canal va de pH 6.5 a 6.8 y su inhibición va de pH 6.2 a 5.9 (Wang *et al.*, 2003). A partir del incremento de pH durante la capacitación del espermatozoide de ~6.5 a ~6.7 (Vredenburg-Wilberg y Parrish, 1995; Zeng *et al.*, 1996), los K_{ATP} podrían activarse por este cambio. Por otro lado, se ha documentado un cotransportador electrogénico Na^+/HCO_3^- , el cual también participa en la hiperpolarización de la membrana del espermatozoide de ratón al incrementarse el HCO_3^- externo (Demarco *et al.*, 2003). Recientemente se ha reportado que la reducción de la permeabilidad a Na^+ por ENaC es esencial para la hiperpolarización asociada a capacitación (Hernández-González *et al.*, 2007). Debido a que la capacitación prepara al espermatozoide para la RA, se piensa que la hiperpolarización que ocurre durante la capacitación debido a la contribución de canales de K^+ (Arnoult *et al.*, 1999; Muñoz-Garay *et al.*, 2001), podría remover la inactivación de los canales de Ca^{2+} tipo-T (canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, VDCC), favoreciendo su transición al estado cerrado, lo que permitiría que los canales de Ca^{2+} respondieran a la depolarización inducida por el agonista fisiológico (p.ej. ZP) durante la RA (Santi *et al.*, 1996; Florman *et al.*, 1998; Arnoult *et al.*, 1999). De manera interesante, se han identificado a varios miembros de la familia de canales VDCC tanto en células espermatogénicas (Serrano *et al.*, 1999) como en espermatozoides maduros (Serrano *et al.*, 1999; Treviño *et al.*, 2004; Wennemuth *et al.*, 2000), lo que apoya la hipótesis anterior. Sin embargo, este modelo ha sido cuestionado recientemente, debido a que la identificación y caracterización electrofisiológica de los canales VDCC se hizo en células espermatogénicas (Espinosa *et al.*, 1999; Celia *et al.*, 1996; Liévano *et al.*, 1996)

pero en espermatozoides maduros no se han logrado registrar corrientes provenientes de estos canales (Ren, 2011; Ren y Xia, 2010; Xia y Ren, 2009). En la actualidad, el papel de los canales VDCC en la fisiología del espermatozoide se encuentra en debate. Por otra lado, la hiperpolarización del E_m de la membrana plasmática desempeña un papel importante en la hiperactivación de la movilidad facilitando la entrada de Ca^{2+} vía CatSper, específico del espermatozoide durante la alcalinización citosólica, debido a un incremento de la fuerza impulsora en Ca^{2+} (Navarro *et al.*, 2007). Lo anterior a causa de que CatSper es el único canal ligeramente dependiente de voltaje, que presenta una conductancia significativa durante la hiperpolarización asociada a capacitación (Kirichok *et al.*, 2006).

Es importante mencionar que los eventos ocurridos durante la capacitación son indispensables para la inducción de la hiperactivación y RA (Visconti *et al.*, 2002). Además, es posible inducir la capacitación en los espermatozoides al incubarlos en un medio que contenga Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- y BSA. Los requerimientos y el tiempo necesarios para inducir la capacitación *in vitro* varían considerablemente entre las especies (Yanagimachi, 1994; Visconti *et al.*, 1995a, b). Sin embargo, hasta ahora aún se desconocen muchos de los mecanismos moleculares involucrados en la capacitación (Baldi *et al.*, 1996; Visconti y Kopf, 1998; Wassarman *et al.*, 2001).

Por otro lado, se sabe que la presencia de Cl^- externo (Cl^-_e), es uno de los factores determinantes para la regulación de la hiperpolarización del E_m asociado a capacitación, incremento en la fosforilación de tirosinas, aumento en la concentración de Cl^- intracelular ($[Cl^-_i]$), hiperactivación, RA inducida por ZP y fecundación (Chen *et al.*, 2004; Hernández-González *et al.*, 2007; Wertheimer *et al.*, 2008). Esta información en conjunto, nos indica que el Cl^- tiene un papel esencial en la regulación de dichos procesos (Wertheimer *et al.*, 2008). De manera interesante, el Cl^- es el principal anión en el medio capacitante para la

fecundación, *in vitro* (Wertheimer *et al.*, 2008). La sustitución de Cl^- con aniones no permeables inhibe la hiperpolarización asociada a capacitación y el incremento en la fosforilación en tirosinas (Hernández-González *et al.*, 2007; Wertheimer *et al.*, 2008). Sin embargo, se sabía muy poco acerca del papel que esté desempeña en la maduración del espermatozoide así como del mecanismo mediante el cual el Cl^- y otros aniones están involucrados en la regulación del E_m . Por otro lado, se ha estimado que el E_m en espermatozoides no capacitados es alrededor de -31 mV y -24.5 mV para capacitados, valores cercanos al E_m de reposo de los espermatozoides -35 mV; mientras que en espermatozoides capacitados el E_m de reposo se hiperpolariza alcanzando los -60 mV, y el E_{Cl^-} es \sim -25 mV (Hernández-González *et al.*, 2007).

Fue hasta fechas recientes que se obtuvieron evidencias inmunohistoquímicas de la expresión a nivel de proteína de un canal selectivo a Cl^- , el CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane regulator*), en espermatozoides de ratón (Hernández-González *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007), humano (Hernández-González *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010) y cobayo (Chen *et al.*, 2009), tanto en la región ecuatorial de la cabeza como en la pieza media del flagelo. Reportes anteriores han demostrado que CFTR se expresa funcionalmente en vías respiratorias, aparato digestivo y tracto reproductor (Poulsen *et al.*, 1994; (Quinton, 1999). Se sabe que este canal es un regulador global del transporte de electrolitos y juega un papel crucial en el transporte de Cl^- (Chen *et al.*, 2012) y HCO_3^- en el epitelio de diversos tejidos (Guggino y Stanton, 2006). Por otra parte, es importante resaltar que el CFTR funciona en paralelo y modula a distintos transportadores de Cl^- incrementando su actividad (Guggino y Stanton, 2006; Kunzelmann, 2003) y también actúa sobre ENaC (Hernández-González *et al.*, 2006). En diversos tipos celulares ENaC se cierra ya sea por un incremento en la $[\text{Cl}^-]_i$ (M J Stutts *et al.*, 1995) o bien, a través de la

interacción con el CFTR (Guggino y Stanton, 2006; Kunzelmann, 2003; Escoffier *et al.*, 2012). De manera interesante, en los espermatozoides de ratón podría ocurrir algo similar ya que el CFTR colocaliza con el ENaC (Hernández-González *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). Trabajos recientes indican que el CFTR podría contribuir en la capacitación, hiperactivación, RA y fecundación. Este planteamiento se apoya en parte, en el trabajo de Hernández-González y colaboradores (2007), que demuestran la participación del CFTR en la capacitación del espermatozoide de ratón mediante la regulación de la actividad del ENaC. Otra evidencia más que apoya esta hipótesis es la interacción funcional entre el CFTR y el SLC26A3 (intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$; 2:1) (Ohana *et al.*, 2009), durante la capacitación de los espermatozoides de cobayo donde la remoción de Cl^- , aún en presencia de HCO_3^- (y viceversa), borra la capacitación y la inhibición de SLC26A3 la reduce Chen *et al.*, 2009). Es importante mencionar, que el CFTR y el SLC26A3 forman parte de un complejo, y como se ha reportado (Shcheynikov *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2004; Gray, 2004; Gray, 2004; Chávez *et al.*, 2012), la actividad de cada transportador afecta la actividad de los demás. Por lo tanto, es probable que el CFTR regule la actividad de SLC26A3 y viceversa. En este sentido, recientemente se ha documentado que existe una interacción física entre SLC26A3, SLC26A6 (intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$; 1:2) (Shcheynikov *et al.*, 2006), NHERF-1 (Na^+/H^+ exchanger regulatory factor 1, por sus siglas en inglés) y el CFTR en espermatozoides de ratón, lo que nos sugiere que los mecanismos de regulación descritos en otros tipos celulares se conservan en los espermatozoides.

Además de evidenciar la contribución de estos intercambiadores aniónicos y el CFTR en diferentes eventos relacionados a la capacitación. Hasta el momento, existe controversia acerca de la regulación del CFTR con los transportadores de la familia SLC26. Por otro lado, el ratón nulo en SLC26A3 presenta diarrea congénita de Cl^- (CCD

por sus siglas en inglés; desorden genético generado por una mutación autosómica recesiva que genera diarrea secretoria persistente) y es subfertil, debido a una disminución en el número de espermatozoides y falta de maduración por la presencia del espermatocele (quiste situado en la cabeza del epidídimo que generalmente contiene células espermáticas muertas) (Hihkala *et al.*, 2006). También, se han documentado otros intercambiadores de distintas familias como por ejemplo SLC4A2/AE2 (intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) independiente de Na^+ , el cual se localiza tanto en testículo como epidídimo y en el ratón nulo para dicho intercambiador se presenta infertilidad por displasia testicular (Medina *et al.*, 2003). Por otro lado, hace poco se publicó que el ratón nulo para SLC26A8 es infértil, debido a que dicho intercambiador se localiza en el anillo de Jensen, conocido también como *annulus* (región que separa la pieza media de la pieza principal del flagelo del espermatozoide ver **figura 1.2.2.1**), lo que genera espermatozoides con baja movilidad debido a que la región del *annulus* es frágil y delgada. Por otro lado, Xu y colaboradores (2007), han evidenciado con espermatozoides de ratones con fibrosis quística (FQ, enfermedad genética autosómica recesiva asociada a mutaciones en CFTR) ($\text{CFTR}^{\text{tm}1\text{Unc}}$), que la ausencia del CFTR genera un decremento en el porcentaje de espermatozoides capacitados así como una reducción de la fecundación comparados con los espermatozoides de ratones silvestres. Por lo tanto, debido a que el CFTR es uno de los principales mecanismos de transporte de Cl^- en estas células, una posibilidad podría ser que este canal transporte Cl^- y quizá bicarbonato, tanto en la regulación del E_m como en la hiperpolarización asociada a capacitación. En el presente trabajo, nos enfocamos en el estudio del CFTR debido a su relevancia en la fecundación.

Otras de las entidades moleculares descritas en el espermatozoide para el transporte de Cl^- son los canales de Cl^- regulados por Ca^{2+} (CaCCs). Como su nombre lo

indica, la corriente de Cl^- se activa por el incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), debido a su liberación por pozas intracelulares o bien por la entrada de Ca^{2+} mediante canales iónicos situados en la membrana plasmática. Hasta hace poco, se desconocía la identidad molecular de algunos de estos tipos de canales de Cl^- . Experimentos en espermatozoides epididimales indican la actividad de canales aniónicos con propiedades biofísicas y sensibilidad al ácido niflúmico (NA, por sus siglas en inglés), similares a lo reportado para los CaCCs (Hogg *et al.*, 1994). Recientemente, Orta y colaboradores (2012) han reportado la presencia de CaCCs, posiblemente TMEM16A en espermatozoides de humano. De manera interesante, la inhibición de dichos canales por TMEM16A_{inh} (el inhibidor más específico para este canal, hasta ahora), borra la RA inducida por ZP. Más aún, se sabe que el NA inhibe de manera parcial, la hiperpolarización inducida por Ca^{2+} estimulada por Cl^- (Espinosa *et al.*, 1998). Además, el NA inhibe RA inducida por ZP solubilizada, progesterona y GABA en el espermatozoide de ratón (Espinosa *et al.*, 1998). Nuestro grupo ha descrito que algunos bloqueadores de canales aniónicos como el NA, DIDS (4,4'diisothio-cyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid), entre otros pueden inhibir la RA en espermatozoides de ratón y humano (Espinosa y Darszon, 1995; Espinosa *et al.*, 1998; Santi *et al.*, 2013; Orta *et al.*, 2012). Se sabe que la gran variación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que ocurre durante la RA resulta en alteraciones morfológicas significativas de la cabeza de los espermatozoides que involucra el hinchamiento del acrosoma y el mecanismo de regulación de la disminución del volumen (RVD, por sus siglas en inglés), donde participan los CaCCs entre otros. En este sentido, la inhibición de los CaCCs por NA, DIDS y TMEM16A_{inh} alteran la RVD, la cual podría contribuir regulando la distancia entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, un factor crítico para la exocitosis del acrosoma (revisado en Santi *et al.*, 2013).

Estudios previos han demostrado la presencia funcional de un canal de Cl^- /receptor de GABA_A y un canal de Cl^- /receptor de glicina, respectivamente. El primero, se localiza en la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide de humano y en la superficie ventral del acrosoma en espermatozoides de rata (Erdő y Wekerle, 1990; Rabow *et al.*, 1995; Wistrom y Meizel, 1993; Hu *et al.*, 2002) mientras que el segundo se encuentra presente en la región periacrosomal de espermatozoides de cerdo, humano (Melendrez y Meizel, 1995) y ratón (Sato y Meizel, 2000). De manera interesante, existen altos niveles de GABA en la mucosa del oviducto, incluso mayores a los reportados en cerebro (1-10 mM) (Young y Chu, 1990) (hasta 10 veces más) (Murashima y Kato, 1986). En este sentido, se ha propuesto que el TRF cuenta con los elementos necesarios para generar un ambiente fisiológico para que un sistema GABAérgico module la función de los espermatozoides (Wassarman, 2005). De manera similar, la glicina también está presente en el TRF. Sin embargo, hasta el momento se desconoce la concentración exacta de este aminoácido en las distintas regiones del tracto. Un reporte del grupo de Iritani y colaboradores (1974), indica que la concentración de glicina en el fluido oviductual de porcino es de 380 μM , sin embargo la concentración de glicina en el sitio de fecundación, el ámpula, no está reportada. La ZP (Kirkman-Brown *et al.*, 2002; Wassarman, 2005) y progesterona (Harper *et al.*, 2004; Kirkman-Brown *et al.*, 2002) estimulan la RA individualmente y son los inductores más estudiados hasta el momento. Sin embargo, GABA y glicina también pueden inducir la RA en el espermatozoide de humano, ratón y cerdo, y esta reacción se puede inhibir con antagonistas de canales de Cl^- tales como el NA (Meizel, 1997). Se sabe que ambos agonistas aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, aunque las vías de señalización por las cuales se inicia la RA aún se están estudiando. Por otro lado, se sabe que la concentración intracelular de Cl^- es lo suficientemente alta como para inducir una

depolarización de la membrana plasmática del espermatozoide cuando estos canales aniónicos se abren, y de esta manera, inducen la RA (revisado en Darszon *et al.*, 2011).

El resultado de investigaciones previas han demostrado que la RA inducida por ZP es sensible a antagonistas del receptor de glicina (Melendrez y Meizel, 1995; Melendrez y Meizel, 1996; Llanos *et al.*, 2001). Más aún, ratones que poseen el receptor de glicina mutado son incapaces de llevar a cabo la RA inducida por ZP (Sato *et al.*, 2000). Por otra parte, recientemente se ha descrito a un cotransportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (NKCC) en los espermatozoides de ratón, el cual participa en algunos de los eventos importantes de la fecundación, debido a que su inhibición disminuye la RA y suprime la fosforilación en tirosinas (Wertheimer *et al.*, 2008). Además, cabe mencionar que el ratón nulo para NKCC1 es infértil, al parecer por falta de maduración en los espermatozoides (Pace *et al.*, 2000).

Otros de los eventos importantes que ocurren durante la capacitación son los cambios en la distribución y composición de lípidos en la membrana plasmática. Estas modificaciones generan un incremento en la fluidez de la membrana (Yanagimachi, 1994a). Entre dichos cambios encontramos la extracción del colesterol de la membrana, lo cual disminuye la razón molar de colesterol:fosfolípidos (Go y Wolf, 1983 y 1985; Langlais y Roberts, 1985; Ehrenwald *et al.*, 1988) y (Ehrenwald *et al.*, 1990; Hoshi *et al.*, 1990). Se ha propuesto, que la albúmina sérica de bovino (BSA, por sus siglas en inglés), podría ser la responsable de la remoción del colesterol (Tanphaichitr *et al.*, 1996); La BSA así como otros componentes, se encuentra en el fluido folicular, y contribuye en parte, a la maduración del espermatozoide para la fecundación del ovocito.

Se ha sugerido, que la remoción de colesterol de la membrana plasmática favorece la permeabilidad al Ca^{2+} y al HCO_3^- , dos compuestos esenciales para la capacitación (Shi y Roldan, 1995; Visconti *et al.*, 1995; Visconti y Kopf, 1998) y que la extracción del colesterol por BSA posiblemente involucra la regulación del transporte de HCO_3^- , mediado por un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ , donde el transporte de HCO_3^- a través de la membrana está asociado con la hiperpolarización del E_m , incremento en el pH_i y regulación del metabolismo de AMPc durante la capacitación en el espermatozoide de ratón (Parrish *et al.*, 1989; Zeng *et al.*, 1996; Demarco *et al.*, 2003). Así mismo, el cierre de ENaC durante la capacitación es responsable, en parte, de esta hiperpolarización asociada a la capacitación (Hernández-González *et al.*, 2007). Además, se ha documentado a un cotransportador electrogénico $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ y un exportador de protones sensible a ácido flufenámico, los cuales también participan en la hiperpolarización de la membrana del espermatozoide de ratón al incrementarse el HCO_3^- interno (Demarco *et al.*, 2003). Así mismo, dicha hiperpolarización asociada a la capacitación podría ser un requisito para activar al intercambiador Na^+/H^+ (sNHE) específico del espermatozoide. La activación del sNHE regula el pH_i de espermatozoides de varias especies (García y Meizel, 1999; Woo *et al.*, 2002; Schackmanns y Chock, 1986), lo cual podría activar a CatSper (Visconti *et al.*, 2011). Dicha hiperpolarización podría incrementar la fuerza impulsora favoreciendo la entrada de Ca^{2+} mediante canales catiónicos no selectivos como los TRP y/o CatSper, algunos de estos son activados por alcalinización. Sin embargo, hasta el momento se desconoce cómo se genera y regula la hiperpolarización asociada a capacitación.

El Ca^{2+} es un segundo mensajero de gran importancia en la señalización celular y lo que ocurre en el espermatozoide no es una excepción, ya que el Ca^{2+} regula distintos procesos fundamentales en la fisiología del espermatozoide. En general, el citoplasma de

las células en reposo contienen ~100 nM de Ca^{2+} libre, mientras que del lado extracelular hay ~1 mM de Ca^{2+} . Esta gran diferencia de concentración se utiliza como fuerza motriz para eventos de señalización.

Al igual que en otras células, en los espermatozoides de diversas especies de mamíferos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está regulada por la participación de los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, ATPasas de Ca^{2+} , canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) y, probablemente, por pozas de Ca^{2+} intracelulares (Fraser, 1995; Baldi *et al.*, 2000; Baldi *et al.*, 2000; Darszon *et al.*, 2001). Son varias las evidencias que sugieren la presencia de estos mecanismos de regulación del Ca^{2+} interno en el espermatozoide (Blackmore, 1993; Walensky y Snyder, 1995; Dragileva *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000; revisado en Darszon *et al.*, 2011). Sin embargo, la participación de algunos de los diferentes mecanismos mencionados anteriormente es motivo de debate.

1.3 La Regulación de la movilidad

Como mencionamos con anterioridad, los espermatozoides de mamífero están desprovistos de la capacidad de nadar cuando están en el testículo, estos se mantienen en estado inmóvil principalmente por una alta concentración de K^+ extracelular ($[\text{K}^+]_e$) (Darszon *et al.*, 2005). La propiedad de nado la adquieren durante un proceso de maduración en el epidídimo y el movimiento inicia al momento de la eyaculación. Posteriormente, en el TRF, el espermatozoide presenta dos tipos de movilidad: activada e hiperactivada (**Fig.1.3**). Ambos tipos de movilidad son necesarios para el nado progresivo del espermatozoide en distintas regiones del TRF (Suarez, 2008b; Suarez *et al.*, 1991).

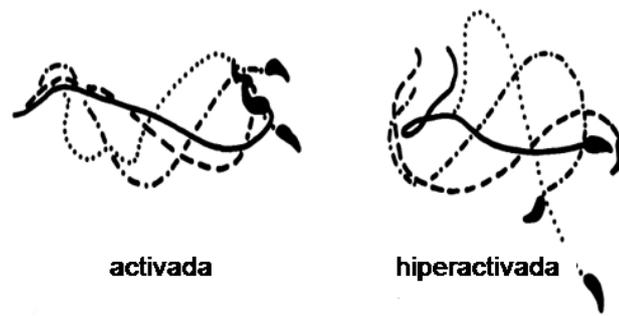


Figura 5: Patrones de movilidad activada e hiperactivada en espermatozoides de ratón.

La movilidad activada del espermatozoide se caracteriza por el batido flagelar simétrico y de amplitud corta en contraste con la movilidad hiperactivada, donde el batido es asimétrico y de amplitud grande en solución de baja viscosidad (Suarez, 2008a).

La movilidad activada se caracteriza por un batido flagelar simétrico y de amplitud corta (Darszon *et al.*, 2005; Suarez, 1996; Turner, 2006) (**Fig.1.3**). Al entrar al TRF, este tipo de movilidad impulsa a los espermatozoides con un nado progresivo (Turner, 2006). Por otro lado, se encuentra la movilidad hiperactivada, la cual se caracteriza por un movimiento no lineal y vigoroso, generando un incremento en la amplitud del batido flagelar (movimiento de latigazo; revisado en Yanagimachi, 1994) (**Fig.1.3**). Este tipo de movilidad se ha observado en los espermatozoides recuperados del oviducto, sitio donde ocurre la fecundación (**Fig. 1.3**), por lo que es considerada vital para que el espermatozoide penetre la zona pelúcida del ovocito (Yanagimachi, 1969; Stutts *et al.*, 1995; Bedford, 1998; Suarez y Dai, 1992). Más aún, la hiperactivación puede tener otras funciones, como por ejemplo, se sabe que este tipo de movilidad mejora el movimiento de los espermatozoides a través del mucus del oviducto, ya que los ratones nulos en CatSper, canal necesario para la movilidad hiperactivada en el espermatozoide, son incapaces de migrar para ascender por esta región (Ho *et al.*, 2009). También, se ha observado que los espermatozoides se adhieren por la cabeza al epitelio oviductual; sin

embargo, los espermatozoides hiperactivados son capaces de liberarse de esa zona (Ho *et al.*, 2009) y continuar con su trayectoria.

Como ya se mencionó, en general, durante el tránsito del espermatozoide por el TRF la extracción del colesterol de la membrana plasmática por moléculas aceptoras, como la albúmina, da inicio a una reorganización de la membrana celular que culmina en la redistribución de distintos componentes membranales y en la capacitación de los gametos masculinos (Baldi *et al.*, 2000). Se ha sugerido que la extracción del colesterol favorece un incremento en la fluidez de la membrana celular, lo que favorece la permeabilidad al Ca^{2+} y al HCO_3^- , dos elementos esenciales para la capacitación (Shi y Roldan, 1995; Visconti *et al.*, 1995; Visconti y Kopf, 1998). Existen evidencias experimentales que sugieren la participación de la albúmina como aceptor de colesterol durante la capacitación (Visconti *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la preincubación de los espermatozoides de ratón con albúmina sérica de bovino (BSA, por sus siglas en inglés) y sulfato de colesterol en una relación 1:1 inhibe la fosforilación de proteínas y la capacitación *in vitro*. Por otro lado, el uso de heptasacáridos (moléculas que unen colesterol tales como ciclodextrinas) *in vitro* promueve la liberación de colesterol de la membrana celular del espermatozoide de ratón en ausencia de BSA, e induce un incremento en la fosforilación de tirosinas y la capacitación. Más aún, sabemos que durante la capacitación disminuye el cociente de colesterol:fosfolípidos en la membrana del espermatozoide (revisado en Baldi *et al.*, 2000). Todos estos datos en conjunto, sugieren que la liberación del colesterol de la membrana del espermatozoide es, al menos, una de las señales iniciales que activan los mecanismos de transducción de señales involucrados en la capacitación. La remoción del colesterol podría modificar a las plataformas fluidas de señalización o microdominios de membrana denominadas *rafts*.

Hasta ahora, se han descrito dos tipos de *rafts* en el espermatozoide, uno asociado a caveolina-1 y el segundo asociado al gangleósido GMI (Travis *et al.*, 2001; Treviño *et al.*, 2001; Selvaraj *et al.*, 2010). De manera interesante, caveolina-1 se ha identificado en la cabeza y el flagelo de los espermatozoides de ratón y cobayo (Travis *et al.*, 2001). Desde entonces, se considera su participación en la regulación de la movilidad de los espermatozoides (Zhu e Inaba, 2011), la capacitación (Cross, 2004; Sleight *et al.*, 2005) y la interacción espermatozoide-zona pelúcida del óvulo (Miranda *et al.*, 2009). Recientemente, se ha demostrado una redistribución de los *rafts* que contienen GMI en espermatozoides expuestos a condiciones que mimetizan la capacitación (Boerke *et al.*, 2014). Más aún, después de la RA se redistribuyen los *rafts* que contienen GMI (Treviño *et al.*, 2001). Además, Cross y colaboradores (2004) reportaron la presencia de *rafts* de composición heterogénea en los espermatozoides de humano, donde GMI y CD59, dos de los componentes de estos dominios, presentan una redistribución hacia regiones donde no hay microdominios lipídicos, este evento, es dependiente de la pérdida parcial de esteroides durante la capacitación.

1.4 La Reacción Acrosomal

Inmediatamente después de la unión del espermatozoide a la ZP, el espermatozoide inicia un proceso de exocitosis dependiente de Ca^{2+} , denominado RA, el cuál es un evento único. En este proceso hay múltiples puntos de fusión entre la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del espermatozoide. El resultado de dicho proceso es la liberación del contenido acrosomal y la formación de vesículas híbridas formadas de la fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. La RA cumple con varias funciones para la fecundación entre ellas, la de facilitar la

penetración del espermatozoide a través de la ZP y la de exponer la membrana interna del acrosoma, que posee sitios de reconocimiento para la fusión espermatozoide-óvulo (Harper *et al.*, 2008). En este sentido, Tanihara y colaboradores (2014) demostraron que la RA inducida por ZP, genera la exposición funcional IZUMO, factor que interviene en la fusión del espermatozoide-ovocito. Más aún, se ha propuesto que la localización de otro elemento crítico en la fusión espermatozoide-óvulo, ADAM15, se modifica durante la RA, redistribuyéndose de la región acrosomal hacia toda la cabeza y al flagelo de los espermatozoides (Pastén-Hidalgo *et al.*, 2008). Por estas razones, en los mamíferos la RA es un evento único e indispensable para la fecundación.

1.5 Fecundación en mamíferos

Entre los mamíferos, el proceso de unión de las células germinales incluye algunos pasos ordenados. Esto se da en el oviducto (**Fig. 1.2.3**) con la unión del espermatozoide a la cubierta externa de óvulo, ZP y finalmente poco tiempo después con la fusión de las membranas plasmáticas del óvulo y el espermatozoide, con la consecuente depolarización del potencial de membrana del óvulo. Este proceso forma una sola célula “activada”, el cigoto. A lo largo del camino, diversos eventos toman lugar, el espermatozoide desarrolla una exocitosis de la vesícula acrosomal, RA y penetra a la ZP. Al ocurrir la fusión con el óvulo, este se activa y se dispara la reacción cortical del óvulo, la cual consiste en la liberación de los gránulos corticales por exocitosis modificando de alguna manera la envoltura del huevo durante la fecundación (Wassarman, 1999).

1.5.1 Aspectos específicos de la fecundación en mamíferos

En esencia, cuando el óvulo y el espermatozoide se encuentran en el tracto genital femenino ocurre un reconocimiento entre ambos gametos y su ambiente. Este evento se puede dividir en varios procesos particulares con relación al espermatozoide, éstos son: 1) Activación de la movilidad; 2) Quimiotaxis (en algunas especies); 3) Hiperactivación (en mamíferos); 4) Unión a la capa externa del óvulo; 5) RA; 6) Penetración a la capa externa del óvulo y 7) Adhesión y fusión de las membranas plasmáticas entre el espermatozoide y el óvulo (Wassarman *et al.*, 2001; Sutovsky, 2009). Posteriormente ocurre la activación del óvulo (que incluye la reacción cortical, es decir, la exocitosis de los gránulos corticales) y la fusión de los pronúcleos.

1.5 Canales de Cl⁻

Los canales de Cl⁻ participan en diversos procesos fisiológicos clave en los distintos tipos celulares, entre los que se encuentran la regulación del volumen celular, transporte del fluido transepitelial así como la neuroexcitación y la contracción muscular. Así mismo, los canales de Cl⁻ proveen la vía principal para el transporte de Cl⁻ transmembranal en estos procesos. Por otro lado, en contraste con los canales catiónicos, los cuales a menudo tienen una alta selectividad para un ión en específico, los canales de Cl⁻ también son permeables a otros aniones que incluyen a los haluros (Cianuro, cianato, tiocianato, entre otros), los pseudohaluros (tiocianato, entre otros) y HCO₃⁻ (Verkman y Galiotta, 2009). En general, los canales de Cl⁻ se han clasificado en cinco grupos con base en su regulación: (1) activados por fosforilación (p.ej. CFTR, cuya activación es dependiente de AMPc y asociación de dos moléculas ATP en los NBD); (2) activados por Ca²⁺ (CaCCs), se sabe que algunos de ellos activan por el incremento en la [Ca²⁺]_i proveniente de pozas intracelulares o por la entrada de

Ca²⁺ vía canales iónicos situados en la membrana plasmática; (3) regulados por voltaje (CIC), (p.ej. CIC-0 y CIC-1 son activados por depolarización del E_m e incremento en la [Cl⁻]_e); (4) regulados por ligandos (p. ej. Los canales de Cl⁻ activados por GABA y glicina, respectivamente) y (5) regulados por volumen (Verkman y Galiotta, 2009).

1.5.1 Canal de Cl⁻ CFTR

Estructura y regulación de la actividad del canal

El CFTR funciona como un canal iónico selectivo a Cl⁻ (Anderson *et al.*, 1991; Bear *et al.*, 1992; Tabcharani *et al.*, 1993), es miembro de la familia de transportadores con dominio de unión a ATP (transportadores ABC de “ATP-Binding Cassette”) (Riordan *et al.*, 1989) y presenta una organización compleja (**Fig. 1.6.1**). Tiene dos regiones o dominios transmembranales (TMD de “Transmembrane domain”, TMD1 y TMD2), cada uno con 6 segmentos transmembranales (TMS1-6, TMS7-12, respectivamente), dos dominios de unión a nucleótidos cíclicos (NBD de “Nucleotide Binding Domain”), NBD1 y NBD2 (Holland y Blight, 1999; Higgins y Linton, 2004), así como un dominio regulatorio citoplásmico (R) (**Fig. 1.6.1**), único en los miembros de la familia ABC. Los TMS, TMS6 principalmente, así como TMS11 y TMS12 contribuyen a la formación del poro del canal (Gong y Linsdell, 2003; McCarty, 2000; Zhang *et al.*, 2000) mientras que los NBD y el dominio R controlan la actividad del canal (Gadsby y Nairn, 1999). Por otro lado, la presencia del dominio R con múltiples sitios potenciales de fosforilación por PKA principalmente, dependientes de AMPc, así como proteínas cinasas del tipo C (PKC) (Riordan *et al.*, 1989) (Baukrowitz *et al.*, 1994; Hwang *et al.*, 1994) nos sugiere cierto control en la actividad del canal, por la fosforilación. Hasta ahora, la mayoría de los sitios identificados para fosforilación por PKA están incluidos en el dominio R (Gadsby y Nairn,

1999). Comúnmente, la fosforilación por PKA (y PKC, la cual es mucho menos efectiva en activar al canal comparada con PKA; <10%) es obligatoria tanto para el mecanismo de apertura del canal como para la asociación del ATP. De manera consistente, se ha observado que durante la fosforilación del dominio R por PKA ocurren cambios en la conformación tanto en el dominio R dominio como en la proteína completa (Grimard *et al.*, 2004).

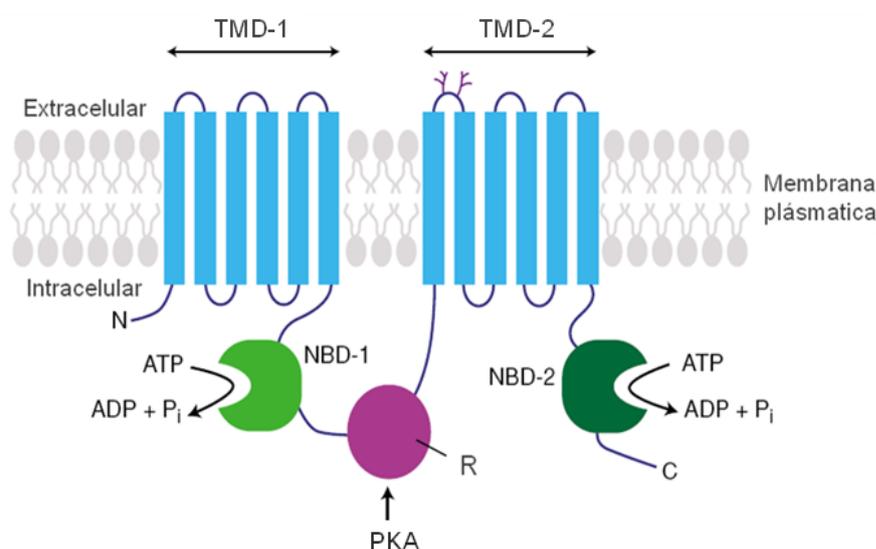


Figura 6: Modelo de la estructura propuesta para el regulador de la conductancia transmembranal de fibrosis quística (CFTR).

Esta proteína compleja está constituida por dos regiones homólogas (TMD-1 y TMD-2), las cuales contienen seis segmentos transmembranales y un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (NBD-1 y NBD-2) respectivamente, separadas por el dominio regulador (R). Los dominios TMD-1 y TMD-2 forman el poro del canal. La fosforilación del dominio R por cinasas (PK) principalmente dependientes de AMPc, tales como PKA tiene un efecto estimulador, y facilita la interacción entre los NBDs y adenosina de trifosfato (ATP). Esta fosforilación es un requisito para la apertura del canal, ya que si el dominio R no está fosforilado, el canal permanecerá cerrado; la fosforilación de dicho dominio puede revertirse por medio de fosfatasa intracelulares. Además, la apertura del canal también requiere de la hidrólisis de ATP por los NBDs, previa fosforilación del dominio R (Modificado de Davidson Dorin, 2001).

Otros de los mecanismos de regulación del CFTR incluyen, Cl⁻, E_m así como interacciones proteína-proteína (Schwiebert *et al.*, 1998; Boucher, 2004; Riordan, 2005).

Por otra parte, ya se ha reportado la secuencia de permeabilidad aniónica para el CFTR

tanto en células nativas como en expresión heteróloga ($\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{HCO}_3^-$) (Anderson *et al.*, 1991). Además, se ha reportado que el CFTR también puede conducir HCO_3^- (Park *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2009). En este sentido, existe controversia en cuanto a la razón de permeabilidad $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de CFTR y de cómo se regula tanto por Cl^- externo (Park *et al.*, 2010; Lee y Muallem, 2009), como por el juego de intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ y Cl^-/OH^- presentes en el tejido en cuestión (Ignáth *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010)

1.5.2 Interacción física y funcional entre CFTR y otras proteínas de transporte

La fosforilación del dominio R de CFTR podría influenciar la interacción del canal con otras proteínas. En este sentido, se sabe que en células como las del riñón, pulmón, intestino, páncreas, epidídimo y en espermatozoides de ratón hay una interacción directa entre CFTR con algunos intercambiadores de la familia SLC26 (Solute Carriers family 26, por sus siglas en inglés), teniendo como resultado el incremento en la $[\text{Cl}^-]_i$ y además, en el caso del espermatozoide la hiperpolarización de la membrana plasmática está asociada a la capacitación (Chávez *et al.*, 2011). Los dos miembros de la familia SLC26 con los que CFTR interacciona de manera específica son: el SLC26A3 y SLC26A6 (Hayashi *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2008; Shcheynikov *et al.*, 2006; Hihnala *et al.*, 2006; Chávez *et al.*, 2012). La interacción entre CFTR-SLC26 está mediada por el dominio R del canal y el dominio STAS (Sulfate Transporter and Anti-Sigma) de los SLC26, los cuales deben de ser fosforilados (por PKA) para favorecer la interacción (Ko *et al.*, 2004; Gray, 2004). Además, existen otros módulos en el CFTR y en algunos miembros de la familia SLC26, que median la unión a proteínas de andamiaje, los dominios de unión a PDZ (PSD95, Dlg y ZO-1; módulos que median la interacción proteína-proteína mediante la asociación con una secuencia peptídica

corta, localizada generalmente, en la región carboxilo terminal de la proteína blanco. Estos dominios confieren fidelidad y eficiencia a la transducción de señal que regula los distintos mecanismos de transporte) (Guggino y Stanton, 2006), los cuales también favorecen la interacción entre CFTR-SLC26 (Voltz *et al.*, 2007; Lamprecht y Seidler, 2006). Cabe mencionar que las interacciones entre CFTR y las proteínas con dominios PDZ son altamente dinámicas (ocurren en segundos o milisegundos). De manera interesante, las proteínas poseedoras de dominios PDZ representan una familia de proteínas adaptadoras multifuncionales, las cuales están potencialmente involucradas en muchos aspectos de la señalización intracelular (Vega-briceño, 2010). Los dominios PDZ se asocian con frecuencia a otras proteínas que interactúan con módulos (como p.ej. ezrin, radixin, moesin), lo que podría promover interacciones proteína-proteína homo-típicas y hetero-típicas. Así mismo, moléculas de señalización como adenilato ciclasas, fosfatasas y fosfodiesterasas específicas de AMPc, también son reclutadas por algunos de los complejos de señalización formados por proteínas con dominios de unión a PDZ. De esta manera, los complejos de señalización confieren especificidad espacial y temporal a los efectos biológicos mediados a través de la vía AMPc/PKA.

Por otra parte, la interacción al menos indirecta, entre CFTR y ENaC es mediada vía NHERF-1, el cual podría facilitar la regulación recíproca entre ambos canales (Guggino y Stanton, 2006). Como se mencionó anteriormente, el CFTR regula negativamente a ENaC (excepto en el ducto sudoríparo donde CFTR activa a ENaC), mientras que ENaC activa a CFTR. La interacción entre ambos canales es de relevancia biológica debido a que el balance entre el transporte de Cl⁻ vía CFTR y la toma de Na⁺ mediada por ENaC regula la cantidad de agua y sales en los distintos órganos. Por lo tanto, NHERF-1 podría encargarse del ensamblaje de CFTR y ENaC en un macro-complejo de señalización que además, incluya a

otros componentes (p. ej. YAP65 y cinasa Src-c), los cuales podrían mediar la inhibición de ENaC por CFTR. De manera interesante, CFTR también regula a otros mecanismos de transporte, que incluyen canales de K^+ , mecanismos de liberación de ATP, intercambiadores aniónicos, transportadores Na^+/HCO_3^- así como canales de agua (acuaporinas) (Ko *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2000; Jiang, 2000; Stutts *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 2003; Shumaker *et al.*, 1999; Schwiebert *et al.*, 1995; Yoo *et al.*, 2004). Hasta el momento, poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares mediante los cuales el CFTR regula a los distintos transportadores, sin embargo, cada vez se aporta más evidencia de que esta regulación podría involucrar un macro-complejo de señalización dinámico modulado a su vez por interruptores moleculares (moléculas que tienen un estado activado e inactivado, regulando o no, respectivamente a otras moléculas y/o vías de señalización cuesta abajo), que incluyen a las proteínas con dominios PDZ, como se ha reportado en diversos tipos celulares

1.5.3 Fibrosis quística

La base genética de la FQ se resolvió en 1989 cuando se clonó el gene de CFTR y a las mutaciones del canal se les asoció con la enfermedad (Riordan *et al.*, 1989). La principal causa de la FQ es la pérdida de la función del canal (Mcintosh y Cuttingt, 1992). En la actualidad, se han identificado más de 1,500 mutaciones (CF Mutation Data Base, www.genet.sickkids.on.ca/), donde $\Delta F508$ -CFTR (delección del exón 10 que resulta en la pérdida de la fenilalanina de la posición 508) es la principal mutación, y se manifiesta en ~ 90% de los pacientes con FQ, en uno o en ambos alelos del gene CFTR y la frecuencia de esta mutación en la población mundial es ~ 66% (Araújo *et al.*, 2005). De manera interesante, el número y la frecuencia de estas mutaciones varían de acuerdo al origen étnico y localización geográfica de la población. En este sentido, la FQ es el padecimiento

autosómico recesivo más común en la población caucásica (Davis *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 2003; Boucher, 2004). Aproximadamente, 1 de cada 25 individuos es portador de un alelo mutado y esto afecta a 1 de cada 2,500 nacimientos vivos (Yang *et al.*, 2009) Por el contrario, la frecuencia de portadores con mutaciones semejantes en poblaciones de hispanos, asiáticos y afroamericanos, es mucho menor. Cabe mencionar, que en México la incidencia de FQ es de 1 de cada 9,000 nacimientos vivos (Orozco *et al.*, 2000). De esta forma, la destrucción progresiva de los pulmones y la enfermedad pancreática agregada a otros síntomas, resultan en una expectativa de vida a los pacientes con FQ de ~37 años (en países desarrollados) (Davidson y Dorin, 2001), mientras que en el nuestro, es tan sólo de ~8 años (Lezana *et al.*, 1994).

1.5.4 Manifestaciones clínicas de la FQ

Las manifestaciones clínicas de la FQ son: (A) incremento de la concentración de cloruro en la secreción de las glándulas sudoríparas, (B) insuficiencia pancreática (IP) (en ~95% de los pacientes), (C) obstrucción intestinal, (D) enfermedad pulmonar severa (Davidson y Dorin, 2001) y (E) reducción severa de la fertilidad masculina (Silber, 1994; Guggino y Stanton, 2006). La FQ destaca de manera notable en los pacientes masculinos, debido a que ~95% de ellos presentan infertilidad por azoospermia (producción insuficiente de espermatozoides) (Wong, 1998; Teixeira *et al.*, 2013), con alteración de las estructuras wolfianas (conductos eyaculatorios, vesículas seminales, vasos deferentes y epidídimos) y atrofia o ausencia bilateral congénita del *vas deferens* (CBAVD, por sus siglas en inglés; túbulo muscular que viaja del epidídimo hacia la cavidad pélvica y transporta a los espermatozoides maduros hacia la uretra), lo que sugiere que los pacientes masculinos con mutaciones en el gene CFTR tienen una forma ante todo genital de FQ (Anguiano *et al.*,

1992). Considerando que la frecuencia de heterocigocidad de CFTR es dos veces mayor en hombres infértiles con respecto a la población masculina sana en general, las mutaciones en este canal generan infertilidad masculina (Schulz *et al.*, 2006). Por otro lado, los pacientes con FQ que producen espermatozoides podrían tener un defecto específico para penetrar la ZP que recubre al ovocito (Silber, 1994), donde más del 50% de los espermatozoides son dimórficos. Es importante mencionar que el CFTR está involucrado tanto en la espermatogénesis (Trezise *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 2001) como espermiogénesis (Teixeira *et al.*, 2013). Por otro lado, las mujeres con FQ son menos fértiles (3-5%) comparadas con la población femenina sana. En pacientes femeninas con este padecimiento, el retraso de la pubertad y la amenorrea (ausencia de la menstruación por un período de tiempo mayor a los 90 días) son comunes debido a la desnutrición, como la principal causa (Stead *et al.*, 1987). De manera interesante, las mutaciones en CFTR también están asociadas con la ausencia congénita del útero y la vagina (CAUV, por sus siglas en inglés). Hasta el momento, a pesar de conocer el defecto primario de la enfermedad es muy complicado determinar por ahora, los mecanismos a través de los cuales la patología inicia y progresa a partir de la mutación.

1.5.5 Los tipos de mutación del gene de CFTR

Las mutaciones en el gene de CFTR se originan a través de 5 mecanismos diferentes con resultados distintos (Gibson *et al.*, 2003) (**Tabla 1**). De acuerdo a las manifestaciones clínicas las mutaciones pueden ser de dos tipos: a) Mutaciones severas: No hay proteína funcional, hay IP que es IP (en 95% de los pacientes), problemas hepáticos (3-5%) y problemas respiratorios graves (mutación de la clase I, II y III); b) Mutaciones leves: Se producen pequeñas cantidades de proteína funcional, IP (en 85% de los pacientes) y problemas respiratorios no crónicos (mutación de clase IV).

Tabla 1: Mutaciones en el gene del CFTR

Mutación	Tipo de alteración en la proteína	Observaciones
Clase I	La biosíntesis de la proteína está alterada	Estas mutaciones (p.ej. G542X) generan la terminación prematura de la transcripción, alterando la producción de la proteína. Lo que conduce a la formación de proteínas truncadas y no funcionales. Estas mutaciones se dan en el núcleo.
Clase II	La maduración de la proteína se ve afectada	Provoca una alteración en el proceso post-transcripcional de la proteína, con una disminución del tráfico de la proteína madura desde el aparato de Golgi a la superficie celular apical (Loo <i>et al.</i> , 1998). En este tipo de mutación encontramos a $\Delta F508$ -CFTR.
Clase III	La regulación y la apertura del canal están modificadas	Estas mutaciones generan un funcionamiento incorrecto de la proteína ya que no responden a estímulos activadores como el AMPc. Las mutaciones de este tipo se encuentran localizadas en los dominios NBD y el nivel de alteración puede variar desde leve (p. ej. G551S; se sustituye una glicina por una serina en la posición 551 en la proteína) hasta pérdida de la función (p. ej. G551D; se sustituye una glicina por un aspártico en la posición 551 en la proteína) (Carson y Welsh, 1995)
Clase IV	La conductancia del canal está alterada	Estas mutaciones se localizan en regiones del gene que codifican para algunos segmentos transmembranales (p.ej. R117H en la región TM2 así como R347P y R347H en TM6) y para el dominio R de la proteína (Vankeerberghen <i>et al.</i> , 1998). Las corrientes de Cl ⁻ generadas en respuesta a los agonistas están

		reducidas.
Clase V	La estabilidad de la proteína esta alterada.	Esto se debe a la delección de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal lo que reduce el tiempo de vida media de estas proteínas (p.ej. Q1412X), manifestándose un fenotipo severo (Zielenski & Tsui, 1995).

Abreviaciones: AMPc, adenosin monofosfato cíclico; NBD, dominios de unión a nucleótidos cíclicos; TM2 y TM6, segmentos transmembranales 2 y 6, respectivamente.

1.5.6 El modelo humano y de ratón de FQ

Para entender mejor la patogénesis de la FQ se han creado distintos modelos tales como el de ratón, porcino y hurón (Couzin-Frankel, 2009), los cuales han permitido identificar características clínicas nuevas acerca de la enfermedad y también, son un recurso importante para el desarrollo e investigación de nuevas terapias, teniendo como objetivo el incremento en la esperanza de vida así como la mejora en su calidad, entre otros. La comparación entre los distintos modelos animales de FQ podrían permitirnos un mejor entendimiento de la enfermedad.

La investigación indica que el gene de CFTR de humano y de ratón (*Cftr*), son genes homólogos. Ambos genes son muy similares (78% de identidad en la secuencia de amino ácidos) y la mayoría de las mutaciones de la proteína ocurren en regiones conservadas, lo que sugiere que la función de la proteína se conserva entre ambas especies. El gene identificado para ratón posee un residuo de fenilalanina (F), la cual corresponde a la F eliminada en la mutación más común $\Delta F508$ -CFTR del gene, la cual está flanqueada por una región conformada de 28 amino ácidos, idéntica a la proteína CFTR de humano. Si bien, es cierto que el canal CFTR tanto de humano como de ratón tienen muchas

propiedades en común, también es verdad que existen algunas diferencias importantes en la función (p.ej. el *gating* del canal). De esta manera, el grado de similitud de la proteína del CFTR en humano como en ratón, aunado a técnicas moleculares, ha hecho posible el desarrollo de modelos de ratón con FQ. En la actualidad, existen aproximadamente trece modelos de ratón de FQ, cada uno de ellos con diferentes grados de caracterización. Estos modelos se dividen en dos categorías: (1) Los que generan organismos nulos en CFTR y (2) Los que generan mutaciones de interés clínico tales como $\Delta F508$ y G551D. De manera interesante, existen diferencias importantes entre la fisiopatología pulmonar en humanos con FQ y los modelos de ratón de FQ. Una comparación de los fenotipos del modelo de ratón con FQ con respecto al fenotipo humano de FQ se presenta en la **tabla 2**.

Como puede observarse, el estudio del CFTR es de relevancia mundial en distintas áreas de la salud, sin embargo, en el espermatozoide maduro de mamífero permanece poco explorado. Así mismo, no se tiene evidencia detallada de la participación de este y otros canales en la fisiología del espermatozoide.

No obstante, tal y como lo veremos más adelante, el CFTR está presente funcionalmente en los espermatozoides de ratón y muy probablemente juega un papel crucial en la fisiología del espermatozoide, específicamente en la capacitación. Demostrar esto, fue parte de los objetivos del presente trabajo.

Tabla 2: Fenotipo de FQ en humanos y modelos de ratón

Características	Humano	Ratón^a
Supervivencia	Supervivencia reducida	El grado de supervivencia varía dependiendo del bloqueo del intestino que puede ser parcial o total.
Padecimientos intestinales	Síndrome de obstrucción intestinal distal o íleo meconial	Obstrucción intestinal fatal en la mayoría de los nacimientos o al destete. Disminución significativa de la línea base de la DP en el intestino; disminución del transporte de Cl ⁻ mediado por AMPc. Reducción de la respuesta de Cl ⁻ relacionada con Ca ²⁺ .
Padecimientos pancreáticos	Insuficiencia pancreática	No hay manifestación de enfermedad pancreática severa
Anormalidades en tejido reproductivo	Infertilidad masculina	Reducción de la fertilidad en hembras, predominantemente
Enfermedades pulmonares	Acumulación de moco e infección crónica en pulmones; Hiperabsorción de Na ⁺ en epitelio nasal; Reducción de la conductancia de Cl ⁻ estimulada por AMPc en el epitelio nasal Sudor salado	Padecimientos pulmonares únicamente después de exposición crónica a patógenos; hiperabsorción de Na ⁺ en epitelio nasal; Reducción de la conductancia de Cl ⁻ estimulada por AMPc en el epitelio nasal
Otras anormalidades		Disminución del esmalte dental

^a Existe variabilidad entre los modelos de ratón y las características fenotípicas que mencionamos. Además, los diferentes modelos presentan distintos grados de severidad. Abreviaciones: AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; DP diferencia de potencial. (Modificada de Davidson y Dorin, 2001).

2 JUSTIFICACIÓN

1. Sin duda, es fundamental entender los procesos fisiológicos que ocurren en el espermatozoide durante su maduración, los cuales son clave para que ocurra la fecundación e involucra la regulación concertada de su permeabilidad iónica. Debido a que la regulación de la permeabilidad iónica es determinante para el intercambio de información en el espermatozoide, con su entorno y entre los gametos, los canales iónicos son entidades críticas para los procesos en la movilidad, maduración e inducción de la RA del espermatozoide.

2. El grupo del Dr. Darszon y colaboradores propusieron que la presencia de Cl^- externo es importante para que ocurra la hiperpolarización del espermatozoide de ratón durante la capacitación (Hernández-González *et al.*, 2007).

3. El transporte de Cl^- y HCO_3^- mediante CFTR participa en la homeostasis del espermatozoide de mamífero.

4. Treviño y colaboradores (2012), demostraron que la inhibición del CFTR por su bloqueador específico, $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$, inhibe el incremento de la $[\text{Cl}^-]_i$ inducido por la adición de db-AMPC y la hiperpolarización de la membrana asociada a la capacitación. Del mismo modo, la inhibición de CFTR reduce la hiperpolarización inducida por la presencia de HCO_3^- , de manera parcial (Chávez *et al.*, 2012).

5. Treviño colaboradores (2012), proponen que la actividad funcional del CFTR regula el transporte de Cl^- en los espermatozoides de ratón, probablemente a través de la activación de SCL26A3 (Chávez *et al.*, 2012).

6. La inhibición de CFTR impide la capacitación.

7. La regulación de pH_i está relacionada con la homeostasis del Cl^- .

Existen 6 antecedentes claros que demuestran la participación del canal CFTR en la capacitación del espermatozoide de ratón. Es importante, por lo tanto, registraremos la actividad del canal CFTR mediante fijación de voltaje en microáreas de membrana de espermatozoides testiculares y epididimales de ratón. Y analizaremos directamente sobre su actividad el efecto de agonistas e inhibidores bien documentados en otros tipos celulares. Dicha información es necesaria para profundizar en el estudio de las entidades moleculares participantes, su integración y organización en las bases moleculares de la capacitación, hiperpolarización del E_m , hiperactivación, RA y finalmente sobre los requerimientos para que esta célula pueda fecundar al óvulo.

3 HIPÓTESIS

Considerando que la capacitación del espermatozoide se regula por una vía dependiente de AMPc/PKA y que éste proceso está asociado a un incremento de la fosforilación de tirosinas, $[Cl^-]_i$, hiperpolarización del potencial de membrana plasmática y que la activación del canal de Cl^- CFTR ocurre por una fosforilación en sus residuos serina-treonina vía AMP/PKA y por ATP, en otros tipos celulares. Es posible que la regulación del canal CFTR en el espermatozoide de ratón contribuya tanto al incremento parcial de la $[Cl^-]_i$ y a la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática durante la capacitación.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Identificar y caracterizar las corrientes de Cl^- vía CFTR así como completar el estudio de su participación durante el proceso de capacitación en el espermatozoide de ratón.

4.2 Objetivos Específicos

A) Diseñar el componente de las corrientes de Cl^- del espermatozoide testicular y del epidídimo sensible a DPC y CFTR_{inh-172}, así como a genisteína, inhibidores y agonista de CFTR, respectivamente. También, emplearemos otros agonistas y antagonistas a las concentraciones adecuadas para completar el perfil farmacológico de CFTR y corroborar su identidad.

B) Estudiar y establecer las propiedades de CFTR en la membrana plasmática del espermatozoide testicular y epidídimo de ratón. Caracterizar estas corrientes en cuanto a: su sensibilidad al voltaje, cinética de activación, selectividad iónica y dependencia de la $[\text{Cl}^-]_e$ así como su posible regulación por factores citoplasmáticos como ATP y AMPc.

C) Determinar si CFTR se regula por AMPc y ATP como se ha reportado en otros tipos celulares.

D) Evaluar la contribución de otras corrientes aniónicas en el espermatozoide, mediante el uso de antagonistas de otros canales aniónicos (p. ej. AN).

5 **METODOLOGÍA**

5.1.1 **Materiales y Métodos**

El dibutiril AMP cíclico (db-AMPc), el dibutiril GMP cíclico (db-GMPc), el 8-bromo GMP cíclico (8Br-GMPc), el 8-bromo AMP cíclico (8Br-AMPc), el difenil-amina-2-carboxilato (DPC), la genisteína, el n-metil-D-glucamina (NMDG), el gluconato de sodio (GluNa), el NMDG-metanosulfonato (NMDG-MeSO₃), el NMDG-gluconato (NMDG-gluconato), y el 3-[(3- trifluorometil)fenil]-5-[(4 carboxifenil)metileno]-2-thioxo-4tiazolidinona (CFTRinh-172) se compraron a Sigma (St. Louis, MO). Las soluciones madre se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO), excepto por el 8Br-GMPc y 8Br-AMPc, el cual se solubilizo en agua, y almacenó a -20°C, hasta su uso. El db-AMPc, db-GMPc, 8Br-GMPc, y 8Br-AMPc se prepararon y utilizaron a la concentración indicada, el mismo día del experimento. El DMSO en las soluciones siempre fue menor a 0.1% y por si solo no tuvo efecto en la actividad del canal.

Obtención de espermatozoides de ratón

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité local de bioética y cuidado del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT). Los espermatozoides testiculares y epididimales de ratón se obtuvieron a partir de testículos de ratones de la cepa CD-1 adultos de 3 meses y medio de edad. Para la obtención de estas células, se utilizó el protocolo previamente reportado por nuestro laboratorio, con algunas modificaciones (Santi *et al.*, 1996). De manera breve, los ratones adultos se sacrificaron por dislocación cervical. A los ratones se les removieron ambos testículos y estos se

colocaron en una solución salina (HS) con la siguiente composición (en mM): NaCl, 135; KCl, 5; CaCl₂, 2; MgSO₄, 1; HEPES, 20; glucosa, 5; ácido láctico, 10; piruvato de Na⁺, 1; con un pH de 7.4. Posteriormente, se removió la túnica albugínea, la cual es una membrana que recubre a los túbulos seminíferos. La disociación mecánica consistió en la separación de los túbulos seminíferos a partir de los testículos utilizando pinzas de disección muy finas. La separación se hizo en la solución HS, bajo la lente de un microscopio estereoscópico. Por último, los espermatozoides testiculares se obtuvieron a partir de los túbulos seminíferos por dispersión mecánica utilizando una pipeta Pasteur. La suspensión celular obtenida consistió en espermatozoides y en una población heterogénea de espermatozoides y espermátidas redondas. Los espermatozoides se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Los espermatozoides epididimales se obtuvieron a partir de ratones CD-1 de 3 meses y medio de edad. Posterior al sacrificio de los animales por dislocación cervical, los gametos se colectaron de la región del corpúsculo de los epidídimos. Al igual que con los espermatozoides testiculares, los epididimales se almacenaron a 4 °C hasta su uso. En ambos protocolos de separación, los espermatozoides se mantuvieron viables en esas condiciones al menos por 6 horas.

Ratones adultos portadores de la mutación $\Delta F508$ del gene de Cfr (Doorninck *et al.*, 1995; French *et al.*, 1996), los cuales fueron donados generosamente por el Dr. B. J. Scholte del Centro Médico Erasmus de la ciudad de Róterdam, de los Países Bajos, también fueron utilizados. El fondo genético de estos ratones es C57Bl/6J obtenidos por 13 retro-cruzamientos con el tipo silvestre a partir de la línea original 129/FVB (Wilke *et al.*, 2011). Los mutantes homocigotos se obtuvieron por la cría de ratones heterocigotos, alimentados de manera normal y agua acidulada *ad libitum*. La geno-tipificación se realizó

mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) como previamente se ha reportado (Doorninck *et al.*, 1995).

Registros electrofisiológicos

El uso de la técnica de fijación de voltaje en micro áreas de membrana (“patch-clamp”) permite mantener constante el potencial de membrana, y al mismo tiempo se puede registrar la corriente generada por el flujo de los iones a través de los canales iónicos presentes. En este trabajo, todos los registros electrofisiológicos se hicieron en la configuración de célula completa (“whole-cell”) en la gota citoplásmica tanto en los espermatozoides testiculares como epididimales, como se ha reportado (Ren y Xia, 2010; Kirichok y Lishko, 2011). Esta configuración consiste en colocar una pipeta pulida sobre la membrana celular y, mediante una ligera succión, establecer un sello eléctrico de Gohms, obteniéndose así, la configuración de célula unida (“cell-attached”). La configuración de célula completa se consiguió a partir del modo de célula unida, aplicando una succión más fuerte con la finalidad de romper una pequeña área de membrana del sello, lo que permite establecer continuidad eléctrica entre el interior de la pipeta y el interior de la célula. La obtención de esta configuración se confirmó por el aumento en los picos capacitativos al principio y al final del pulso de voltaje, y que representan el aumento en la superficie asociada a la membrana celular.

Para los registros electrofisiológicos, se utilizó una alícuota de espermatozoides la cual se colocó en la cámara de registro situada en la platina de un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-U, Nikon Corp.). Los registros de las corrientes se obtuvieron con un amplificador de *patch-clamp* Axopatch 200A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 20°C. Las micropipetas de registro se generaron a partir de tubos capilares de vidrio de

borosilicato (Kimax-51, Kimble Products), en un estirador horizontal (Sutter Instruments Co., Novato, CA). Las micropipetas tenían una resistencia de 8-10 M Ω cuando se llenaron con solución interna. Los pulsos de voltaje utilizados en los registros electrofisiológicos partieron de un potencial de mantenimiento (HP, por sus siglas en inglés “Holding Potential”) de -40 mV pasando de +100 hasta -80 mV con incrementos de 20 mV y duración de 600 ms. Los registros de las corrientes se grabaron en línea y se digitalizaron a una velocidad de muestreo de 5-10 kHz y se filtraron (2-5 kHz). Los protocolos de pulsos, la captura de los datos y el análisis de los registros se hicieron utilizando el programa pCLAMP 9 (Axon, Molecular Devices, Palo Alto, CA), Origin 7.5 (Microcal Software, Northampton MA) y Sigma Plot 10 (SYSTAT Software, Foster City).

Soluciones de registro

Para aislar a la corriente de Cl⁻ vía CFTR, se utilizó la siguiente solución extracelular (en mM): 145 NMDG-Cl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, ajustada a pH7.2 con NMDG. La solución interna (en mM): 35 NMDG-Cl, 110 NMDG-gluconato, 2 CaCl₂, 2 EGTA (Ca²⁺ libre ~ 10 μ M), 2MgCl₂, 3 ATP-Mg, 10 HEPES, ajustada a pH 6.8 con NMDG. Otra serie de experimentos, se realizaron llevando la concentración de Ca²⁺ intracelular a un nivel fisiológico de ~ 60 nM, incrementando la concentración de EGTA a 5 mM. En experimentos posteriores, el Ca²⁺ extracelular se eliminó, esto se logró utilizando 10 mM de EGTA. Las concentraciones libres de Ca²⁺ se estimaron utilizando el programa MaxChelator V2.00 (Chris Patton, Stanford University, USA). El ATP no estuvo en la solución de pipeta únicamente cuando examinamos su participación sobre las corrientes en cuestión.

Los agonistas y antagonistas a excepción de DIDS, que se solubilizaron en medio acuoso, se prepararon como solución madre en dimetilsulfóxido (DMSO), y se almacenaron a -20°C hasta su uso. En todos los casos, la concentración final de DMSO fue menor a 0.001% y no causó efecto alguno en las corrientes registradas en el espermatozoide. Rutinariamente se usaron las alícuotas de la solución madre de agonistas y antagonistas para preparar la solución externa a la concentración final necesaria para cada experimento, aplicándola posteriormente a la cámara de registro por perfusión.

Análisis estadístico

La mayoría de los datos están expresados como el valor promedio de cada condición \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de n experimentos independientes. Únicamente la **figura 5.3B** muestra los datos crudos de las corrientes con la desviación estándar (DS), esto con la finalidad de que se aprecie la magnitud y su variabilidad. El valor promedio de cada condición se comparó empleando la prueba de t-Student y se consideró $P < 0.05$ como el límite de significancia estadística.

RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente, resultados previos en nuestro laboratorio y los de un grupo externo demostraron la presencia del CFTR en el espermatozoide de humano y ratón mediante detección inmunológica y uso de inhibidores específicos. Sin embargo, hasta el presente trabajo no se había demostrado la presencia de esta corriente y probado directamente la posibilidad de que agonistas e inhibidores del CFTR, respectivamente pudieran modular a la corriente de Cl⁻ tipo CFTR en el espermatozoide de ratón.

El poder establecer la presencia funcional de un canal iónico en una célula específica no es tarea fácil debido a que estas proteínas son componentes menores de la membrana. De manera inicial, la caracterización de canales iónicos del espermatozoide se realizó en bicapas lipídicas incorporadas con membrana plasmática de espermatozoides de erizo de mar (Darszon *et al.*, 1996; Darszon *et al.*, 1999) y canales permeables a Ca²⁺ de la membrana plasmática de espermatozoides de jabalí (Cox y Peterson, 1989). Es importante destacar que durante varios años, el lograr registros electrofisiológicos en espermatozoides para el estudio de sus canales iónicos fue extremadamente difícil dado las limitaciones metodológicas por la forma y dimensiones del espermatozoide. Por fortuna, las limitantes experimentales fueron resueltas pudiéndose lograr sellos en la gota citoplásmica y obtener registros en su configuración de “whole-cell” en los espermatozoides epididimales de ratón (Kirichok *et al.*, 2006). Posteriormente, esta estrategia se trasladó a espermatozoides de humano (Kirichok y Lishko, 2011). Esta adaptación técnica, ha permitido la caracterización de varios canales iónicos, entre ellos CatSper (en ratón y humano) (Kirichok y Lishko, 2011) y SLO3 (en ratón) (Navarro *et al.*, 2007; Santi *et al.*, 2010; Schreiber *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 2011), hasta ahora, estos dos canales son los únicos descritos como específicos del espermatozoide, cuya ausencia genera infertilidad.

5.2 *Contribución de canales de Cl⁻ a la corriente macroscópica de los espermatozoides testiculares.*

Para aislar las corrientes de Cl⁻ del espermatozoide testicular, se diseñaron soluciones experimentales donde el Cl⁻, es el principal ión permeable usando un catión impermeable (NMDG-Cl). A continuación, realizamos una serie de experimentos de fijación de voltaje en presencia de distintas concentraciones de Cl⁻ externo (145, 110, 60 y 35 mM; material y métodos), manteniendo fija la [Cl⁻]_i a 35 mM, y seguimos el potencial de inversión (E_{rev} , potencial en donde el flujo neto de iones a través de la membrana es cero) de las corrientes. **El panel A de la figura 7** muestra los trazos de las corrientes típicas de espermatozoides para cada condición, en respuesta a los pulsos de voltaje utilizados los cuales partieron de +100 hasta -80 mV con incrementos de 20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -40 mV (los pulsos fueron de 600 ms) (**Fig. 7A, panel superior**). En presencia de las distintas concentraciones de NMDG-Cl, respectivamente en el medio externo, los experimentos revelan la activación de corrientes entrantes y salientes, las cuales se mantuvieron estables durante los pulsos de voltaje (**Fig. 7A**). Las corrientes salientes registradas fueron de mayor magnitud que aquellas observadas en los pulsos de voltaje negativos (**Fig. 7A**). En el panel **B** de esta figura se muestra la curva $I-V$ obtenida de las corrientes al final de los pulsos de voltaje, a las distintas concentraciones de Cl⁻ externo, donde se observa que los valores de los E_{rev} fueron distintos en función de la relación entre las concentraciones externa e interna de Cl⁻. Dicha relación se ajusta a lo establecido en la ecuación de Nernst (**Tabla 3**) para un canal altamente selectivo que se comporta como un electrodo que es más específico para un ión en particular (**Fig. 7B**). A continuación, reemplazamos la mayor parte del Cl⁻ (95%) en la solución externa con gluconato⁻ y MeSO₃⁻ (NMDG-gluconato y NMDG-MeSO₃), dos aniones impermeables.

Como se ilustra en la **figura 7C**, la sustitución de Cl^- por aniones impermeables disminuye significativamente las corrientes y el E_{rev} se desplazó del E_{Cl^-} (-24.5 mV) a -2.2 ± 0.8 mV (MeSO_3^- , $n=5$) y -3 ± 0.6 mV (gluconato $^-$, $n=5$; **Fig. 7C**). De este modo, se concluye que la corriente registrada se da a través de canales con alta selectividad al Cl^- .

5.2.1 Efecto de bloqueadores de canales aniónicos sobre las corrientes de Cl^- de los espermatozoides testiculares.

Continuando con la investigación de la entidad molecular responsable de las corrientes principalmente de Cl^- registradas en los espermatozoides testiculares en las condiciones experimentales establecidas decidimos utilizar bloqueadores de canales aniónicos. El DPC es un inhibidor relativamente específico que bloquea reversiblemente al CFTR, con $\text{IC}_{50} = 250 \pm 5$ μM (Di Stefano *et al.*, 1985; Reuss *et al.*, 1987; Jentsch *et al.*, 2002), este bloqueador también afecta de manera parcial a los CaCCs (Schroeder *et al.*, 2008). Debido a la presencia de otro canal de Cl^- reportado en el espermatozoide de ratón (Espinosa *et al.*, 1998) y que nuestra solución interna tenía ~ 10 μM de Ca^{2+} libre, decidimos utilizar al ácido niflúmico (AN), bloqueador de los CaCCs, con $\text{IC}_{50} = 29 \pm 6$ μM (Hartzell *et al.*, 2005), para descartar su contribución a la corriente. Estos compuestos se probaron sobre la corriente de Cl^- . Los pulsos de voltaje utilizados en los registros electrofisiológicos son como el de la **Figura 7**. Los valores de las corrientes al final de los pulsos de voltaje se emplearon para obtener la gráfica *I-V*, en presencia de las soluciones establecidas. El DPC a 250 μM , concentración a la cual bloquea $\sim 50\%$ (-100 mV) de los canales CFTR en expresión heteróloga (Zhang *et al.*, 2000), bloqueo el $37 \pm 3\%$ (-80 mV) de la corriente, lo que nos sugiere que la corriente sensible a DPC podría corresponder al

CFTR (**Fig. 8**) (n=5). Para examinar si la corriente remanente en presencia de DPC es sensible al AN, adicionamos 50 μM de AN en presencia de 250 μM de DPC, esto generó una inhibición adicional de la corriente de Cl^- de $37 \pm 3\%$ a $50 \pm 0.4\%$ a -80 mV (**Fig. 8**) (n=5). El efecto del bloqueo por DPC y NA en las corrientes es parcialmente reversible (de $74.5 \pm 0.4\%$; -80 mV) (**Fig. 8**) (n=5). Estos resultados nos permiten proponer que el CFTR podría tener una actividad basal, debido a que al inicio de los registros previo a la estimulación por los inductores, nosotros tenemos una corriente de Cl^- que es sensible a DPC y AN, entonces proponemos que una fracción de la corriente de CFTR esta activa en las condiciones basales al inicio de los registros en los espermatozoides de ratón. En el caso del AN, el resultado anterior es consistente con el reporte previo de nuestro laboratorio (Espinosa *et al.*, 1998), donde mostramos que la corriente de Cl^- tiene un componente sensible a este inhibidor en el espermatozoide de ratón. Las observaciones que hemos obtenido en el espermatozoide testicular de ratón son consistentes con los datos reportados anteriormente en la expresión heteróloga del CFTR (Schultz *et al.*, 1999) y CaCCs en ovocitos de *Xenopus* (Hartzell *et al.*, 2005).

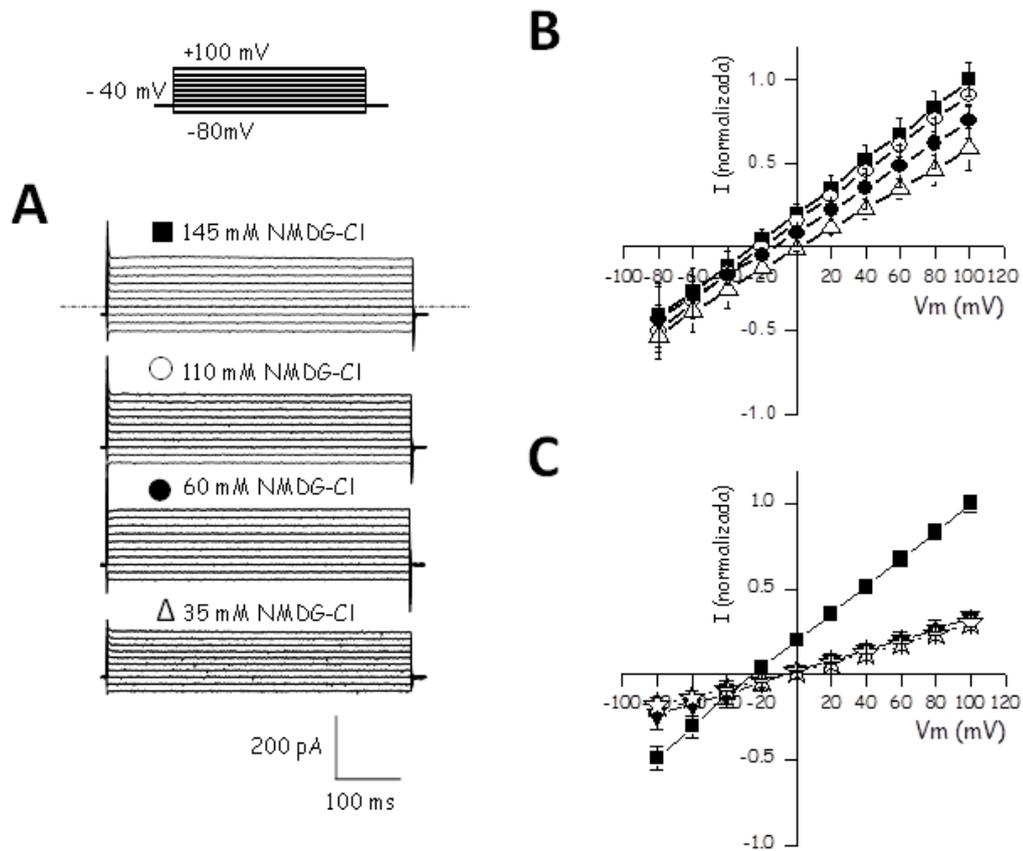


Figura 7: Efecto de la concentración de Cl⁻ extracelular en las corrientes de espermatozoides testiculares.

A: Familia de corrientes de Cl⁻ registradas a partir de un potencial de mantenimiento de -40 mV con pulsos de prueba depolarizantes desde -80 mV hasta 100 mV (panel inferior). Las corrientes se registraron en presencia de solución interna compuesta de (en mM): 35 NMDG-Cl, 110 NMDG-gluconato, 2 CaCl₂, 2 EGTA, 2 MgCl₂, 3 ATP-Mg, 10 HEPES, ajustada a pH 6.8 con NMDG. La solución externa contenía (en mM): 145 NMDG-Cl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, ajustada a pH 7.2 con NMDG (145 NMDG-Cl, ■). Las otras concentraciones de Cl⁻ que se utilizaron fueron (en mM): 110 NMDG-Cl (○) y 60 NMDG-Cl (●) y 35 NMDG-Cl (Δ). La línea discontinua indica el potencial en 0 mV. **B:** Gráfica I-V de las corrientes en A, que muestra la variación del E_{rev} con respecto a las concentraciones de Cl⁻ extracelular. **C:** Gráfica I-V de las corrientes obtenidas en respuesta al reemplazo de Cl⁻ (■) por metanosulfonato (▼) y gluconato (☆) respectivamente, del lado extracelular. Los símbolos representan el promedio ± E.S.M. de 5 experimentos independientes; algunas barras de E.S.M. son más pequeñas que los símbolos. Las corrientes se normalizaron con respecto a la corriente control de Cl⁻ (145 NMDG-Cl) a 100 mV.

Tabla 3: Potencial reverso de la corriente (E_{rev}) obtenido de las corrientes en espermatozoides testiculares y valores teóricos del potencial de inversión de Cl^- (E_{Cl^-}) a distintas concentraciones de Cl^- extracelular.

$[Cl^-]$ (mM) (Sol. Extracel ^a /Sol. Intracel ^b)	E_{rev} Experimental (mV)	E_{rev} Teórico (mV)
145/35	-24.5 ± 0.4	-31.9
110/35	-22.9 ± 0.2	-25.4
60/35	-11.5 ± 0.2	-11
35/35	+1.4 ± 0.2	0

^a Solución de baño (en mM): 145 (110, 60 ó 35) NMDG-Cl, 0 (35, 65 ó 110), NMDG-gluconato, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, ajustado a pH 7.2 con NMDG. ^b Solución de pipeta (en mM): 35 NMDG-Cl, 110 NMDG-gluconato, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 3 ATP-Mg, 2 EGTA, 10 HEPES, ajustado a pH 6.8 con NMDG. Los datos representan el promedio ± SEM de 6 experimentos independientes.

5.2.2 Permeabilidad del CFTR a Cl^- , Br^- , I^- y HCO_3^-

El siguiente paso en la caracterización del canal de Cl^- , CFTR en el espermatozoide testicular fue investigar su selectividad. Para ello se recurrió al reemplazo de la $[Cl^-]_{ext}$ con 145 mM de sales de TEA de los aniones externos HCO_3^- , Br^- , I^- y Cl^- , respectivamente. Es importante subrayar que la activación de CFTR se realizó por la adición de db-AMPC (250 μ M) en todas las soluciones externas experimentales así como en presencia de 35 mM de Cl^- interno y 3 mM de ATP en la solución de pipeta. Los registros de las corrientes iónicas se realizaron empleando la técnica de fijación de voltaje en micro áreas de membrana en la configuración de célula completa directamente en la gota citoplásmica del espermatozoide. Los pulsos de voltaje utilizados en los registros electrofisiológicos son como en la **figura 7**. Este protocolo de estimulación reveló la activación de corrientes salientes y entrantes, las cuales se mantuvieron estables durante los pulsos de voltaje (**Fig. 9**). Por su parte, la **figura 9A** muestra las corrientes obtenidas al sustituir 145 mM de TEACl en la solución externa por una cantidad igual de TEABr, TEAI

y TEAHCO₃, respectivamente. Los resultados obtenidos en esta condición muestran que la sustitución por Br⁻ genera corrientes de mayor magnitud ($76 \pm 1.6\%$) que aquellas observadas en presencia de Cl⁻ (**Fig. 9A y B**). El reemplazo de Cl⁻ por I⁻ y HCO₃⁻, respectivamente, genera corrientes de similar magnitud tanto en los pulsos de voltaje positivos como negativos comparadas con las corrientes en presencia de Cl⁻ (**Fig. 9A y B**). Los valores de las corrientes al final de los pulsos de voltaje se emplearon para obtener la

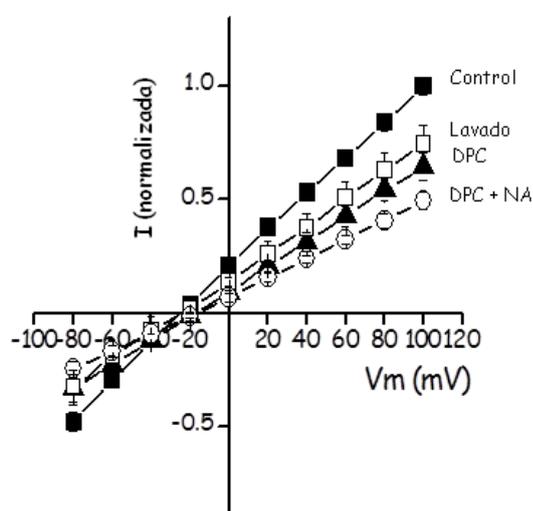


Figura 8: Inhibición por DPC y AN, de las corrientes de Cl⁻ en espermatozoides testiculares.

A: Gráfica *I-V* obtenida de corrientes de espermatozoides expuestos a una solución externa e interna descritas en la figura 7. La gráfica muestra el bloqueo por DPC (250 μ M, \blacktriangle) sobre las corrientes control (\blacksquare), y la inhibición adicional, por AN (50 μ M, \circ) en las corrientes remanentes. La recuperación parcial de las corrientes se obtiene al lavar el DPC y AN (\square). El protocolo de voltaje aplicado se describió en la figura 7. Los símbolos representan el promedio \pm E.S.M. de 5 experimentos independientes; algunas barras de E.S.M. son más pequeñas que los símbolos. Las corrientes se normalizaron con respecto a la corriente control de Cl⁻ a 100 mV.

gráfica $I-V$, en presencia de las condiciones establecidas (**Fig. 9B**). Para obtener información sobre la selectividad de las corrientes registradas en el espermatozoide, se determinó el E_{rev} de la corriente registrada en diferentes concentraciones iónicas sustituyendo el Cl^- por otros aniones. El valor obtenido del E_{rev} de las corrientes registradas en presencia de Cl^- fue -26.5 ± 1 mV, valor relativamente próximo al E_{Cl^-} de acuerdo a la ecuación de Nernst (-31.9 mV). Para la segunda condición Br^- , el valor obtenido E_{rev} fue -30.2 ± 1.2 mV, valor similar al E_{Cl^-} . Para la tercera condición I^- , el valor obtenido E_{rev} fue -9.3 ± 1.8 mV, contra el E_{rev} teórico para el ión Cl^- que es de -31.9 mV, mientras que para la cuarta condición HCO_3^- , el valor obtenido E_{rev} fue -6.3 ± 1.1 mV, contra el E_{Cl^-} (**Tabla 3**). A partir de estos experimentos, las razones de permeabilidad aniónica se estimaron a partir de los valores de E_{rev} obtenidos en las condiciones de Br^- , I^- y HCO_3^- sobre Cl^- , usando la modificación de la ecuación de Goldman-Hodgking-Katz (GHK), en la configuración de célula unida con reemplazo total de Cl^- extracelular

$$\frac{P_x}{P_{Cl^-}} = \frac{[Cl^-]_o}{[X]_o \times 10^{\delta E_{rev}/58.7}}$$

Donde P es la permeabilidad para cada determinado ion; $[X]_o$ es la concentración extracelular del ión sustituto en medio sin Cl^- y $[Cl^-]_o$ es la concentración de Cl^- extracelular; E_{rev} es potencial de inversión; y δE_{rev} es la diferencia en el potencial de inversión entre el control y el ión reemplazante en la solución externa (expresado como la diferencia en el potencial de membrana); 58.7 es el valor que resulta de multiplicar la constante de los gases (R) y la temperatura en °K (T).

Los resultados del análisis utilizando la modificación de la ecuación de GHK muestran valores de P_x/P_{Cl^-} de 1.2, 1, 0.54 y 0.48 para Br^- , Cl^- , I^- ó HCO_3^- , respectivamente

(**Tabla 4**) los cuales son muy similares a lo reportado para el CFTR. Cabe señalar que la razón de permeabilidad P_{I^-}/P_{Cl^-} reportada para el CFTR oscila entre 0.4-0.6 (Tabcharani *et al.*, 1997). De esta manera, el patrón de selectividad que se obtuvo fue: $Br^- \geq Cl^- > I^- > HCO_3^-$. Con base en estas mediciones de selectividad iónica se pudo establecer que el canal muestra un patrón de selectividad similar al reportado anteriormente en la configuración de célula completa, en expresión heteróloga del CFTR (Anderson *et al.*, 1991; Tabcharani *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

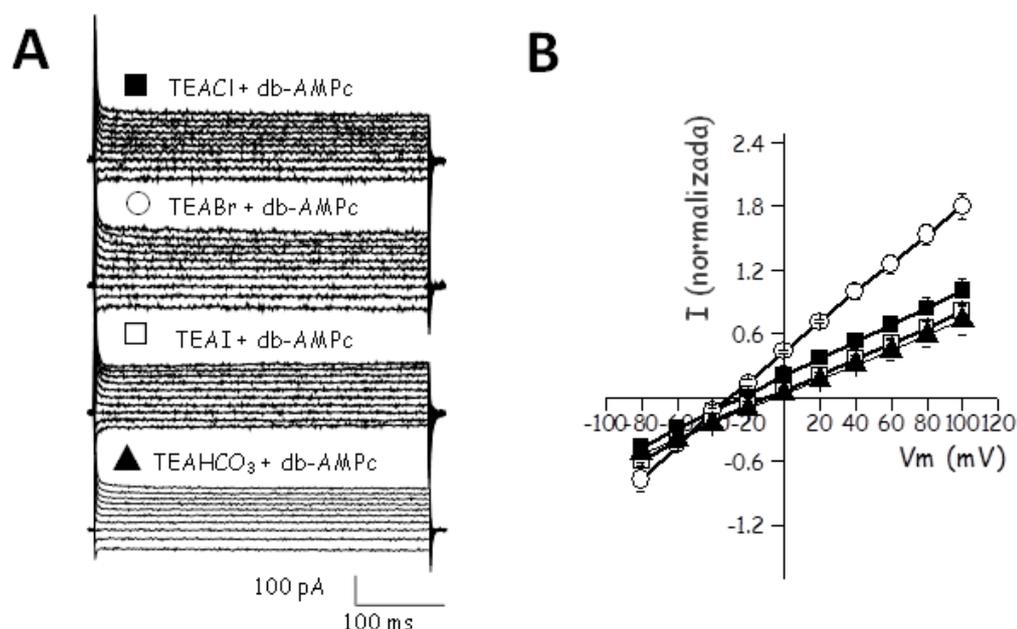


Figura 9: Selectividad del CFTR a Br^- , Cl^- , I^- y HCO_3^- en espermatozoides testiculares.

A: Registros de corrientes en presencia de 145 mM de sales de TEA de Cl^- , Br^- , I^- ó HCO_3^- externos, respectivamente o sustitución de Cl^- (control, panel superior) (■) por Br^- (○), I^- (□) y HCO_3^- (▲), respectivamente, después de la estimulación con db-AMPc (100 μ M). La composición de la solución intracelular y extracelular, así como el protocolo de voltaje aplicado se describieron en la figura 7. **B:** Curva I - V de las mismas corrientes mostradas en A. Los símbolos representan el promedio \pm E.S.M. de 3 experimentos

independientes; algunas barras de E.S.M. son más pequeñas que los símbolos. Las corrientes se normalizaron con respecto a la corriente control de Cl⁻ a 100 mV.

Tabla 4: Permeabilidad del CFTR a aniones extracelulares en el espermatozoide testicular de ratón

Anión extracelular	E _{rev} (mV)	P _X /P _{Cl}	n
Bromo	-30.2±1.2	1.2	3
Cloro	-26.5±1.0	1	3
Yodo	-9.3±1.8	0.54	3
Bicarbonato	-6.3±1.1	0.48	3

Resumen de los potenciales reversos (E_{rev}) y razón de permeabilidad calculada con diferentes aniones extracelulares en el espermatozoide testicular de ratón. Ver materiales y métodos para los detalles. La solución interna compuesta de (en mM): 35 NMDG-Cl, 110 NMDG-gluconato, 2 CaCl₂, 2 EGTA, 2 MgCl₂, 3 ATP-Mg, 10 HEPES, ajustada a pH 6.8 con NMDG. La solución externa contenía (en mM): 145 TEACl (TEABr, TEAI, TEAHCO), 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, ajustada a pH 7.2 con NMDG. Los datos representan el promedio ± SEM de 6 experimentos.

5.2.3 Caracterización de corrientes del CFTR en los espermatozoides testiculares.

Al iniciar la caracterización del CFTR en espermatozoides testiculares se identificaron propiedades de modulación por AMPc, ATP, GMPc, DPC, CFTR_{inh}-172 y genisteína. Tomando como base las observaciones previas, nos dimos a la tarea de discernir la contribución tanto del CFTR como de los CaCCs de la corriente de Cl⁻ en los espermatozoides testiculares de ratón. Para la activación del CFTR empleamos el db-AMPc en solución extracelular y ATP en la solución de pipeta; para examinar la

contribución de los CaCCs en las corrientes, utilizamos distintas $[Ca^{2+}]$ libre, 10 μM (**Fig. 10A, B y C**) y 60 nM (**Fig. 11A y B**) en la solución de pipeta y también establecimos la condición 0 Ca^{2+} , tanto del lado intracelular como extracelular (**Fig. 11C y D**). La activación de las corrientes de Cl^- se realizó mediante la aplicación del protocolo de voltaje similar al de la **figura 7**. Los valores de las corrientes al final de los pulsos de voltaje se emplearon para obtener las gráficas $I-V$. Como se observa a continuación, nuestros resultados muestran que el db-AMPC (100 μM) agregado en la solución externa por perfusión en presencia de ATP (3 mM) en la solución de pipeta, genero la activación de corrientes de Cl^- (de $\sim 75 \pm 12\%$) (+100 mV) (**Fig. 10A y B**) (n=6). Como se ilustra en la **figura 12A**, el efecto de db-cAMP es dosis-dependiente y el máximo de estimulación de la corriente se logra a concentraciones mayores de 50 μM . Los datos normalizados se ajustaron a una ecuación de Hill, de donde se pudo estimar una concentración que activa la mitad de la corriente (EC_{50}) de $\sim 35 \mu M$. Este valor es cercano a lo reportado en estudios previos de expresión heteróloga del CFTR (Sullivan *et al.*, 1995). Otro factor modificado por la adición de db-AMPC fue el E_{rev} , el cual se desplazó próximo al teórico de E_{Cl^-} de -31.9 mV (**Fig. 10 B**) y potencia la inhibición por DPC (250 μM) de las corrientes de Cl^- activadas por db-AMPC a $69.8 \pm 10\%$ a -80 mV (**Fig. 10A y B**). Dicha inhibición fue parcialmente reversible (**Fig. 10A, panel inferior y B**). Una concentración mayor de DPC (350 μM), no tiene efecto considerable sobre estas corrientes (**Fig. 12B**). El **panel B de la figura 12**, nos muestra la dosis dependencia del bloqueo por DPC en las corrientes activadas por db-AMPC. Este resultado es similar a la inhibición observada previamente en la expresión heteróloga del CFTR (Zhang *et al.*, 2000). Sin embargo, el coeficiente de Hill (n_H) obtenido del bloqueo por DPC es de ~ 3 y no 1 como se ha reportado para el CFTR (Zhang *et al.*, 2000). Este resultado es consistente con la presencia tanto del CFTR como de los CaCCs en el espermatozoide de ratón, cuyo n_H es ~ 3 (Qu *et al.*, 2003).

Los resultados muestran que hay un componente sensible a AMPc y a DPC, lo que sugiere que el canal tipo CFTR podría estar funcionalmente presente en el espermatozoide testicular. Por otro lado, es importante mencionar que el DPC a concentraciones similares a la utilizada (250 μM), también bloquea a los CaCCs (los cuales a una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ determinada de 75 nM podrían estar activos ~30%) (Arreola *et al.*, 1996), y a otras corrientes de Cl^- estimuladas por AMPc (Tsumura *et al.*, 1998). La corriente resistente a DPC registrada en nuestras condiciones experimentales sugiere la contribución de otros canales iónicos presentes en el espermatozoide (Santi *et al.*, 2010 y Santi *et al.*, 2013; Martínez-López *et al.*, 2011).

El panel A y B de la **figura 11** muestran que a una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 60 nM, el db-AMPc incrementa la corriente en un $53 \pm 8\%$, cuando se analiza la corriente a +100 mV (n=3). El bloqueo por DPC de las corrientes a potenciales positivos, donde el CFTR no es inhibido por este compuesto, depende de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De esta manera, tenemos que a +100 mV el bloqueo por DPC de las corrientes disminuyó de $63.8 \pm 25\%$ (n=9) en 10 μM a $19.3 \pm 6.8\%$ (n=6) a 60 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$; mientras que a -80 mV fue de $69.8 \pm 10\%$ en 10 μM y $51.4 \pm 15\%$ en 60 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (**Fig. 10A, B y 11A y B**). Finalmente, las corrientes y la curva *I-V* obtenidas en ausencia de Ca^{2+} tanto externo como interno, para eliminar la actividad de los CaCCs se muestran en la **figura 11C y D**. En esta condición de registro, a +100 mV la aplicación de db-AMPc estimula las corrientes en un $39 \pm 4.6\%$ (n=3 \pm SD). Como se esperaba, el bloqueo por DPC se observó únicamente a potenciales negativos donde el CFTR es sensible a este compuesto ($18 \pm 2.3\%$ a -100 mV, n=3). La **figura 12C** resume como la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ afecta el bloqueo de la corriente por DPC dependiente de voltaje.

Estudios previos han demostrado que el bloqueo por DPC de la corriente de Cl^- vía CFTR es dependiente de voltaje, en expresión heteróloga del CFTR en ovocitos de

Xenopus y miocitos auriculares de ratón, respectivamente (McCarty *et al.*, 1993; Walsh y Wang, 1996; Schultz *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Nuestros resultados son consistentes con los datos reportados, por lo que podemos concluir que el canal CFTR del espermatozoide testicular de ratón es el principal blanco del DPC en esta condición experimental. A potenciales positivos (donde el CFTR no es inhibido por este fármaco), el bloqueo por DPC de las corrientes depende de la $[Ca^{2+}]_i$, situación que se observa en la condición de 0 Ca^{2+} intracelular y extracelular, donde no se bloqueó la corriente, como consecuencia de la no actividad de los CaCCs, sugerido en la **figuras 11C, D y 12C**. Es importante mencionar que estos resultados corroboran la presencia de los CaCCs en el espermatozoide de ratón (Espinosa *et al.*, 1998), los cuales hasta ahora, no se han caracterizado.

Debido a que en nuestras manos, la ausencia de $[Ca^{2+}]_i$ en la solución interna dificultó considerablemente la obtención de la configuración de célula unida, decidimos mantener la $[Ca^{2+}]_i$ en 10 μ M para el resto de los experimentos, excepto para los experimentos realizados en los espermatozoides epidídimaes.

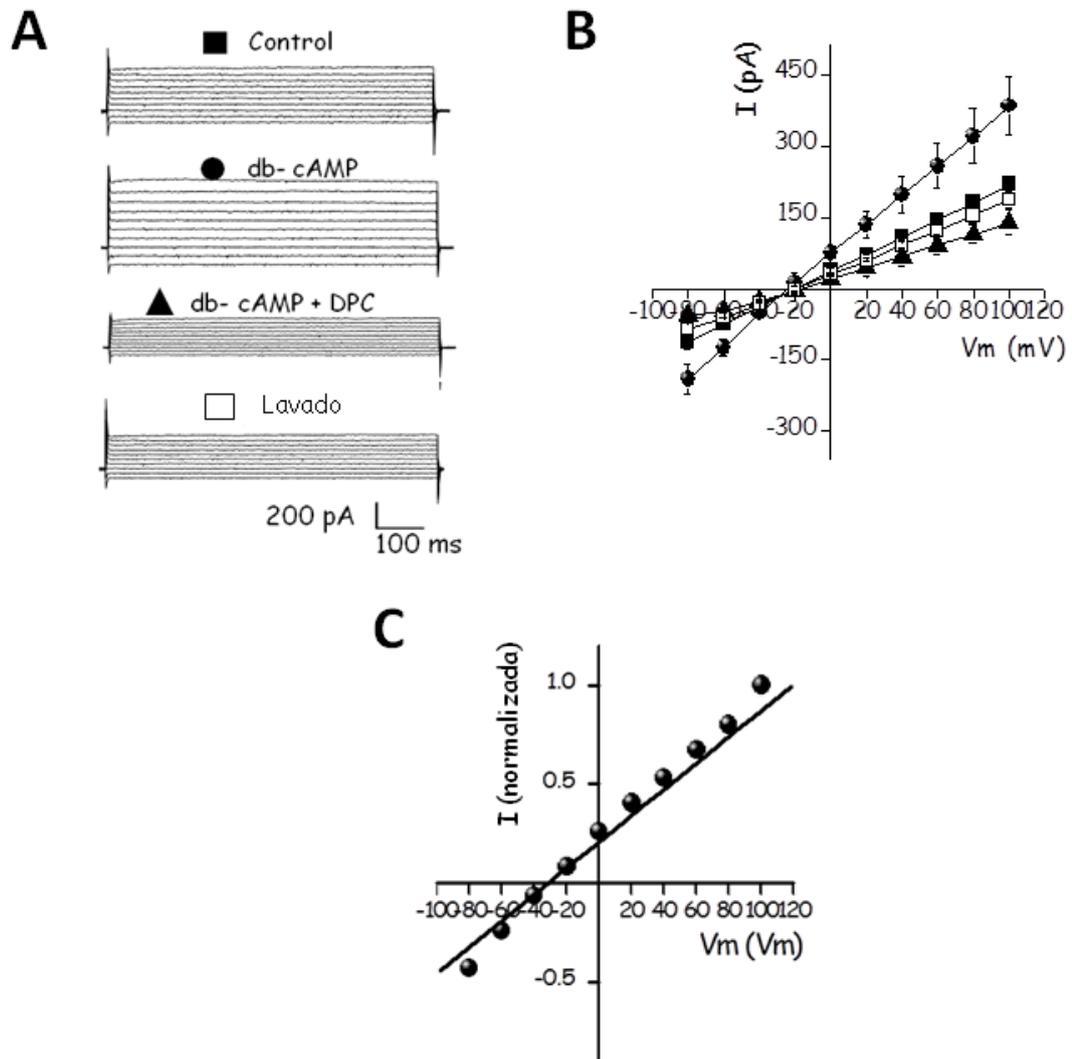


Figura 10: Inhibición por DPC, de las corrientes de Cl⁻ estimuladas por db-AMPC en espermatozoides testiculares.

A: Registro de corrientes de Cl⁻ evocada por un protocolo de pulsos tal y como se describe en la figura 7. El registro se obtuvo con una solución externa e interna (con Ca²⁺ libre ~ 10 μM) de Cl⁻, definida en la figura 10. Las corrientes de Cl⁻ control (■ Control), son activadas por db-AMPC extracelular (100 μM; ● db-AMPC), e inhibidas por DPC (250 μM; ▲ db-AMPC+DPC). La inhibición fue parcialmente reversible (lavado □). **B:** Gráfica *I-V* de las corrientes en A. **C:** Relación *I-V* obtenida después de realizar la substracción de la corriente activada con db-AMPC (100 μM, ●) menos la corriente inhibida por DPC (250 μM, ▲ db-AMPC + DPC). Los símbolos representan el promedio ±DS de 6 experimentos independientes. La relación *I-V* muestra datos normalizados con respecto a la corriente de Cl⁻ control a 100 mV.

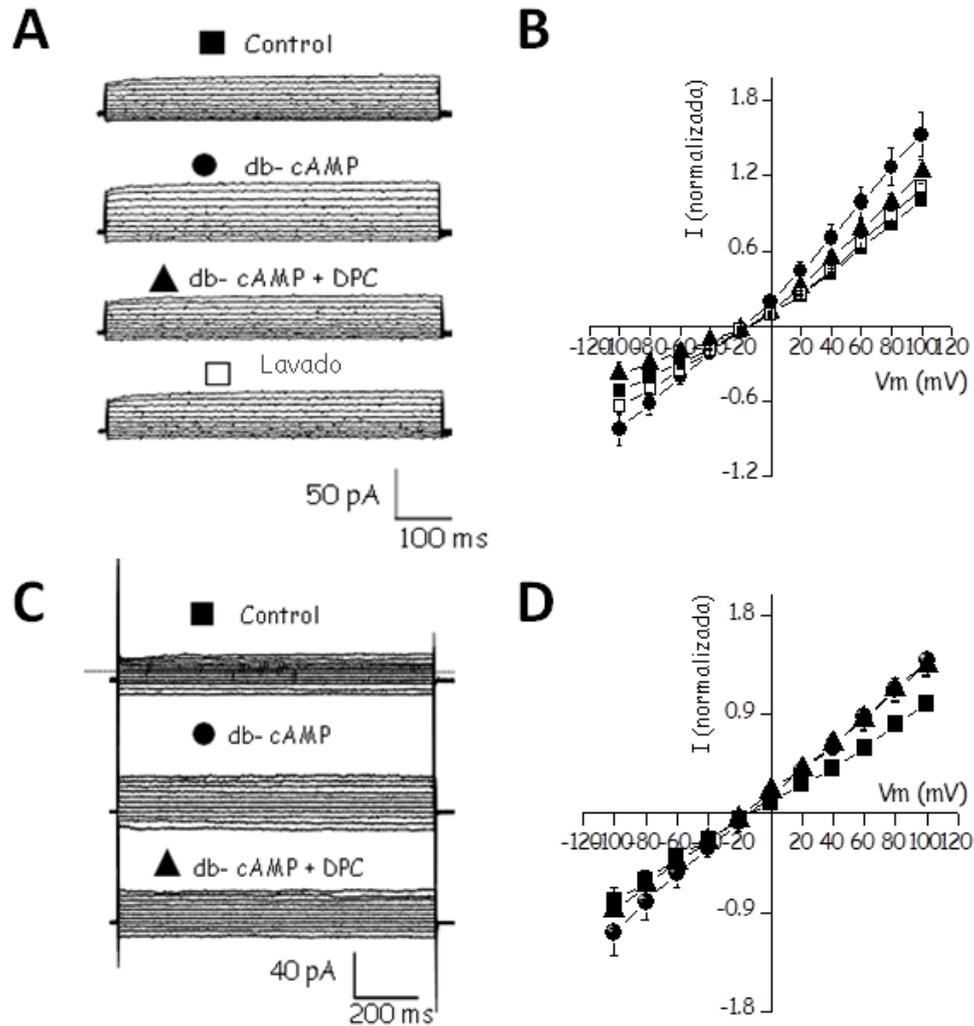


Figura 11: Inhibición por DPC, de las corrientes de Cl^- activadas por db-AMPC dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y voltaje de los espermatozoides.

A: Familia de corrientes de Cl^- registradas aplicando el protocolo de voltaje que se describió en la figura 7 con $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 10 μM . Las corrientes se obtuvieron reduciendo el Ca^{2+} libre a ~ 60 nM en la solución interna. La composición de las soluciones externa e interna se definió en la figura 10. El db-AMPC (100 μM , ● db-AMPC) estimuló las corrientes de Cl^- (■ control), las cuales fueron inhibidas de manera significativa por 250 μM de DPC (▲ db-AMPC+DPC). Este efecto fue parcialmente reversible (□ lavado). **B:** Curva I - V de las corrientes mostradas en A. **C:** Familia de corrientes de Cl^- registradas en ausencia de Ca^{2+} interno y externo, respectivamente. La presencia de db-AMPC (100 μM , ● db-AMPC) estimuló a las corrientes de Cl^- control (■ control), inhibidas por 250 μM de DPC (▲ db-AMPC+DPC), únicamente a potenciales negativos. La línea punteada indica la corriente a 0 mV. **D:** Gráfica I - V de las corrientes en C. Los símbolos representan el promedio \pm E.S.M. de 3 experimentos independientes. La relación I - V muestra datos normalizados con respecto a la corriente de Cl^- control a 100 mV.

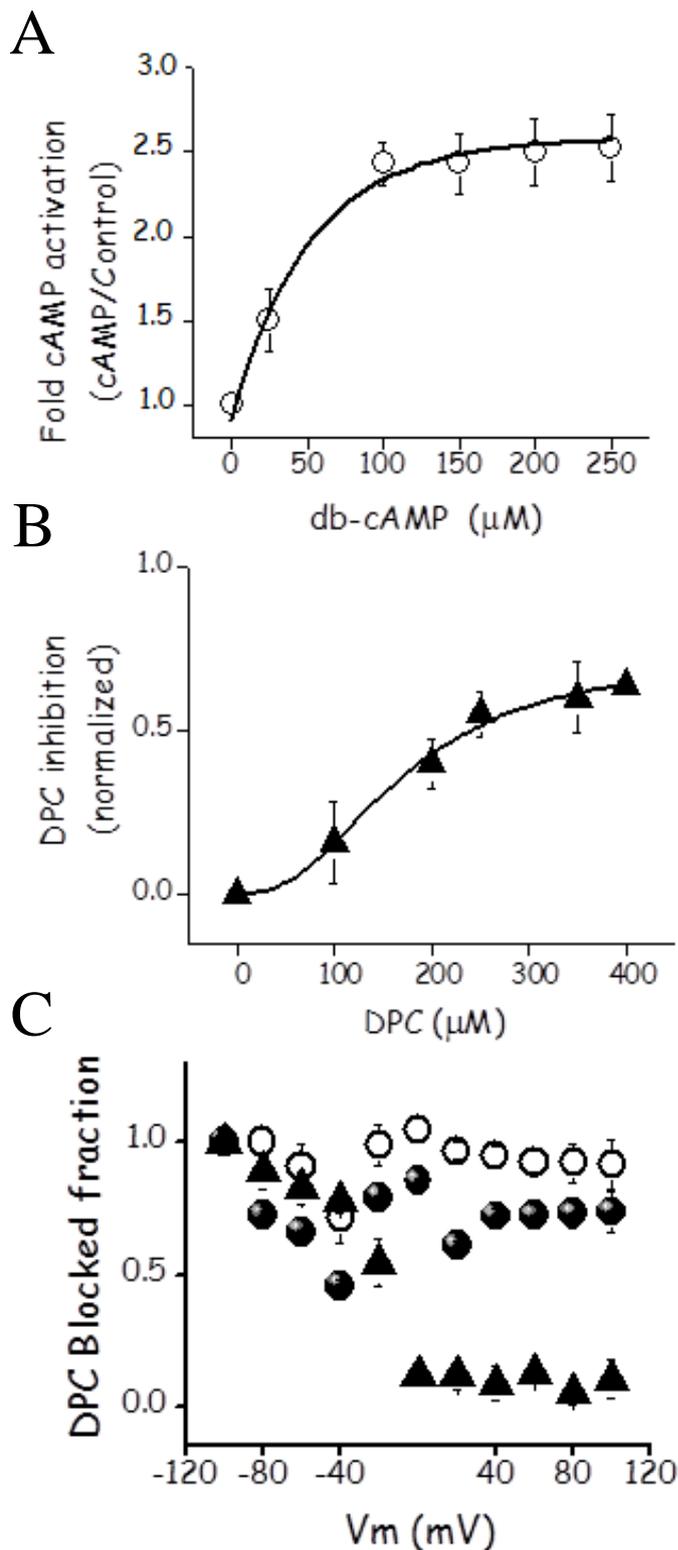


Figura 12: Curvas Dosis respuesta de la estimulación y bloqueo por db-AMPC y DPC, respectivamente de las corrientes de Cl^- en el espermatozoide testicular.

A: Curva dosis respuesta para db-AMPC sobre las corrientes de Cl^- . La activación de la corriente de Cl^- macroscópica a +100 mV se graficó en función de la [db-AMPC] (○). La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Hill. El valor de la EC_{50} para el db-AMPC fue de $\sim 35 \mu\text{M}$. **B:** Curva dosis respuesta de la fracción bloqueada de la corriente de Cl^- estimulada por db-AMPC por DPC. Este bloqueo por DPC, se graficó en función de la [DPC] a -80 mV (▲). Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Hill (línea continua), con un valor de IC_{50} para el DPC de $\sim 175 \mu\text{M}$ y $n_H \sim 3$. **C:** Fracción bloqueada de la corriente de Cl^- estimulada por db-AMPC por DPC en función del voltaje y de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los registros se obtuvieron de un protocolo de voltaje que se describió en la figura 7. Los trazos de la corriente en presencia y ausencia de db-AMPC y DPC, respectivamente, se muestran en la figura 10A, 11A y C. Los símbolos representan el promedio \pm S.E.M. de 6 experimentos independientes en A, B y C (para ○ y ●), y 3 experimentos independientes en C (▲). Para A, la estimulación de la corriente por db-AMPC se normalizó con respecto a la corriente de Cl^- control a 100 mV. Para B y C, el bloqueo de la corriente por DPC se normalizó con respecto a la corriente estimulada por db-AMPC a -80 mV. 10 μM para el resto de los experimentos, excepto para los experimentos realizados en los espermatozoides epididimales.

5.2.4 Efecto del análogo permeable de AMPc (8Br-AMPc) sobre la corriente de Cl⁻ de los espermatozoides testiculares

Con la finalidad de corroborar que el db-AMPc es el responsable de activar a las corrientes de Cl⁻ que son bloqueadas por DPC, decidimos utilizar otro análogo de AMPc permeable, 8Br-AMPc, para ello se registraron las corrientes con pulsos de voltaje como los de la **figura 7**, en presencia de 100 μM de 8Br-AMPc. A esta concentración, el análogo permeable de AMPc activa $48.9 \pm 0.11\%$ de las corrientes (**Fig. 13A y B**) de manera similar a db-AMPc (n=3). La adición de CFTR_{inh}-172 (5 μM) sobre las corrientes estimuladas por 8Br-AMPc generaron una inhibición significativa (~50 %) de la corriente (**Fig. 13A y B**), la cual es parcialmente reversible.

5.2.5 Efecto del CFTR_{inh}-172, inhibidor selectivo del CFTR, sobre las corrientes de Cl⁻ activadas por db-AMPc en los espermatozoides testiculares

Recientemente se ha identificado a través del formato de ensayo optimizado y miniaturizado (*High-throughput screen*), a un inhibidor del canal CFTR, CFTR_{inh}-172 (inh-172) (Taddei *et al.*, 2004). Este inhibidor, es selectivo para el CFTR. Las concentraciones que bloquean al canal no inhiben a los CaCCs, ni modifica la función de canales de K⁺ regulados por ATP (K_{ATP}), proteínas resistentes a multi-drogas (MDR1), así como a otros transportadores. Este inhibidor es mucho más específico que los bloqueadores de canales de Cl⁻ previamente reportados como el AN, DPC, 5-nitro-2-(3-

fenilpropilamina)- ácido benzoico (NPPB), entre otros, que afectan a algunos canales aniónicos y catiónicos (Schultz *et al.*, 1999; Rabe *et al.*, 1995). Se ha reportado que CFTR_{inh}-172 presenta una IC₅₀ = 0.3 μM (Ma *et al.*, 2002; Haggie y Verkman, 2007) IC₅₀= 0.25 – 0.50 μM (Muanprasat *et al.*, 2004), IC₅₀= 0.5 μM (Thiagarajah *et al.*, 2004). El inhibidor bloquea reversiblemente al canal de Cl⁻ CFTR y es independiente del voltaje. También, se ha demostrado que el CFTR_{inh}-172 no es tóxico a altas concentraciones en cultivos celulares y en el modelo de ratón(Thiagarajah *et al.*, 2004).

Para complementar el perfil farmacológico del CFTR en el espermatozoide testicular y corroborar su identidad como el mecanismo molecular responsable en parte, de las corrientes observadas en el espermatozoide, se aplicó inh-172, en la solución externa por perfusión. Los pulsos de voltaje utilizados en los registros electrofisiológicos son como en la **figura 7**. Este protocolo de estimulación reveló la activación de corrientes salientes y entrantes, las cuales se mantuvieron estables durante los pulsos de voltaje (**Fig. 14A**). Las corrientes salientes registradas fueron de mayor magnitud que aquellas observadas en los pulsos de voltaje negativos (**Fig. 14A y B**). Los valores de las corrientes al final de los pulsos de voltaje se emplearon para obtener la gráfica *I-V*, en presencia de las soluciones establecidas (**Fig. 14B**). Los experimentos mostraron que el db-AMPC (100 μM) incremento en promedio ~ 70 % las corrientes del espermatozoide en presencia de ATP (3 mM) en la solución de pipeta (**Fig. 14A y B**) (n=6). La relación *I-V* se muestra lineal (**Fig. 14B**), la corriente no es dependiente de tiempo y voltaje. Considerando que la corriente estimulada por el análogo del nucleótido es el 100%, el inh-172 (5 μM) inhibió ~ 60 % de la corriente en el espermatozoide (**Fig. 14A y B**), de manera parcialmente reversible, tal como lo muestra la **fig. 14A y B**. Es importante señalar que las concentraciones que inhiben al CFTR no inhiben a los canales de Cl⁻ regulados por volumen, CaCCs, K_{ATP}, así

como tampoco a los intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Ma *et al.*, 2002). Otro aspecto relevante es que el inh-172 inhibe mayoritariamente la corriente activada por el db-AMPC, lo cual sugiere fuertemente que la fracción de la corriente de Cl^- que es bloqueada por este inhibidor corresponde en su mayoría a la del CFTR, lo cual indica que el CFTR está funcionalmente activo en el espermatozoide testicular, bajo nuestras condiciones experimentales.

5.2.6 Dependencia a ATP de las corrientes de Cl⁻ estimuladas por db-AMPC en los espermatozoides testiculares

Una de las características que distinguen al CFTR es el requerimiento de ATP para la apertura del canal, similar al proceso que ocurre en los canales regulados por ligandos (Kaupp y Seifert, 2002). Estudios previos han demostrado la regulación del CFTR por ATP en células de epitelio respiratorio, así como en otros tipos celulares (Gadsby y Nairn, 1994). Estos resultados indican que la activación del CFTR requiere de una concentración determinada de ATP para su fosforilación, activando el transporte de Cl^- , sin comprometer funciones esenciales de la célula dependientes de ATP (Quinton y Reddy, 1992).

Para probar si el ATP estaba involucrado en la activación de las corrientes por db-AMPC, a continuación examinamos el efecto de la ausencia de ATP (lado intracelular) sobre las corrientes del espermatozoide. Los registros de las corrientes se obtuvieron de espermatozoides expuestos a la solución control. La activación de las corrientes de Cl^- se realizó mediante la aplicación del protocolo de voltaje descrito en la **figura 7**. Los resultados muestran que la adición de db-AMPC (100 μM) en la solución externa por perfusión, en ausencia de ATP en la solución de pipeta no generó la activación de las

corrientes **Fig. 15A y B (n=6)**. El resumen de los datos se muestra en la **figura 15A y B**. Durante el registro de las corrientes en presencia de db-AMPC (100 μ M) en la solución externa y en ausencia de ATP en la solución de interna, la adición de DPC (250 μ M), no causó efecto sobre las corrientes registradas a +100 mV (**Fig 15A**), mientras que a -80 mV causó una ligera inhibición de la corriente basal en el espermatozoide (**Fig. 15B**). El resumen de las corrientes en condiciones control (C), en presencia de db-AMPC (100 μ M) (A), y DPC (250 μ M) (A+I) lado extracelular, presencia (+ATP) y ausencia (-ATP) de ATP, de lado intracelular. Se ha descrito previamente que la estimulación del CFTR generada por AMPc es dependiente del ATP (Hwang *et al.*, 1994; Ikuma y Welsh, 2000). La **figura 15A y B** nos muestra que las corrientes de Cl⁻ de los espermatozoides testiculares reproducen este comportamiento.

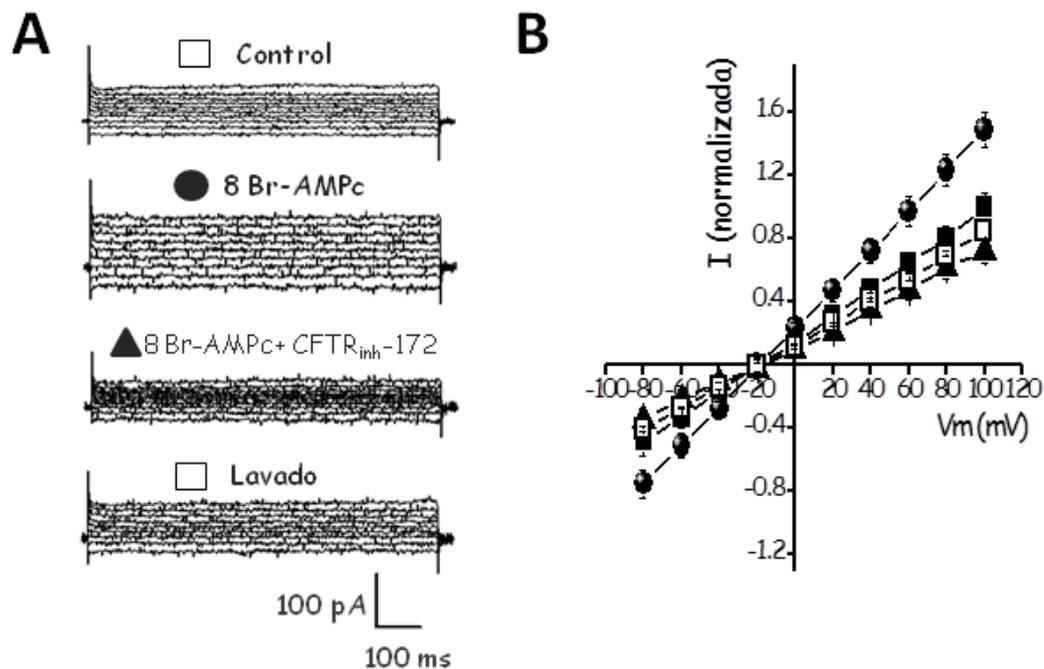


Figura 13: El CFTR_{inh}-172 inhibe las corrientes de Cl⁻ estimuladas por 8Br-AMPC.

A: La corriente registrada en la condición control como en la figura 10 (□ Control) se estimula por 8Br-AMPC (100 μM; ●8Br-AMPC) y es inhibida por CFTR_{inh}-172 extracelular (5 μM; ▲ 8Br-AMPC + CFTR_{inh}-172), la cual es parcialmente reversible (□ lavado). Las corrientes fueron estimuladas con el protocolo de voltaje descrito en la figura 7. **B:** Gráfica *I-V* de las corrientes en A. Los símbolos representan el promedio ± S.E.M.de 4 experimentos independientes; algunas barras son más pequeñas que los símbolos. Las corrientes en la curva *I-V* muestra datos normalizados con respecto al máximo de la corriente de Cl⁻ control a 100 mV.

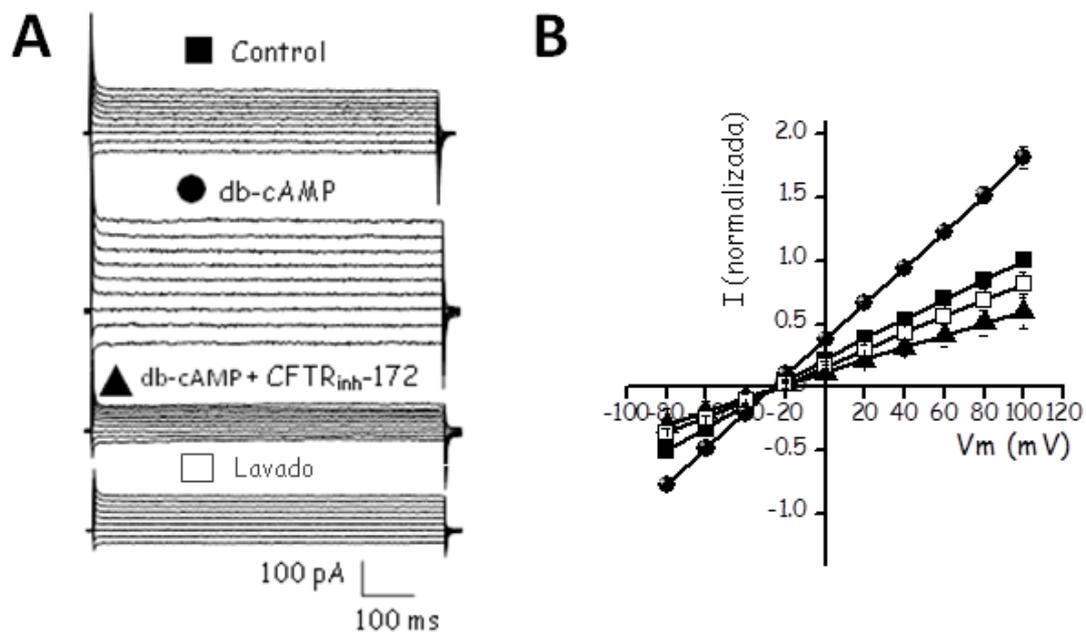


Figura 14: Inhibición por CFTR_{inh}-172, de las corrientes de Cl⁻ estimuladas por db-AMPC en espermatozoides testiculares.

A: Corrientes representativas evocadas por un protocolo de voltaje y soluciones de registro descritas en la figura 7 y 10, respectivamente. La corriente de Cl⁻ control (■ Control) se estimula de manera significativa por la adición de db-AMPC (100 μM; ● db-AMPC) e inhibida por CFTR_{inh}-172 extracelular (5 μM; ▲ db-AMPC + CFTR_{inh}-172) de manera parcialmente reversible (□ lavado). **B:** Gráfica *I-V* de las corrientes en A. Los símbolos representan el promedio ± S.E.M. de 6 experimentos independientes; algunas barras son más pequeñas que los símbolos. Las corrientes en la curva *I-V* muestra datos normalizados con respecto al máximo de la corriente de Cl⁻ control a 100 mV.

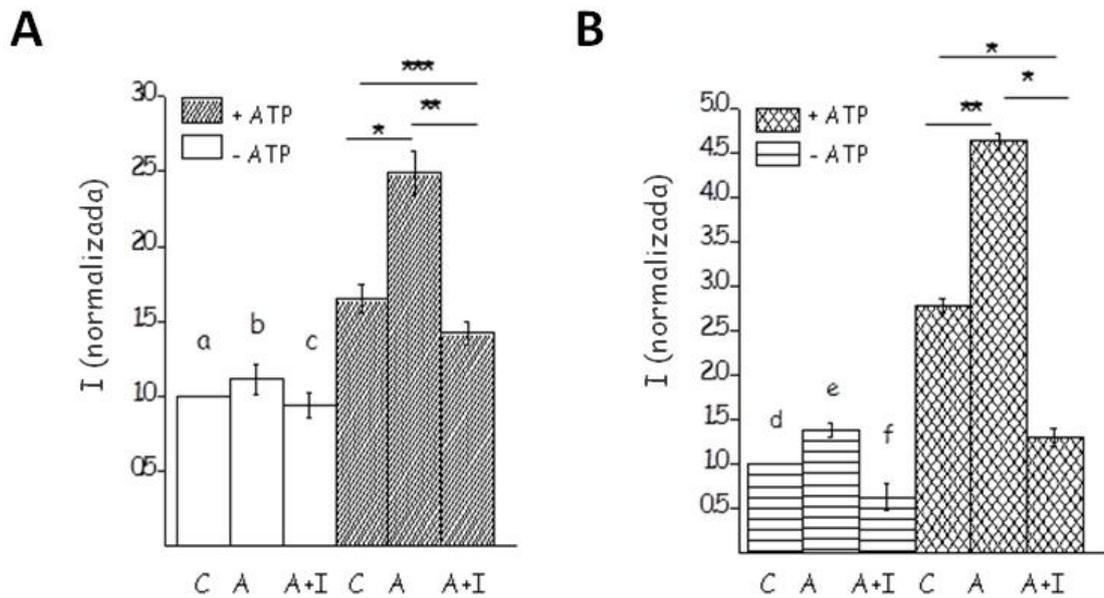


Figura 15: Dependencia a ATP intracelular de la corriente de Cl⁻ activada por db-AMPC en espermatozoides testiculares.

A y B: Comparación de las corrientes de Cl⁻ en presencia y ausencia de ATP. Las corrientes se obtuvieron aplicando el protocolo de voltaje y las condiciones iónicas que se describió en la figura 7 y 10, respectivamente. En presencia de ATP, las corrientes de Cl⁻ macroscópicas a 100 mV (**A**) y -80 mV (**B**) se activan por la aplicación de db-AMPC extracelular, las cuales se inhiben en presencia de DPC. De manera contraria, en ausencia de ATP, el db-AMPC y DPC, no tienen efecto sobre las corrientes. Las concentraciones utilizadas fueron: 100 μM db-AMPC (**A**), 100 μM db-AMPC + 250 μM DPC (**A+I**) en la condición control (**C**), en presencia (+ATP) y ausencia de (-ATP) (3 mM). Las corrientes se normalizaron con respecto al control correspondiente, en ausencia de ATP. Los símbolos representan el promedio ± S.E.M. de 6 experimentos independientes; algunas barras S.E.M. son más pequeñas que los símbolos. A, b y c son no significativos; * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.001$. Para (**B**) d, $P < 0.05$ y e, $P < 0.01$, f, n.s., no significativo; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

5.2.7 *Actividad funcional del CFTR en estado basal de los espermatozoides testiculares*

Debido a que el bloqueo por DPC de la corriente activada con db-AMPC ocurre por debajo del nivel basal de la corriente (**Fig. 10A y B**), consideramos la posibilidad de que el canal CFTR tuviera una actividad basal en el espermatozoide bajo las condiciones experimentales establecidas. Para profundizar en este estudio utilizamos a los inhibidores del CFTR, DPC e Inh-172 respectivamente, sobre la corriente de Cl⁻ en ausencia del análogo del nucleótido cíclico en nuestra condición control y en presencia de ATP en la solución de pipeta. Los inhibidores se aplicaron en la solución externa por perfusión.

Los registros de las corrientes se obtuvieron de espermatozoides expuestos a la solución control. La activación de las corrientes de Cl⁻ se realizó mediante la aplicación del protocolo de voltaje similar al de la **figura 7**. Los resultados muestran la activación de la corriente de Cl⁻ (**Fig. 16A-D**). Durante el registro de las corrientes obtenidas en condiciones control se observó que la adición de DPC (250 μM) e Inh-172 (2-5μM), respectivamente, también inhibieron una fracción significativa de la corriente control (21.8 ± 4%, n=5; 19.9 ± 4%, n=6, respectivamente) en el espermatozoide. El **panel E** de la **figura 16**, muestra el resumen de la inhibición de las corrientes de Cl⁻ en presencia de los inhibidores del CFTR, respectivamente, sobre las corrientes control de Cl⁻ a -80 mV para el DPC y a +100 mV para el CFTR_{inh-172}, respectivamente. Nuestros resultados demuestran la presencia funcional de un Canal de Cl⁻ sensible a CFTR_{inh-172} en el espermatozoide, lo que nos sugiere que dichas corrientes corresponden a la actividad de CFTR en estas células.

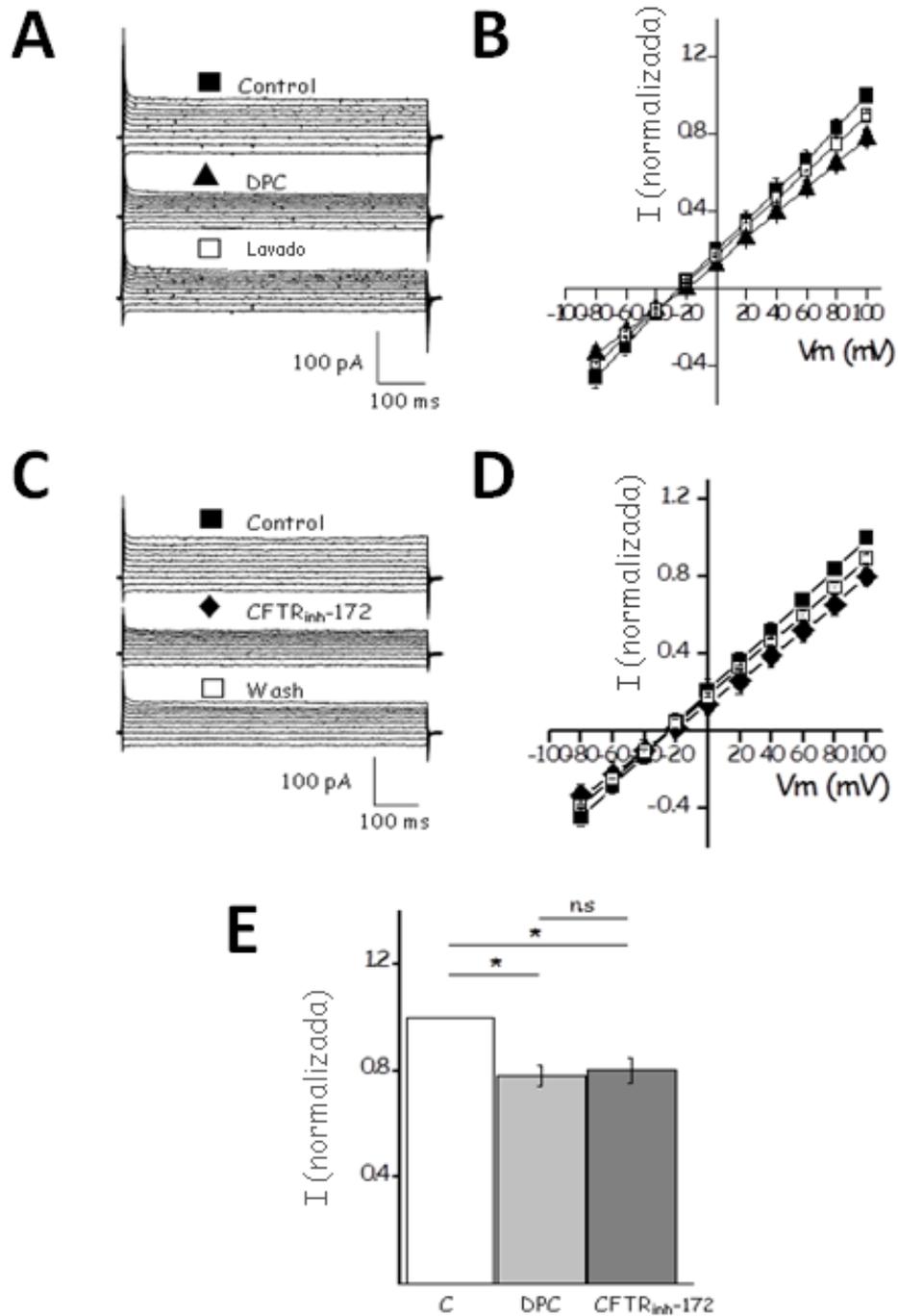


Figura 16: Los canales CFTR están parcialmente activos en espermatozoides testiculares.

A y C: Registros representativos de experimentos en espermatozoides en la configuración de célula unida, en condiciones control (■ Control) que muestran la inhibición de la corriente de Cl⁻ por DPC (250 μM) (▲ DPC) y CFTR_{inh}-172 (5

μM) (\blacklozenge CFTR_{inh}-172), respectivamente, de manera parcialmente reversible (\square lavado). **B y D:** Curvas *I-V* de las corrientes registradas en A y C. El protocolo de voltaje aplicado y la composición de las soluciones externa e interna son como en la figura 7 y 10, respectivamente. **E:** Resumen de la inhibición de las corrientes de Cl⁻ del espermatozoide por dos antagonistas del CFTR bien conocidos, DPC a -80 mV and CFTR_{inh}-172 a 100 mV. Control (C). Los símbolos representan el promedio \pm S.E.M. de 5 (en B) y 6 (en D) experimentos independientes; y algunas barras de S.E.M. son más pequeñas que los símbolos. Las corrientes en B, D y E se normalizaron con respecto a la corriente de Cl⁻ control a 100 mV. *, $p < 0.05$; n.s., no significativo.

5.2.8 Efecto del análogo de GMPc permeable (8Br-GMPc) sobre las corrientes de Cl⁻ en los espermatozoides testiculares

De acuerdo con estudios previos, la actividad del canal CFTR también es estimulada por GMPc, lo cual ocurre por la asociación directa del nucleótido cíclico con el canal, reportado en la expresión heteróloga del canal en ovocitos con IC₅₀ $\sim 0.3 \mu\text{M}$ (Sullivan *et al.*, 1995).

Para corroborar que la corriente registrada en los espermatozoides testiculares se debía a la activación de canales CFTR, se estudiaron los efectos de un análogo de GMPc permeable, 8Br- GMPc sobre las corrientes del espermatozoide. Para ello los registros de las corrientes se obtuvieron de espermatozoides expuestos a la solución control para posteriormente adicionar al medio extracelular el análogo del nucleótido permeable. La activación de las corrientes de Cl⁻ se realizó mediante la aplicación del protocolo de voltaje similar al de la **figura 7**. Los resultados muestran la activación de la corriente de Cl⁻ en presencia de $20 \mu\text{M}$ de 8Br- GMPc ($\sim 50\%$) (**Fig. 17A-D**) (n=6). Durante el registro de las corrientes estimuladas por 8Br- GMPc, se observó que la adición de DPC ($250 \mu\text{M}$) (**Fig. 17A y B**) y CFTR_{inh}-172 ($5 \mu\text{M}$) (**Fig. 17C y D**), respectivamente inhibieron una fracción significativa de la corriente ($\sim 60\%$) (n=6). La relación *I-V* se muestra lineal (**Fig. 17B y**

D). El efecto del bloqueo tanto por DPC como por CFTR_{inh}-172 sobre las corrientes activadas por 8Br-GMPc es parcialmente reversible tal como lo muestra la **Fig. 17A y C** (panel inferior), **B y D**. La **figura 17B y D**, nos muestra la relación *I-V* de la corriente de Cl⁻ estimulada por 8Br-GMPc extracelular, la inhibición de las corrientes por DPC y CFTR_{inh}-172, respectivamente después de activar con 8Br-GMPc, así como la recuperación parcial de las corrientes al lavar los inhibidores

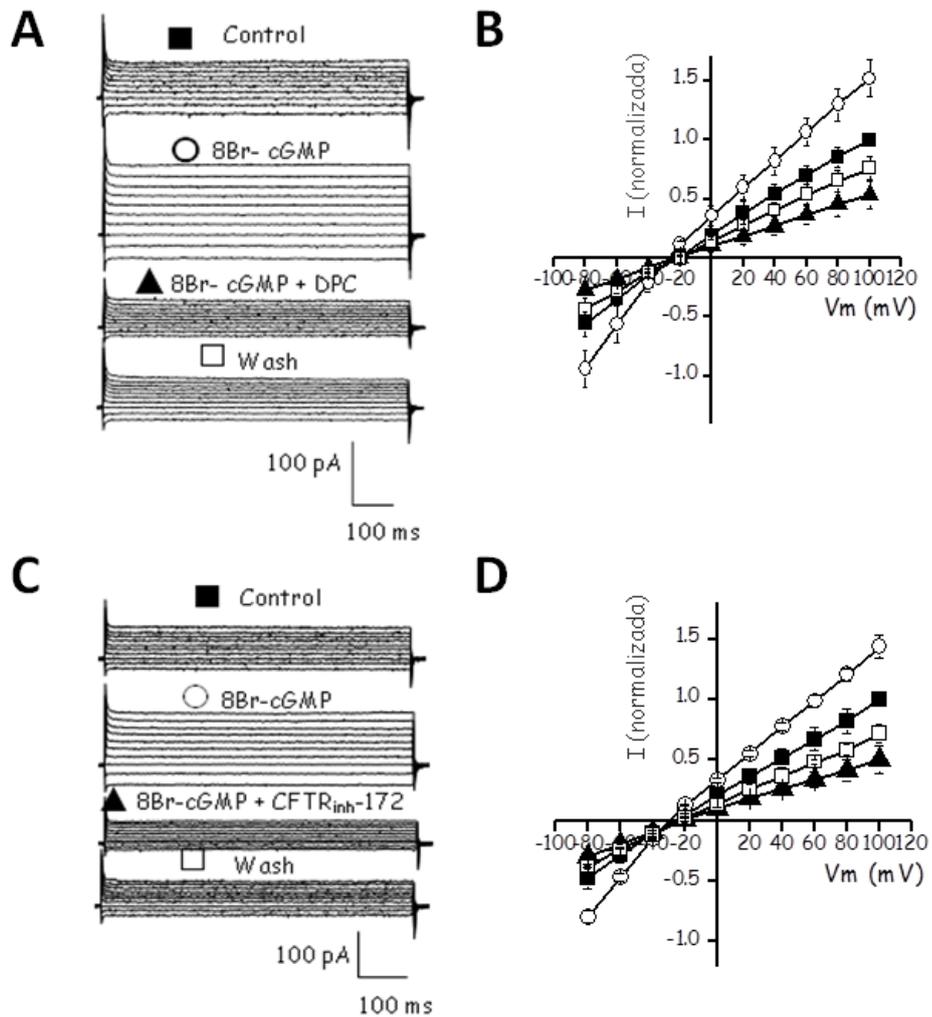


Figura 17: El DPC y CFTR_{inh}-172, bloquean las corrientes de Cl⁻ estimuladas por GMPc permeable (8Br-GMPc) en el espermatozoide testicular.

A: Registros representativos de corrientes de Cl⁻ antes (■ Control) y después de la aplicación de 8Br- GMPc (20 μM; ○ 8Br- GMPc), el cual activa a las corrientes que son bloqueadas por 250 μM de DPC (▲ 8Br- GMPc + DPC). El bloqueo fue parcialmente reversible (□ lavado). **B:** Curva *I-V* de las corrientes en A. **C:** El 8Br- GMPc estimula corrientes de Cl⁻ (○ 8Br- GMPc que también fueron significativamente inhibidas por 5 μM CFTR_{inh}-172 (▲ 8Br- GMPc + CFTR_{inh}-172) y este efecto, fue parcialmente reversible (□ lavado). **D:** Relación *I-V* de las corrientes en C. El protocolo de voltaje aplicado y las condiciones iónicas de registro fueron como en la figura 7 y 10, respectivamente. Los símbolos representan el promedio ± S.E.M. de 6 experimentos; algunas de las barras SEM son más pequeñas que los símbolos. Las corrientes en las gráficas *I-V* se normalizaron con respecto al máximo de la corriente de Cl⁻ control a 100 mV.

6.1.8 Efecto de la genisteína sobre las corrientes de Cl en los espermatozoides testiculares.

Otro de los compuestos reportados en la literatura que regula la actividad del CFTR en los diversos epitelios es la genisteína, la cual es uno de los más potentes isoflavonoides que inhibe específicamente la actividad de cinasas de tirosinas (PTK de “*Protein tyrosine kinase*”) (Akiyama *et al.*, 1987) al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR de “*Epidermal growth factor receptor*”), así como a proteínas que requieren de ATP (Akiyama *et al.*, 1987. La genisteína también es un inhibidor inespecífico de proteínas cinasas del tipo C (PKC de “*protein kinase C*) ($IC_{50} > 370 \mu M$) (Akiyama y Ogawara, 1991). En el caso de PTK y el receptor EGF, la inhibición es competitiva con ATP. La inhibición de la actividad o interacción enzimática con los sitios de asociación de otros blancos, aún no se ha determinado del todo. Numerosos estudios han propuesto que la genisteína estimula (a baja concentración 5-60 μM) al canal CFTR nativo, así como al canal expresado en ovocitos de *Xenopus*, fibroblastos, células epiteliales, células cardíacas y células de la glándula rectal de tiburón (Illek *et al.*, 1995; Sears *et al.*, 1995; Diener y Hug, 1996; Forrest, 1995; Shuba *et al.*, 1996). Por otro parte, la genisteína, también ejerce un efecto adicional en el canal CFTR, ya que una alta concentración de este isoflavonoide ($> 80 \mu M$), inhibe al canal (Weinreich *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1999; Obayashi *et al.*, 1999) Esto se ha interpretado como la presencia de un segundo sitio de unión de baja afinidad a genisteína, lo cual debiera reducir la razón de apertura del canal. En nuestro grupo se había demostrado, de manera indirecta, que la genisteína activa al CFTR en el espermatozoide maduro de ratón (Hernández-González *et al.*, 2007)

Tomando como base las observaciones previas, decidimos estudiar el posible efecto tanto estimulante como inhibitorio respectivamente, de la genisteína sobre las corrientes de Cl⁻ en el espermatozoide testicular. Los pulsos de voltaje utilizados en los registros electrofisiológicos fueron como los de la **figura 7**. Este protocolo de estimulación reveló la activación de corrientes salientes y entrantes, las cuales se mantuvieron estables durante los pulsos de voltaje (**Fig. 18A y C**). Las corrientes salientes registradas fueron de mayor magnitud que aquellas observadas en los pulsos de voltaje negativos (**Fig. 18A-D**). Los valores de las corrientes al final de los pulsos de voltaje se emplearon para obtener las gráficas *I-V*, en presencia de las soluciones establecidas (**Fig. 18B y D**). Los resultados muestran la activación de la corriente de Cl⁻ (de $54 \pm 0.5\%$) (a -80 mV) al agregar genisteína (20 μ M) en la solución externa por perfusión y la adición de ATP (3 mM) en la solución de pipeta (**Fig. 18A y B**). La aplicación de 250 μ M de DPC sobre las corrientes estimuladas por genisteína, genera la inhibición ($\sim 56\%$; a -80 mV), de dichas corrientes (**Fig. 18A y B**), de manera parcialmente reversible (**Fig. 18A y B**) (n=6). La curva *I-V* es lineal (**Fig. 18B**) es decir, la corriente no es dependiente de voltaje y tiempo. De manera interesante, concentraciones más altas de genisteína (50 μ M) tienen menor efecto estimulante sobre dichas corrientes (**Fig. 18C y D**), a 50 μ M, la corriente de Cl⁻ se estimula en un $38 \pm 0.7\%$ (a -80 mV), la cual es inhibida por DPC (250 μ M) ($\sim 40\%$; a -80 mV) (**Fig. 18C y D**) de forma parcialmente reversible (**Fig. 18C y D**) (n=6). Estos resultados nos indican que la magnitud de la estimulación de la corriente de Cl⁻ por genisteína, depende de su concentración. Como se mencionó con anterioridad, al parecer hay dos sitios de unión para genisteína, uno de alta afinidad que estimula y uno de menor afinidad que inhibe al CFTR. Estos resultados son consistentes con los datos reportados para la respuesta del CFTR a genisteína.

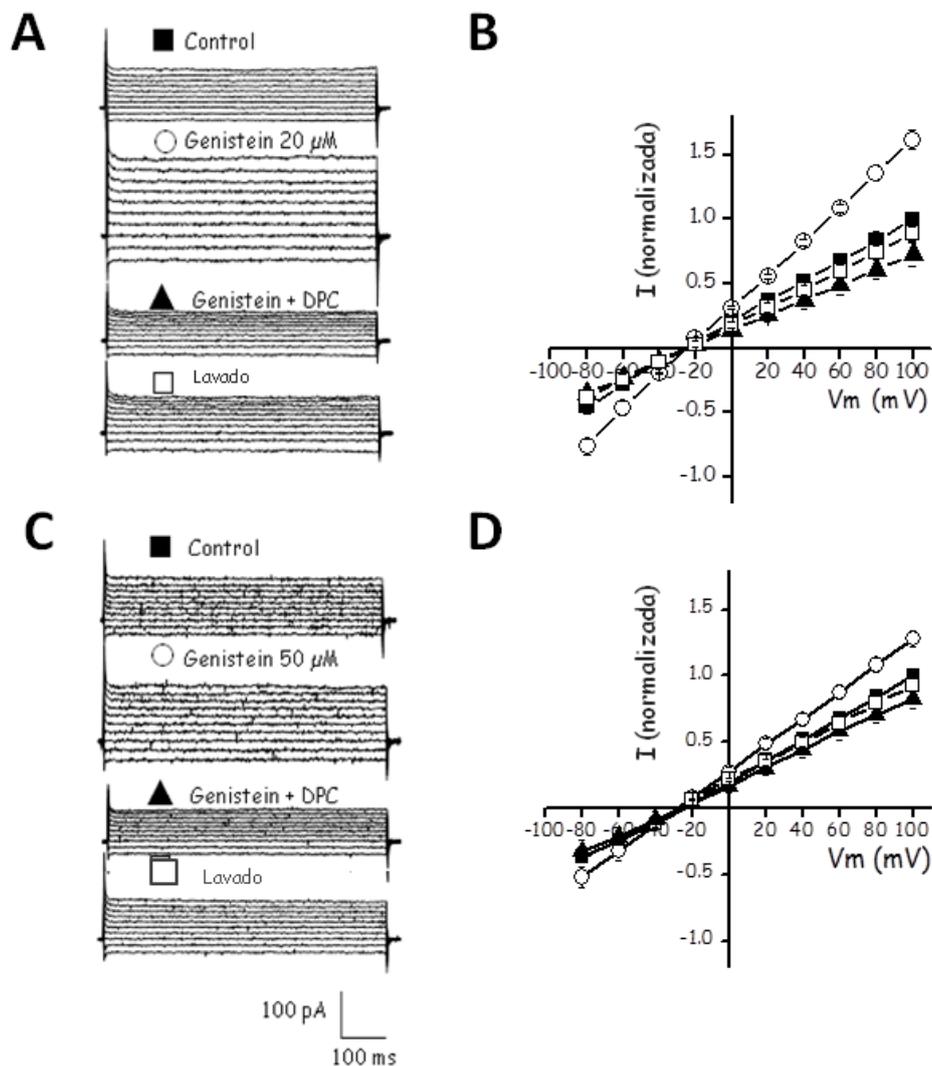


Figura 18: Estimulación por genisteína, de las corrientes de Cl^- en espermatozoides testiculares.

A: Corrientes obtenidas de espermatozoides expuestos a una solución externa e interna como en la figura 10. La genisteína $20 \mu\text{M}$ (\circ Genisteína) potencia a las corrientes de Cl^- con respecto a la corriente control (\blacksquare Control). El DPC inhibió la corriente estimulada ($250 \mu\text{M}$; \blacktriangle Genisteína + DPC) de manera reversible (\square lavado). **B:** Gráfica *I-V* de las corrientes en A. **C:** De manera notable, una concentración mayor del isoflavonoide (\circ Genisteína; $50 \mu\text{M}$) estimulando la corriente en menor proporción que lo observado con $20 \mu\text{M}$ (A). El DPC ($250 \mu\text{M}$) generó la inhibición de las corrientes (\blacktriangle Genisteína + DPC) de forma parcialmente reversible (\square lavado). **D:** Gráfica *I-V* de las corrientes en C. Las corrientes se obtuvieron aplicando el protocolo de voltaje y las condiciones iónicas como en la figura 7 y 10, respectivamente. Los símbolos representan el promedio \pm S.E.M. de 6 experimentos independientes; algunas barras de S.E.M. son más pequeñas que los símbolos. Las corrientes en las curvas *I-V* son normalizadas con respecto al máximo de la corriente de Cl^- control a -80 mV .

El db-AMPC, DPC, CFTR_{inh-172} y genisteína, respectivamente se prepararon como solución madre en dimetilsulfóxido (DMSO) y se almacenaron a -20° C hasta su uso. La concentración final de DMSO fue menor a 0.001%, y no causó efecto alguno en las corrientes ($p > 0.05$) registradas en el espermatozoide (**Fig. 19**). Rutinariamente se utilizaron las alícuotas de la solución madre del compuesto antes mencionado para preparar la solución externa a la concentración final necesaria para cada experimento, aplicándola posteriormente a la cámara de registro por perfusión. Para descartar la posibilidad de que el vehículo (DMSO) en el que se prepararon los diversos compuestos mencionados previamente, alteraran por si mismos las corrientes, se determinó su efecto sobre estas a la máxima concentración usada.

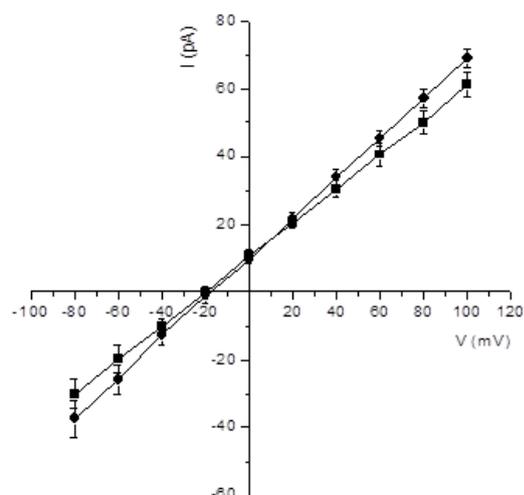


Figura 19: El dimetilsulfóxido no afecta a las corrientes de Cl⁻ en espermatozoides testiculares.

Gráfica *I-V* de las corrientes obtenidas de espermatozoides expuestos a una solución de Cl⁻ control, externa e interna, respectivamente como en la figura 10 (■). La presencia del dimetilsulfóxido (DMSO) (●), no generó efectos en las corrientes control. El protocolo de voltaje fue igual al descrito en la Fig. 7. Los símbolos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; algunas barras SEM son más pequeñas que los símbolos. Las corrientes de la gráfica *I-V* muestra datos normalizados con respecto al máximo de la corriente de Cl⁻ control a 100 mV. Los datos no representan una diferencia estadística con respecto al control ($p > 0.05$).

6.1.9 Corrientes de espermatozoides testiculares del ratón nulo en CFTR ($\Delta F508$ -CFTR).

Por último, para profundizar en la determinación de la identidad molecular responsable de las corrientes de Cl⁻ estimuladas por el análogo de AMPc permeable e inhibidas por el CFTRinh-172, exploramos si estas corrientes estaban presentes en los espermatozoides testiculares del ratón $\Delta F508$ -CFTR, donde hay pérdida de la

función del canal. Como se mencionó anteriormente, la delección de la fenilalanina 508 ($\Delta F508$), es la mutación más común en la FQ. Esta mutación, afecta el plegamiento del canal y consecuentemente su procesamiento biosintético y endocítico, lo que retiene al canal en el retículo endoplásmico evitando que llegue a la membrana plasmática (Lukacs y Verkman, 2012).

Para probar si el CFTR era responsable de la corriente estimulada con el análogo de AMPc, a continuación examinamos el efecto del db-AMPc sobre la corriente registrada en presencia de ATP en la solución de pipeta. Los pulsos de voltaje utilizados en los registros electrofisiológicos son similares a la **figura 7**. El protocolo de estimulación manifiesta la activación de corrientes salientes y entrantes, las cuales se mantuvieron estables durante los pulsos de voltaje (**Fig. 20A y C**). Las corrientes salientes registradas fueron de mayor magnitud que aquellas observadas en los pulsos de voltaje negativos (**Fig. 20A-C**). Tal como anticipábamos, las corrientes de Cl^- de los espermatozoides del $\Delta F508$ -CFTR, donde hay pérdida funcional del CFTR, no son estimuladas por 100 μM de db-AMPc ni inhibidas por 5 μM de CFTR_{inh}-172 (**Fig. 20A y B**) (n=3). De manera contraria, en los espermatozoides de los ratones heterocigotos (con fenotipo silvestre), muestran la activación de las corrientes de Cl^- al agregar db-AMPc (100 μM), así como la inhibición por la adición de CFTR_{inh}-172 (5 μM) de las corrientes estimuladas (**Fig. 20C y D**) (n=3). En conjunto, estos resultados son evidencia de que el canal CFTR esta funcionalmente presente en los espermatozoides testiculares del ratón.

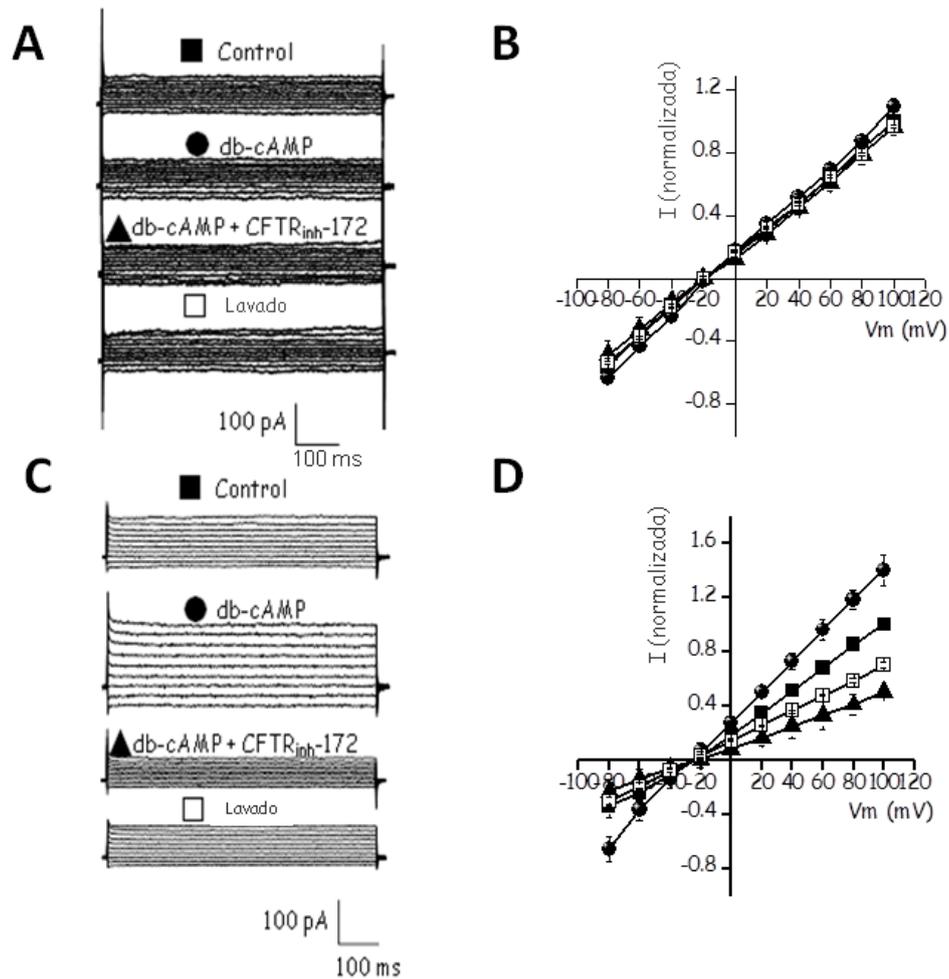


Figura 20: Las corrientes aniónicas de los espermatozoides testiculares del ratón nulo en CFTR- Δ F508 no son estimuladas por db-AMPC ni inhibidas por CFTR_{inh}-172.

A: Las corrientes de Cl^- se obtuvieron aplicando el protocolo de voltaje como en la figura 7, a espermatozoides obtenidos del ratón mutante CFTR- Δ F508 bañado con soluciones de registro de Cl^- control (145 mM NMDG-Cl extracelular/35mM NMDG-Cl intracelular). Las corrientes de Cl^- macroscópicas se registraron antes (■ Control) y después de la adición de 100 μM de db-AMPC (● db-AMPC), posteriormente aplicamos 5 μM del CFTR_{inh}-172 (▲ db-AMPC + CFTR_{inh}-172) y finalmente lavamos el inhibidor (□ lavado). **B:** Gráfica *I-V* de las corrientes en A. **C:** Las corrientes obtenidas de los espermatozoides de ratones heterocigotos, muestran que el db-AMPC estimula a las corrientes de Cl^- (● db-AMPC), las cuales son significativamente inhibidas por 5 μM del CFTR_{inh}-172 (▲ db-AMPC + CFTR_{inh}-172) y este efecto fue parcialmente reversible (□ lavado). **D:** Relación *I-V* de las corrientes registradas en C. Las soluciones de pipeta contienen ATP. Estos resultados demuestran que el componente de la corriente de Cl^- activado por el AMPC permeable e inhibido por CFTR_{inh}-172, corresponde al canal CFTR activo. Los símbolos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; algunas barras S.E.M. son más pequeñas que los símbolos. Las

corrientes de las gráficas *I-V* se normalizaron con respecto a la corriente de Cl⁻ control a 100 mV.

6.2 Corrientes del CFTR en los espermatozoides epididimales

Reciente evidencia ha indicado que canales iónicos como los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Cavs), tipo 3(Cav3s) registrados en el espermatozoide testicular de ratón (Martínez-López *et al.*, 2011) no se pueden detectar en espermatozoides más maduros (Ren y Xia, 2010; Kirichok y Lishko, 2011). Para determinar si las corrientes de Cl⁻ tipo CFTR registradas en los espermatozoides testiculares son funcionales en los espermatozoides con mayor madures, procedimos a registrar las corrientes en espermatozoides obtenidos del epidídimo. La **figura 21** muestra corrientes registradas con soluciones externa e interna, idénticas a las de la figura 11A y B (la solución de pipeta contiene 3 mM de ATP y 60 nM de [Ca²⁺]), utilizadas para caracterizar las corrientes del CFTR en los espermatozoides testiculares, en presencia de AN (50 µM). Para ello se aplico el protocolo de voltaje similar al de la **figura 7**. Las corrientes fueron significativamente estimuladas por db-AMPC (63 ± 5% a +100 mV) e inhibidas por CFTR_{inh}-172 en todos los potenciales (71 ± 3% a +100 mV) (**Fig. 21A-C**) (n=4). Esta inhibición fue parcialmente reversible (81 ± 4%) (**Fig. 21A, panel inferior y B**). Estos experimentos demuestran que hay corrientes de Cl⁻ en los espermatozoides epididimales que son estimuladas por db-AMPC y bloqueadas por CFTR_{inh}-172, de manera similar a aquellas obtenidas en los espermatozoides testiculares con características consistentes con la presencia del canal CFTR en espermatozoides más maduros. Estos hallazgos indican la presencia de canales CFTR funcionales que se

conservan en el espermatozoide maduro durante su tránsito a partir del testículo hasta el epidídimo. La **figura 21D** muestra la curva $I-V$ correspondiente a la resta de la corriente estimulada con db-AMPC y sensible al CFTR_{inh-172}, la cual tiene características de la corriente del tipo CFTR. El **panel C** de la **figura 21**, muestra el resumen de la activación e inhibición de las corrientes de Cl⁻ en presencia del agonista y antagonista del CFTR, respectivamente, sobre las corrientes control de Cl⁻ a +100 mV.

Por lo tanto, como no pudimos detectar estimulación por db-AMPC o inhibición por CFTR_{inh-172} en los espermatozoides testiculares del ratón ΔF508-CFTR, donde hay pérdida de la función del canal, estos resultados corroboran que la entidad molecular responsable de la conducción de las corrientes de Cl⁻ en nuestras condiciones experimentales es CFTR y además, refuerzan la probabilidad de que las corrientes del CFTR funcional se preserven en los espermatozoides epididimales del ratón silvestre. Además, estos resultados son consistentes con otros datos funcionales que indican que los canales CFTR juegan un papel durante la capacitación (Guggino y Stanton, 2006; Wertheimer *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Chávez *et al.*, 2012; Escoffier *et al.*, 2012).

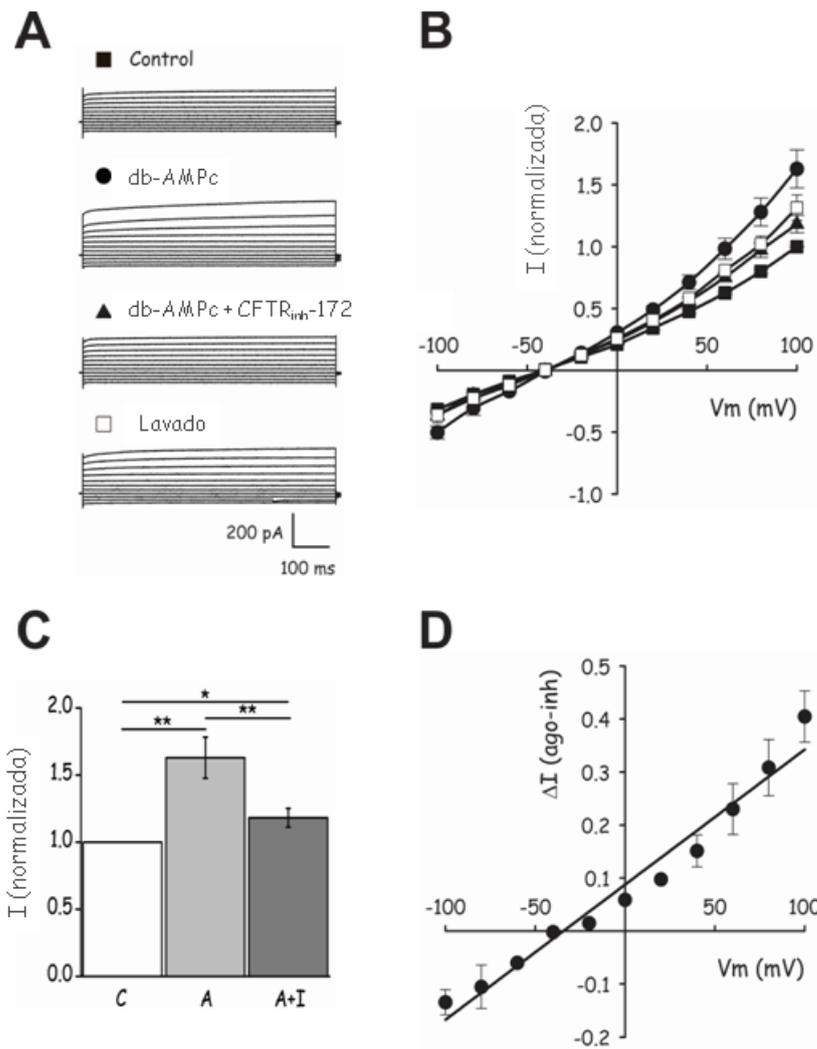


Figura 21: Los canales CFTR son funcionales en espermatozoides epididimales

A: El db-AMPC extracelular (100 μM ; ● db-AMPC) estimula significativamente las corrientes de Cl^- control (■ Control) y el $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ extracelular a concentraciones que inhiben el CFTR (5 μM ; ▲ db-AMPC + $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$), redujo las corrientes estimuladas (□ lavado). Los efectos del agonista y del $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ se registraron con solución interna y externa idéntica a la fig. 11A y B (Ca^{2+} libre a ~ 60 nM en la solución de pipeta), utilizadas para caracterizar las corrientes del CFTR en los espermatozoides testiculares, en presencia de AN (50 μM), para eliminar la contribución de otros canales de Cl^- . **B:** Gráfica I - V de las corrientes en A. **C:** Resumen de la activación e inhibición de las corrientes de Cl^- en presencia del agonista y antagonista del CFTR, respectivamente, sobre la corriente de Cl^- control a 100 mV en espermatozoides epididimales. **D:** Curva I - V obtenida después de realizar la substracción de la corriente activada con db-AMPC (●) menos la corriente inhibida por $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ (▲) en A. Los símbolos representan el promedio \pm S.E.M. de 4 experimentos independientes; algunas barras S.E.M. son más pequeñas que los símbolos. Las

corrientes se normalizaron con respecto a la corriente de Cl^- estimulada a 100 mV. Control (C), agonista (A) e inhibidor (A+I). ** $P < 0.001$; * $P < 0.05$.

6 DISCUSIÓN

Previo a la fecundación, los espermatozoides deben adquirir su capacidad de fecundar al óvulo a través de un proceso de maduración (la capacitación) en el tracto reproductor femenino. En este proceso, la activación de una vía dependiente de AMPc/PKA juega un papel determinante al inducir un incremento en la fosforilación de tirosinas, los cuales son indispensables para la capacitación (Arcelay et al., 2008; Krapf et al., 2010; Visconti *et al.*, 1995; Visconti *et al.*, 1995). Como se mencionó anteriormente, la hiperpolarización del E_m es un evento clave en la capacitación de los espermatozoides (Suarez, 1996; Yanagimachi, 1994a, b) de algunas especies de mamífero como bovino, ratón (Arnoult et al., 1996; Arnoult et al., 1999; Demarco et al., 2003; Muñoz-Garay et al., 2001; Zeng et al., 1995), caballo (McPartlin *et al.*, 2011) y humano (López-González et al., 2014). Este último trabajo de Treviño y colaboradores (2014) reporto una subpoblación de espermatozoides de humano que se hiperpolarizan en el medio capacitante para la fecundación *in vitro*, mediante la técnica de citometría de flujo (López-González et al., 2014).

Se ha demostrado que previo a la capacitación, el espermatozoide de ratón tiene un E_m de reposo de aproximadamente -35 mV; este potencial relativamente depolarizado sugiere que los iones Na^+ contribuyen al establecimiento del E_m de reposo del espermatozoide. Esta depolarización del E_m inducida por Na^+ es sensible a amilorida, un inhibidor específico de ENaCs. Más aún, la sustitución de Na^+ por cationes no permeables hiperpolariza el E_m del espermatozoide. Estos resultados son consistentes

con la hipótesis de que la hiperpolarización que acompaña a la capacitación del espermatozoide de ratón se debe en parte, al cierre de ENaCs (Hernández-González et al., 2006).

El CFTR, canal de Cl⁻ regulado por ATP y AMPc/PKA esta mutado en pacientes con FQ. Este canal de Cl⁻ desempeña un papel crucial en el transporte del Cl⁻ y HCO₃⁻ en diversos tipos celulares teniendo intercomunicaciones distintas con otras proteínas como ENaCs, intercambiadores Cl⁻/HCO₃⁻ y el cotransportador Na⁺/HCO₃⁻ para el control del transporte iónico (revisado en Riordan, 2005). El CFTR se ha detectado claramente en la pieza media y la región post-acrosomal en el espermatozoide de ratón, cobayo, y humano. Las herramientas farmacológicas y los ensayos funcionales indirectos indican que el CFTR participa en la capacitación y posiblemente en la hiperactivación, la RA y en la fecundación (Hernández-González *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Visconti *et al.*, 2011).

Las mediciones de potencial de membrana en espermatozoides de ratón han demostrado que el CFTR es activado por AMPc y esta activación podría generar el cierre de los canales ENaC, como se ha observado en otros tipos celulares entre los que se encuentran las células epiteliales de vías respiratorias, colon e intestino (Kunzelmann *et al.*, 1996; Ecke *et al.*, 1996), así como en expresión heteróloga de ENaC y CFTR en ovocitos (Briel *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1999). Más aún, en epitelios de vías respiratorias de pacientes con FQ, la ausencia de la regulación negativa de ENaC por mutantes de CFTR (p.ej. G551D), resulta en el transporte anómalo de Na⁺ (revisado en Briel et al., 1998; Kunzelmann *et al.*, 2000). Sin embargo, la hipótesis de que la activación de CFTR regula negativamente a ENaC en el espermatozoide de ratón, se sustenta en los datos que indican que la activación de CFTR por genisteína

hiperpolariza el E_m (Hernández-González et al., 2007) y disminuye la $[Na^+]_i$ (Escoffier et al., 2012). De manera interesante, experimentos de “wester blot” e inmunofluorescencia muestran que tanto CFTR como la subunidad α de ENaC se localizan en la pieza media del espermatozoide de ratón (Hernández-González et al., 2006; Hernández-González et al., 2007).

Hasta el momento, poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares mediante los cuales CFTR regula a ENaC. Sin embargo, se han propuesto algunos mecanismos que tratan de explicar la interacción de ambas proteínas: Interacción directa de CFTR con la subunidades de ENaC; interacción indirecta entre ellos; comunicación a través de elementos del citoesqueleto y la participación de algunos dominios de CFTR; así como la regulación de ENaC a través de la $[Cl^-]_i$ mediada por CFTR. A manera de resumen, la interacción directa de CFTR con las subunidades de ENaC plantea que el canal CFTR interactúa con una o más de las subunidades que conforman a ENaC (α , β , γ y δ), regulando así, negativamente su actividad (Bakhrom et al., 2009). Así lo muestra el trabajo electrofisiológico del grupo de Ismailov y colaboradores (2000), quienes mediante registros de canal unitario de diferentes combinaciones de las subunidades de ENaC (β -ENaC, α -ENaC) y CFTR en bicapas lipídicas (Berdiev et al., 2000), observan que CFTR inhibe a un canal sensible a amilorida, modulando su proceso de apertura y cierre (“gating”). Los ENaCs son proteínas heteromultiméricas que pueden estar conformadas por la combinación de las cuatro subunidades, donde las subunidades ENaC- α y ENaC- δ están involucradas directamente en la formación del poro de conducción del canal (Kellenberger y Schild, 2002; Alvarez de la Rosa et al., 2000). Además, se ha propuesto que estas subunidades (ENaC- α y ENaC- δ) pueden formar

complejos con las subunidades ENaC- β y ENaC- γ , modificando las propiedades del canal (Hernández-González *et al.*, 2006). Más aún, experimentos de co-inmunoprecipitación muestran que ENaC y CFTR interactúan físicamente (Berdiev *et al.*, 2000). Sin embargo, esto no descarta la participación de proteínas adaptadoras o de conexión que formen un complejo CFTR/ENaC. También, se ha confirmado este tipo de interacción entre los dos canales iónicos mediante estudios de interacción con diferentes dominios de CFTR (NBD1 y PDZ) y la subunidad ENaC- α , mediante la técnica de doble híbrido en levadura (técnica de biología molecular utilizada para detectar interacción entre dos proteínas) (Fields y Song, 1989) (Kunzelmann *et al.*, 1997). Los datos de este estudio sugieren que el NBD1 de CFTR posee un sitio regulatorio, específico de este canal (este sitio no está presente en otros miembros de la familia ABC), que regula negativamente a ENaC. Además, se ha especulado que este dominio regulatorio también es necesario para mediar las interacciones de CFTR con otras proteínas de membrana (Briel *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1999).

Para validar la interacción directa entre ambos canales, se han empleado técnicas como la reconstitución de la fluorescencia o el uso de la transferencia de energía de resonancia de FOSTER (FRET, por sus siglas en inglés) o la reconstitución de la ubiquitina en levaduras de las proteínas EnaC y CFTR, las cuales se fusionaron a la proteína verde fluorescente (GFP; por sus siglas en inglés) y a la proteína rojo cerezo fluorescente (“cherry”), respectivamente, donde se observa una clara restricción de expresión de los canales iónicos en la membrana plasmática así como un intenso solapamiento de las dos proteínas marcadas cuando se coexpresan. Sin embargo, la colocalización de los dos fluoróforos únicamente posiciona a los canales en la misma área (en un rango de 100-500 nm de distancia la una de la otra), sin que ocurra necesariamente una interacción

directa (Berdiev *et al.*, 2000). Un análisis más detallado de la posible interacción de ENaC y CFTR se ha realizado mediante la técnica de recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (fluorescence resonance energy transfer; por sus siglas en inglés “FRET”) (Förster, 1949) . Los resultados de esta serie de experimentos coloca a estos canales en una región de 10 nm (el uno del otro) en células transfectadas, lo cual es compatible con la hipótesis de que ENaC y CFTR están en cercanía próxima y podrían interactuar físicamente (revisado en Berdiev *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha propuesto la interacción indirecta entre estos canales a través de elementos del citoesqueleto. Esta segunda posibilidad sugiere que CFTR y ENaC se asocian con elementos del citoesqueleto principalmente actina, asociados a la membrana plasmática (Cantiello, 1996; Berdiev *et al.*, 2000). Esta interacción podría funcionar como un mecanismo de control dual, distribuyendo espacialmente los canales en la membrana apical de las células epiteliales y regulando la actividad de ambos canales (Kunzelmann *et al.*, 2000). De manera interesante, en algunas células epiteliales se ha observado la activación de ENaC por el incremento en la [AMPc]_i mientras que en ovocitos que expresan ENaCs, la presencia de este compuesto no tiene efecto sobre la actividad del canal (Garty y Palmer, 1997). La expresión variable de algunas de las proteínas reguladoras así como de proteínas de asociación a CFTR y ENaC al citoesqueleto, expresadas en diferentes tejidos (p. ej. vías respiratorias, colon y ducto sudoríparo), podrían explicar la regulación tejido-específico de ENaC vía CFTR (Stutts *et al.*, 1997), lo que sugiere una contribución adicional de proteínas accesorias a este mecanismo de regulación. Por otra parte, la interacción al menos indirecta entre CFTR y ENaC es mediada vía NHERF-1, el cual podría facilitar la regulación recíproca entre ambos canales (Guggino y Stanton, 2006).

Por último, en otros sistemas (König *et al.*, 2001) se ha demostrado que CFTR inhibe a ENaC a través de la $[Cl^-]_i$ (Stutts *et al.*, 1995). Los resultados de una serie de experimentos muestran que la activación de CFTR (coexpresado con ENaC en ovocitos) causa un incremento en la $[Cl^-]_i$ (de 5 a 105 mM), lo cual inhibe a ENaC de manera reversible. Además, sus resultados sugieren que la inhibición de ENaC no es exclusiva de CFTR, si no que también podría deberse, en parte al incremento en la $[Cl^-]_i$ generada por otra entidad molecular (p.ej. Canal de Cl^- dependiente de voltaje, ClC-0). De igual manera, los datos de Kunzelmann y colaboradores (1998) sugieren la participación de Cl^- en la inhibición de ENaC (Briel *et al.*, 1998). Así, se puede especular que el Cl^- podría contribuir en parte, a la inhibición de ENaC. Sin embargo, hasta el momento no hay evidencia directa de que CFTR y ENaC interaccionen mediante esta modalidad en el espermatozide.

Por lo tanto, algunos de los resultados obtenidos en el estudio del mecanismo de interacción entre ENaC y CFTR mediante distintas técnicas, sugieren una interacción física directa entre estos canales. Sin embargo, los datos no descartan la posibilidad de la existencia de un complejo ENaC/CFTR unido por medio de proteínas adaptadoras o de conexión. Mientras que los experimentos realizados con FRET señalan que estos canales se encuentran muy cercanos uno respecto al otro (~ 10 nm), es probable que la interacción entre ENaC y CFTR sea también mediada por otras proteínas y no únicamente, por una interacción directa entre ambos canales. Más aún, suponiendo que la comunicación entre ENaC y CFTR sea resultado de una interacción directa, esto no excluye la participación de otro tipo de interacción más compleja mediada por proteínas de señalización o iones. Considerando la información disponible hasta el momento, acerca de la interacción de CFTR y ENaC, cada vez se aporta más evidencia de que esta

regulación podría involucrar un macro-complejo de señalización dinámico modulado a su vez por interruptores moleculares que incluyen a las proteínas con dominios PDZ, como se ha reportado en diversos tipos celulares.

Recientemente, resultados en nuestro laboratorio y de otro grupo han mostrado que el Cl^- es esencial para la capacitación. De hecho, la sustitución de Cl^- con aniones no permeables (p.ej. gluconato o metanosulfonato), inhibe el incremento de la fosforilación en tirosinas e hiperpolarización del E_m asociados a capacitación (Hernández-González *et al.*, 2007; Wertheimer *et al.*, 2008). Resultados previos de nuestro laboratorio, indican que el inhibidor de CFTR, DPC bloquea la hiperpolarización asociada a capacitación en el espermatozoide de ratón; la activación de CFTR por genisteína en medio no capacitante, induce hiperpolarización del E_m ; y CFTR esta presente en el espermatozoide maduro. Por lo que proponemos que la activación de la vía AMPc/PKA durante la capacitación estimula a CFTR y esta estimulación es acoplada a la inhibición del transporte de Na^+ vía ENaC.

Nuestros resultados sugieren que el CFTR funcional es necesario para el incremento de la $[\text{Cl}^-]_i$ y la hiperpolarización que acompañan a la capacitación (Hernández-González *et al.*, 2007). Estos cambios de permeabilidad son necesarios para que se lleve a cabo el incremento de HCO_3^- intracelular, el cual estimula a la adenilato ciclasa soluble, un evento crucial para la capacitación (revisado en Visconti *et al.*, 2011). El HCO_3^- es un anión requerido para la capacitación. Se ha establecido y propuesto que el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ contribuye de manera significativa al incremento inicial del HCO_3^- intracelular (Demarco *et al.*, 2003). Además, el HCO_3^- podría ingresar a la célula a través del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Zeng *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2009; Visconti *et al.*, 2011) y del CFTR, como se ha observado en otros tipos celulares (Ishiguro *et al.*,

2009; Yang *et al.*, 2009), y previamente ya propuesto en el espermatozoide (Chen *et al.*, 2009).

El hecho de que el CFTR se detecte en la región postacrosomal es consistente con reportes que sugieren su participación en la RA y fecundación de los espermatozoides (Li *et al.*, 2010). Sin embargo, experimentos realizados en el sistema de ratón con DPC y CFTR_{inh}-172, bajo distintas condiciones, indican que la inhibición ocurre durante la capacitación del espermatozoide y no así durante la RA. Además, no se encontraron efectos en la regulación del incremento en la fosforilación de tirosinas asociada a la capacitación (Hernández-González *et al.*, 2007; Wertheimer *et al.*, 2008). Sin embargo, la ausencia de un efecto del antagonista de CFTR, CFTR_{inh}-172 sobre la RA en los espermatozoides de ratón contrasta con la inhibición observada de la RA inducida por ZP3 en los espermatozoides de humano, lo que sugiere la participación de CFTR en la RA (Li *et al.*, 2010). Una posible explicación de estos resultados contrastantes podría deberse a la utilización de diferentes inhibidores y a los distintos tiempos de incubación a los que los espermatozoides fueron expuestos durante la RA. En nuestras manos, los espermatozoides de ratón fueron expuestos a DPC (Hernández-González *et al.*, 2007) y a CFTR_{inh}-172 (datos sin publicar) por 10 min., en comparación con los 30 min. que los espermatozoides se incubaron en presencia de Inh-172 (Li *et al.*, 2010). Sería intreressante, por lo tanto, investigar más detalladamente sí tanto DPC como CFTR_{inh}-172 bloquean la RA inducida por ZP3 en los espermatozoides de ratón, en tiempos más largos (30 min.) de incubación durante la RA. Dicha información es necesaria para profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la RA del espermatozoide de ratón.

Estos hallazgos podrían reflejar distintos aspectos de las cascadas de señalización de espermatozoides tanto de ratón como de humano y que se están haciendo evidentes, como la activación del CatSper por la progesterona (Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011) y la presencia del canal de protones (Hv; Lishko *et al.*, 2010). En el presente trabajo, mostramos que las corrientes macroscópicas obtenidas en la configuración de célula unida, registradas en los espermatozoides testiculares de ratón muestran un componente selectivo a Cl⁻ dependiente de ATP, estimulado por AMPc, GMPc, y genisteína (un agonista de CFTR, a bajas concentraciones), y se inhiben por DPC y CFTRinh-172, dos antagonistas del CFTR bien conocidos (Schultz *et al.*, 1999; Caci *et al.*, 2008). Extraordinariamente, el efecto de la genisteína es superior a 20 μM que a 50 μM (véase **Fig. 6**). Una explicación del efecto bifásico de la genisteína en el canal CFTR sugiere que el canal fosforilado posee dos sitios de unión para la genisteína, uno de alta afinidad (5-30 μM) y otro de baja afinidad (> 35 μM; (Wang *et al.*, 1998; Gadsby y Nairn, 1999). Se ha sugerido que la genisteína interactúa con NBD2 prolongando el tiempo promedio del estado abierto del canal. El efecto de la genisteína sobre el *gating* del canal es similar al de análogos de ATP no hidrolizables, lo que sugiere una posible interacción con NBD2. La asociación de la genisteína al sitio de baja afinidad en NBD1 inhibe la apertura del canal (Wang *et al.*, 1998). Una posibilidad, a altas concentraciones, es que la genisteína puede también asociarse débilmente a un sitio en el poro del canal del CFTR donde podría funcionar como un bloqueador del canal abierto (Lansdell *et al.*, 2000).

En general, las características del componente de las corrientes de Cl⁻ documentadas en este trabajo en los espermatozoides testiculares coinciden con aquellas corrientes descritas para el CFTR en varios tipos celulares así como en la expresión heteróloga de

este canal (Gong *et al.*, 2001; Riordan, 2005; Guggino y Stanton, 2006). La presencia del CFTR funcional en los espermatozoides testiculares del ratón se demuestra por el hecho de que las corrientes de Cl⁻ registradas en espermatozoides de ratones $\Delta F508$ -CFTR, donde hay pérdida de la función del canal no despliegan estimulación por AMPc y son insensibles al CFTR_{inh-172}.

Es importante señalar que el espermatozoide testicular de ratón posee corrientes de Cl⁻ estimuladas por db-AMPc (**Figs. 10, 11 y 14**), 8Br-GMPc (**Figs. 17**) y genisteína (**Fig. 18**), las cuales son bloqueadas por DPC a potenciales positivos (**Figs. 10, 11 y 17**) de manera dependiente de ATP (**Fig. 15**). Parte de las corrientes bloqueadas podrían deberse a los CaCCs (Schroeder *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2011) consistentemente, registros obtenidos mediante la técnica de fijación de voltaje en microareas de membrana a nivel de canal unitario ha documentado la presencia de un canal de Cl⁻ sensible a AN (IC₅₀ = 11 μ M; Espinosa *et al.*, 1998) con una sensibilidad similar al canal de Cl⁻ dependiente de Ca²⁺ TMEM16A, recientemente identificado (Galletta, 2009); Matchkov y colaboradores, 2004) y Piper y Large (2004), reportaron una corriente de Cl⁻ dependiente de Ca²⁺ estimulada por GMPc (EC₅₀ = 6.4 μ M), la cual es independiente de tiempo y voltaje en el músculo liso de ratón. En presencia de GMPc, estas corrientes son estimuladas por AMPc en ~10%. Por lo tanto, parte de la inhibición generada por DPC en las corrientes estimuladas por GMPc a potenciales positivos, podría deberse a los CaCCs; el AMPc también podría estimular medianamente a dichas corrientes. Otro componente de las corrientes de Cl⁻ del presente trabajo, es semejante a lo reportado en las células principales del epitelio del intestino delgado (células de Paneth) del cobayo, que carecen del canal CFTR. Estas células despliegan corrientes con características muy similares a las del CFTR debido a que son estimuladas por db-

AMPC, dependientes de ATP y bloqueadas por DPC, inclusive a potenciales positivos (Tsumura *et al.*, 1998). Si estas corrientes están presentes en el espermatozoide de ratón, podrían contribuir al bloqueo de la corriente por DPC a potenciales positivos y su dependencia de ATP. Por otro lado, la genisteína estimula al CFTR, pero también inhibe a las cinasas de tirosinas (PTK; por sus siglas en inglés) (Akiyama y Ogawara, 1991), lo cual podría estimular de alguna manera a los CaCCs y a las corrientes del tipo CFTR (Tsumura *et al.*, 1998) en el espermatozoide. Se tendrán que realizar experimentos adicionales para explorar si estos canales y los CaCCs son estimulados por la genisteína, y por qué el bloqueo por DPC a potenciales positivos es dependiente de ATP. Por otra parte, no nos queda claro por qué el DPC y CFTR_{inh-172} bloquean a la corriente en porcentaje similar a los potenciales positivos, la interpretación más simple a esta observación es que la porción de la corriente del CFTR y la porción de la corriente de los CaCCs, parece contribuir de igual manera.

Para determinar si las corrientes tipo CFTR prevalecen durante la maduración epididimal, se registraron corrientes mediante fijación de voltaje en microareas de membrana en los espermatozoides epididimales bajo las condiciones experimentales de registro utilizadas en el estudio de las corrientes de Cl⁻, donde la solución interna contiene una [Ca²⁺]_i de 60 nM. Las corrientes registradas bajo las condiciones experimentales establecidas son similares a aquellas obtenidas en los espermatozoides testiculares (**Fig 11A y B**). Estas corrientes se activaron por db-AMPC e inhibidas por CFTR_{inh-172}; la diferencia entre estas dos condiciones generó corrientes que despliegan una curva *I-V* con características compatibles con las reportadas para el CFTR.

7 CONCLUSIONES

- El espermatozoide testicular de ratón posee un canal selectivo a Cl^- . Este canal de Cl^- es modulado por AMPc/PKA, ATP, GMPc y genisteína (a bajas concentraciones). Estas corrientes de Cl^- son sensibles a DPC y CFTR_{inh}-172, de manera dependiente de la dosis (DPC, $\text{IC}_{50} = \sim 175 \mu\text{M}$; inh-172, $\text{IC}_{50} = 0.5 \mu\text{M}$, dosis reportada) y en el caso del DPC, dependiente del voltaje (potenciales negativos, -100 mV); el bloqueo de la corriente de Cl^- por estos compuestos es parcialmente reversible en todos los casos.
- De manera consistente, el uso del AN reveló un componente de la corriente de Cl^- sensible a este inhibidor (50 μM). Este resultado coincide con el reporte previo en el espermatozoide de ratón.
- El DPC a la concentración utilizada en nuestros experimentos (250 μM) para bloquear al canal CFTR, también bloqueo a los CaCCs (a potenciales positivos) y a otras corrientes de Cl^- estimuladas por AMPc. Por lo que, nuestros resultados corroboran la presencia de los CaCCs en los espermatozoides testiculares de ratón, los cuales hasta ahora, no se han caracterizado.
- En los espermatozoides testiculares la activación de las corrientes de Cl^- por db-AMPc es dependiente de la dosis ($\text{EC}_{50} = \sim 35 \mu\text{M}$) y de ATP intracelular (3 mM). Estos valores son cercanos a lo reportado en estudios previos de expresión heteróloga del CFTR.
- La secuencia de selectividad iónica del CFTR detectada en el espermatozoide testicular de ratón ($\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{HCO}_3^-$), muestra un patrón de selectividad iónica similar al reportado previamente en otros tipos celulares y en expresión heteróloga del canal CFTR.

- La genisteína incrementa la activación de las corrientes de Cl^- en presencia de ATP intracelular (3 mM). De manera interesante, a concentraciones más altas de genisteína (50 μM) tuvieron menor efecto estimulante sobre estas corrientes. La adición de DPC (250 μM) sobre las corrientes estimuladas por genisteína, generó la inhibición de estas corrientes, de manera parcialmente reversible.
- Nuestros resultados sugieren que los canales CFTR están parcialmente activos en estado basal de los espermatozoides testiculares.
- Por otra parte, el uso de los espermatozoides testiculares del ratón mutante CFTR- ΔF508 , donde hay pérdida de la función del canal, no mostró activación de la corriente de Cl^- por AMPc o inhibición por CFTR_{inh}-172. Por lo que, los resultados sugieren que la fracción de la corriente de Cl^- que es bloqueada por este inhibidor corresponde en su mayoría a la del canal CFTR.
- Tomando como base la caracterización funcional del canal CFTR en los espermatozoides testiculares, identificamos funcionalmente a los canales CFTR en los espermatozoides epididimales, donde las corrientes de Cl^- son estimuladas por db-AMPc (100 μM) y bloqueadas por CFTR_{inh}-172 (5 μM), de manera similar a aquellas obtenidas en los espermatozoides testiculares con características consistentes con la presencia del canal CFTR en los espermatozoides más maduros del ratón.
- Las herramientas farmacológicas utilizadas en este trabajo y los ensayos funcionales indirectos previamente reportados sugieren que el canal CFTR participa en el incremento parcial de la $[\text{Cl}^-]_i$ durante la capacitación y en la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática del espermatozoide de ratón.

8 *PERSPECTIVAS*

- Examinar la posible regulación del CFTR por factores citoplasmáticos (p.ej. PKA, PKC, pH).
- Estudiar la posible influencia de otras proteínas de transporte como ENaCs o intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ sobre el CFTR en el espermatozoide epididimal de ratón y humano.
- Evaluar en espermatozoides epididimales capacitados la contribución del CFTR en las corrientes de Cl^- .
- Analizar la participación del CFTR en la regulación del volumen celular del espermatozoide epididimal.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, J. J., Mendoza-Lujambio, I., De la Vega-Beltrán, J. L., Treviño, C. L., Felix, R., & Darszon, A. (2006). KATP channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation. *Developmental biology*, 289(2), 395–405.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., et al. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of biological chemistry*, 262(12), 5592–5595.
- Akiyama, T., & Ogawara, H. (1991). Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Methods in enzymology*, 201, 362–370.
- Alvarez De la Rosa, D., Canessa, C. M., Fyfe, G. K., & Zhang, P. (2000). Structure and regulation of amiloride sensitive sodium channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 62, 573–594.
- Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., Smith, A. E., et al. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5016), 202–205.
- Anderson, M. P., Rich, D. P., Gregory, R. J., Smith, A. E., & Welsh, M. J. (1991). Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science (New York, N.Y.)*, 251(4994), 679–682.
- Anguiano, A., Oates, R. D., Amos, J. A., Dean, M., Gerrard, B., Stewart, C., Maher, T. A., et al. (1992). Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA : The journal of the American Medical Association*, 267(13), 1794–1797.
- Araújo, F. G. de, Novaes, F. C., Dos Santos, N. P. C., Martins, V. C., De Souza, S. M., Dos Santos, S. E. B., & Ribeiro-dos-Santos, A. K. C. (2005). Prevalence of deltaF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Brazilian journal of medical and biological research*, 38(1), 11–15.
- Arcelay, E., Salicioni, A. M., Wertheimer, E., & Visconti, P. E. (2008). Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *The International journal of developmental biology*, 52(5-6), 463–472.
- Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villaz, M., & Florman, H. M. (1999). Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), 6757–6762.

- Arnoult, C., Zeng, Y., & Florman, H. M. (1996). ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *The Journal of cell biology*, *134*(3), 637–645.
- Arreola, J., Melvin, J. E., & Begenisich, T. (1996). Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells. *The Journal of general physiology*, *108*(1), 35–47.
- Austin, C. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, *170*(4321), 326.
- Babcock, D. F. (1983). Examination of the intracellular ionic environment and of ionophore action by null point measurements employing the fluorescein chromophore. *The Journal of biological chemistry*, *258*(10), 6380–6389.
- Baker, M. A. (2011). The 'omics revolution and our understanding of sperm cell biology. *Asian journal of andrology*, *13*(1), 6–10.
- Baker, M. A., Hetherington, L., Ecroyd, H., Roman, S. D., & Aitken, R. J. (2004). Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *Journal of cell science*, *117*(Pt 2), 211–222.
- Bakhrom, K. B., Qadri, Y. J., & Dale J. Benos. (2009). Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol Biosyst.*, *5*(2), 123–127.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C., & Forti, G. (1996). Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Frontiers in bioscience : A journal and virtual library*, *1*, d189–205.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Muratori, M., & Forti, G. (2000). Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, *5*(5), E110–23.
- Baukrowitz, T., Hwang, T. C., Nairn, A. C., & Gadsby, D. C. (1994). Coupling of CFTR Cl⁻ channel gating to an ATP hydrolysis cycle. *Neuron*, *12*(3), 473–482.
- Bear, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjeesingh, M., & Riordan, J. R. (1992). Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*, *68*(4), 809–818.
- Bedford, J. M. (1998). Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biology of reproduction*, *59*(6), 1275–1287.
- Bellvé AR. (1993). Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol.*, *225*, 84–113.

- Berdiev, B. K., Shlyonsky, V. G., Karlson, K. H., Stanton, B. A., & Ismailov, I. I. (2000). Gating of amiloride-sensitive Na⁽⁺⁾ channels: subunit-subunit interactions and inhibition by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biophysical journal*, 78(4), 1881–1894.
- Berger, T., & Clegg, E. D. (1983). Adenylate cyclase activity in porcine sperm in response to female reproductive tract secretions. *Gamete Research*, 7(2), 169–177.
- Blackmore, P. F. (1993). Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca²⁺ influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cellular signalling*, 5(5), 531–538.
- Boerke, A., Van der Lit, J., Lolicato, F., Stout, T. A. E., Helms, J. B., & Gadella, B. M. (2014). Removal of GPI-anchored membrane proteins causes clustering of lipid microdomains in the apical head area of porcine sperm. *Theriogenology*, 81(4), 613–624.
- Boucher, R. (2004). New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Journal*, 23(1), 146–158.
- Briel, M., Greger, R., & Kunzelmann, K. (1998). Cl⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na⁺ channels (ENaCs) in *Xenopus* oocytes co-expressing CFTR and ENaC. *The Journal of physiology*, 508(Pt 3), 825–836.
- Caci, E., Caputo, A., Hinzpeter, A., Arous, N., Fanen, P., Sonawane, N., Verkman, A. S., et al. (2008). Evidence for direct CFTR inhibition by CFTR(inh)-172 based on Arg347 mutagenesis. *The Biochemical journal*, 413(1), 135–142.
- Cann, M. (2004). Bicarbonate stimulated adenylyl cyclases. *IUBMB life*, 56(9), 529–534.
- Cantiello, H. F. (1996). Role of the actin cytoskeleton in the regulation of the Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Experimental Physiology*, 81, 505–514.
- Carson, M. R., & Welsh, M. J. (1995). Structural and functional similarities between the nucleotide-binding domains of CFTR and GTP-binding proteins. *Biophysical journal*, 69(6), 2443–8.
- Chang, M. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168(4277), 697–698.
- Chávez, J. C., De Blas, G. a, De la Vega-Beltrán, J. L., Nishigaki, T., Chirinos, M., González-González, M. E., Larrea, F., et al. (2011). The opening of maitotoxin-sensitive calcium channels induces the acrosome reaction in human spermatozoa: differences from the zona pellucida. *Asian journal of andrology*, 13(1), 159–165.

- Chávez, J. C., De la Vega-Beltrán, J. L., Escoffier, J., Visconti, P. E., Treviño, C. L., Darszon, A., Salkoff, L., et al. (2013). Ion permeabilities in mouse sperm reveal an external trigger for SLO3-dependent hyperpolarization. *PloS one*, 8(4), 1–13.
- Chávez, J. C., Hernández-González, E. O., Wertheimer, E., Visconti, P. E., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2012). Participation of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl⁻ channel CFTR, and the regulatory factor SLC9A3R1 in mouse sperm capacitation. *Biology of reproduction*, 86(1), 1–14.
- Chen, H., Ruan, Y. C., Xu, W. M., Chen, J., & Chan, H. C. (2012). Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Human reproduction update*, 18(6), 703–713.
- Chen, W. Y., Xu, W. M., Chen, Z. H., Ni, Y., Yuan, Y. Y., Zhou, S. C., Zhou, W. W., et al. (2009). Cl⁻ is required for HCO₃⁻ entry necessary for sperm capacitation in guinea pig: involvement of a Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger (SLC26A3) and CFTR. *Biology of reproduction*, 80(1), 115–123.
- Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin, L. R., & Buck, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5479), 625–628.
- Cheung, K. H., Leung, C. T., Leung, G. P. H., & Wong, P. Y. D. (2003). Synergistic effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and aquaporin-9 in the rat epididymis. *Biology of reproduction*, 68(5), 1505–1510.
- Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., & Eisenbach, M. (1995). Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 11039–11043.
- Couzin-Frankel, J. (2009). Genetics. The promise of a cure: 20 years and counting. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5934), 1504–1507.
- Cox, T., & Peterson, R. N. (1989). Identification of calcium conducting channels in isolated boar sperm plasma membranes. *Biochemical and biophysical research communications*, 161(1), 162–168.
- Cross, N. L. (2004). Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biology of reproduction*, 71(4), 1367–1373.
- Dacheux, J.-L., Belleannée, C., Guyonnet, B., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.-P., Ecroyd, H., Druart, X., et al. (2012). The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems biology in reproductive medicine*, 58(4), 197–210.
- Darszon, a, Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T., & Treviño, C. L. (2001). Ion transport in sperm signaling. *Developmental biology*, 240(1), 1–14.

- Darszon, a, Labarca, P., Nishigaki, T., & Espinosa, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiological reviews*, 79(2), 481–510.
- Darszon, A, Lievano, A., & Beltran, C. (1996). Ion Channels: Key Elements in Gamete Signaling. In Edited by Roger A. Pedersen and Gerald P. Schatten (Ed.), *Current topics in developmental biology* (Vol. 34, pp. 117–167).
- Darszon, Alberto, López-Martínez, P., Acevedo, J. J., Hernández-Cruz, A., & Treviño, C. L. (2006). T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell calcium*, 40(2), 241–52.
- Darszon, Alberto, Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological reviews*, 91(4), 1305–1355.
- Darszon, Alberto, Nishigaki, T., Wood, C., Treviño, C. L., Felix, R., & Beltrán, C. (2005). Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *International review of cytology*, 243, 79–172.
- Davidson, D. J., & Dorin, J. R. (2001). The CF mouse: an important tool for studying cystic fibrosis. *Expert reviews in molecular medicine*, 1–27.
- Davis, P. B., Drumm, M., & Konstan, M. W. (1996). Cystic Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 154(11), 1229–1256.
- Demarco, I. A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De La Vega-Beltran, J. L., Hockensmith, J. W., Kopf, G. S., et al. (2003). Involvement of a Na⁺/HCO⁻³ cotransporter in mouse sperm capacitation. *The Journal of biological chemistry*, 278(9), 7001–7009.
- Di Stefano, A., Wittner, M., Schlatter, E., Lang, H. J., Englert, H., & Greger, R. (1985). Diphenylamine-2-carboxylate, a blocker of the Cl⁽⁻⁾-conductive pathway in Cl⁽⁻⁾-transporting epithelia. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 405 Suppl, S95–100.
- Diener, M., & Hug, F. (1996). Modulation of Cl⁻ secretion in rat distal colon by genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor. *European journal of pharmacology*, 299(1-3), 161–170.
- Doorninck, J. H. van, Pim, J. F., Verbeek, E., Peters, R. H. P. C., Morreau, H., And, J. B., & J. Scholte, B. (1995). A mouse model for the cystic fibrosis AF508 mutation. *The EMBO journal*, 14(18), 4403–4411.
- Dragileva, E., Rubinstein, S., & Breitbart H. (1999). Intracellular Ca²⁺ -Mg²⁺-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biology of reproduction*, 61, 1226–1234.

- Dun, M. D., Aitken, R. J., & Nixon, B. (2012). The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. *Human reproduction update*, 18(4), 420–35.
- Ecke, D., Bleich, M., & Greger, R. (1996). The amiloride inhibitable Na⁺ conductance of rat colonic crypt cells is suppressed by forskolin. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 431(6), 984–986.
- Eddy, E., & O'Brien, D. (1994). The spermatozoon. In editors. In: Knobil E, Neill JD (Ed.), *The physiology of reproduction*. (pp. 27–29). New York: Raven Press.
- Eddy, E., & O'Brien, D. (1994). The spermatozoon. In J. D. N. E. Knobil (Ed.), *The physiology of reproduction*. (pp. 29–77). New York, NY, USA.
- Ehrenwald, E., Foote, R. H., & Parks, J. E. (1990). Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Molecular reproduction and development*, 25(2), 195–204.
- Ehrenwald, E., Parks, J. E., & Foote, R. H. (1988). Cholesterol efflux from bovine sperm: II. Effect of reducing sperm cholesterol on penetration of zona-free hamster and in vitro matured bovine ova. *Gamete research* (Vol. 20, pp. 413–420).
- Emiliozzi, C., & Fenichel, P. (1997). Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm in vitro but is not sufficient for its completion. *Biology of reproduction*, 56(3), 674–649.
- Erdő, S. L., & Wekerle, L. (1990). GABA_A type binding sites on membranes of spermatozoa. *Life sciences*, 47(13), 1147–51.
- Escoffier, J., Krapf, D., Navarrete, F., Darszon, A., & Visconti, P. E. (2012). Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *Journal of cell science*, 125(Pt 2), 473–85.
- Espinosa, F., & Darszon, A. (1995). Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca²⁺. *FEBS letters*, 372(1), 119–125.
- Espinosa, F., De la Vega-Beltrán, J. L., López-González, I., Delgado, R., Labarca, P., & Darszon, A. (1998). Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl⁻ channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction. *FEBS letters*, 426(1), 47–51.
- Espinosa, F., López-González, I., Serrano, C. J., Gasque, G., De la Vega-Beltrán, J. L., Treviño, C. L., & Darszon, A. (1999). Anion channel blockers differentially affect T-type Ca²⁺ currents of mouse spermatogenic cells, alpha_{1E} currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction. *Developmental genetics*, 25(2), 103–114.

- Fernández Lezana, L. J., González, M. D., & Fernández Lezana, M. A. (1994). Cystic fibrosis in Mexico: an analysis of main epidemiological aspects. *Bol. med. Hosp. infant. Mex.*, *51*(5), 305–310.
- Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, *340*, 245–246.
- Florman, H. M., Arnoult, C., Kazam, I. G., Li, C., & O’Toole, C. M. (1998). A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biology of reproduction*, *59*(1), 12–6.
- Förster, T. (1949). Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischengmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie. *Naturforsch.*, *4A*, 321–327.
- Fraser, L. R. (1995). Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction. *Human reproduction (Oxford, England)*, *10 Suppl 1*, 22–30.
- French, P. J., Doorninck, J. H. Van, Peters, R. H. P. C., Verbeek, E., Ameen, N. A., Marino, C. R., Jonge, H. R. De, et al. (1996). Rapid Publication A ◊ F508 Mutation in Mouse Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Results in a Temperature-sensitive Processing Defect In Vivo, *98*(6), 1304–1312.
- Gadella, B. M., & Harrison, R. A. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development (Cambridge, England)*, *127*(11), 2407–2420.
- Gadsby, D C, & Nairn, a C. (1999). Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiological reviews*, *79*(1 Suppl), S77–S107.
- Gadsby, David C, & Nairn, A. C. (1994). Regulation of CFTR channel gating. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.*, *33*, 79–106.
- Galiotta, L. J. V. (2009). The TMEM16 protein family: a new class of chloride channels? *Biophysical journal*, *97*(12), 3047–3053.
- Garbers, D. L., & Kopf, G. S. (1980). The regulation of spermatozoa by calcium cyclic nucleotides. *Advances in cyclic nucleotide research*, *13*, 251–306.
- Garcia, M., & Meizel, S. (1999). Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type calcium channels. *Biology of reproduction*, *60*(1), 102–109.
- Garner D, & Hafez E. (1987). Espermatozoides. In I. Imp. (Ed.), *Reproducción e inseminación artificial en animales* (pp. 160–180).

- Garty, H., & Palmer, L. G. (1997). Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiological reviews*, 77(2), 359–96.
- Gibson, R. L., Burns, J. L., & Ramsey, B. W. (2003). Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 168(8), 918–951.
- Gilbert SF. (2006). *Developmental Biology*. (Sinauer Associates), Ed.) (8 edition., p. 719). Sunderland, MA.
- Go, K. J., & Wolf, D. P. (1985). Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biology of reproduction*, 32(1), 145–153.
- Gong, X. D., Li, J. C., Cheung, K. H., Leung, G. P., Chew, S. B., & Wong, P. Y. (2001). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat spermatids: implication for the site of action of antispermatogenic agents. *Molecular human reproduction*, 7(8), 705–713.
- Gong, X., & Linsdell, P. (2003). Coupled movement of permeant and blocking ions in the CFTR chloride channel pore. *The Journal of physiology*, 549(Pt 2), 375–385.
- Gray, M. A. (2004). Bicarbonate secretion: it takes two to tango. *Nature cell biology*, 6(4), 292–294.
- Grimard, V., Li, C., Ramjeesingh, M., Bear, C. E., Goormaghtigh, E., & Ruyschaert, J.-M. (2004). Phosphorylation-induced conformational changes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator monitored by attenuated total reflection-Fourier transform IR spectroscopy and fluorescence spectroscopy. *The Journal of biological chemistry*, 279(7), 5528–5536.
- Guggino, W. B., & Stanton, B. A. (2006). New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(6), 426–36.
- Haggie, P. M., & S, V. A. (2007). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-independent phagosomal acidification in macrophages. *The Journal of biological chemistry*, 282(43), 31422–31428.
- Harper, M. (1994). Gamete and zygote transport. In J. Knobil, E. and Neill (Ed.), *The physiology of reproduction*. (pp. 123–187.). New York, NY, USA.
- Harper, C. V, Barratt, C. L. R., & Publicover, S. J. (2004). Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *The Journal of biological chemistry*, 279(44), 46315–46325.
- Harper, C. V, Cummerson, J. A., White, M. R. H., Publicover, S. J., & Johnson, P. M. (2008). Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *Journal of cell science*, 121(Pt 13), 2130–2135.

- Harrison, R. A. P. (2004). Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Molecular reproduction and development*, 67(3), 337–352.
- Hartzell, C., Putzier, I., & Arreola, J. (2005). Calcium-activated chloride channels. *Annual review of physiology*, 67, 719–758.
- Hayashi, H., Suruga, K., & Yamashita, Y. (2009). Regulation of intestinal Cl⁻ / HCO₃⁻ exchanger SLC26A3 by intracellular pH. *Am J Physiol Cell Physiol* ., 296, C1279–C1290.
- Hernández-González, E. O., Sosnik, J., Edwards, J., Acevedo, J. J., Mendoza-Lujambio, I., López-González, I., Demarco, I., et al. (2006). Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *The Journal of biological chemistry*, 281(9), 5623–5633.
- Hernández-González, E. O., Treviño, C. L., Castellano, L. E., De la Vega-Beltrán, J. L., Ocampo, A. Y., Wertheimer, E., Visconti, P. E., et al. (2007). Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *The Journal of biological chemistry*, 282(33), 24397–24406.
- Higgins, C. F., & Linton, K. J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology*, 11(10), 918–926.
- Hihnala, S., Kujala, M., Toppari, J., Kere, J., Holmberg, C., & Höglund, P. (2006). Expression of SLC26A3, CFTR and NHE3 in the human male reproductive tract: role in male subfertility caused by congenital chloride diarrhoea. *Molecular human reproduction*, 12(2), 107–111.
- Ho, K., Wolff, C. a, & Suarez, S. S. (2009). CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reproduction, fertility, and development*, 21(2), 345–350.
- Hogg, R. C., Wang, Q., & Large, W. A. (1994). Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *British journal of pharmacology*, 112(3), 977–984.
- Holland, I. B., & Blight, M. A. (1999). ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *Journal of molecular biology*, 293(2), 381–399.
- Hoshi, K., Aita, T., Yanagida, K., Yoshimatsu, N., & Sato, A. (1990). Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relationship with capacitation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 5(1), 71–74.
- Hu, J.-H., He, X.-B., Wu, Q., Yan, Y.-C., & Koide, S. S. (2002). Biphasic effect of GABA on rat sperm acrosome reaction: involvement of GABA(A) and GABA(B) receptors. *Archives of andrology*, 48(5), 369–78.

- Huacuja, L., Delgado, N. M., Merchant, H., Pancardo, R. M., & Rosado, A. (1977). Cyclic AMP induced incorporation of 3 $^3\text{P}_i$ into human spermatozoa membrane components. *Biology of reproduction*, 17(1), 89–96.
- Hwang, T. C., Nagel, G., Nairn, A. C., & Gadsby, D. C. (1994). Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^- channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), 4698–46702.
- Hyne, R. V., & Edwards, K. P. (1985). Influence of 2-deoxy-D-glucose and energy substrates on guinea-pig sperm capacitation and acrosome reaction. *Journal of reproduction and fertility*, 73(1), 59–69.
- Ignáth, I., Hegyi, P., Venglovecz, V., Székely, C. A., Carr, G., Hasegawa, M., Inoue, M., et al. (2009). CFTR expression but not Cl^- transport is involved in the stimulatory effect of bile acids on apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activity in human pancreatic duct cells. *Pancreas*, 38(8), 921–929.
- Ikuma, M., & Welsh, M. J. (2000). Regulation of CFTR Cl^- channel gating by ATP binding and hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8675–8680.
- Illek, B., Fischer, H., Santos, G. F., Widdicombe, J. H., Machen, T. E., & Reenstra, W. W. (1995). cAMP-independent activation of CFTR Cl^- channels by the tyrosine kinase inhibitor genistein. *The American journal of physiology*, 268(4 Pt 1), C886–C893.
- Iritani, A., Sato, E., & Nishikawa, Y. (1974). Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *Journal of animal science*, 39(3), 582–588.
- Ishiguro, H., Steward, M. C., Naruse, S., Ko, S. B. H., Goto, H., Case, R. M., Kondo, T., et al. (2009). CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. *The Journal of general physiology*, 133(3), 315–326.
- Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., & Zdebik, A. a. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological reviews*, 82(2), 503–568.
- Ji, H. L., Chalfant, M. L., Jovov, B., Lockhart, J. P., Parker, S. B., Fuller, C. M., Stanton, B. A., et al. (2000). The cytosolic termini of the beta- and gamma-ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *The Journal of biological chemistry*, 275(36), 27947–27956.
- Jiang, Q. (2000). Epithelial Sodium Channels Regulate Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channels in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13266–13274.

- Kaupp, U. B., Kashikar, N. D., & Weyand, I. (2008). Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annual review of physiology*, 70, 93–117.
- Kaupp, U. B., & Seifert, R. (2002). Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels. *Physiol Rev*, 82, 769–824.
- Kellenberger, S., & Schild, L. (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiological reviews*, 82(3), 735–767.
- Kirichok, Y., & Lishko, P. V. (2011). Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Molecular human reproduction*, 17(8), 478–499.
- Kirichok, Y., Navarro, B., & Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature*, 439(7077), 737–740.
- Kirkman-Brown, J. C., Punt, E. L., Barratt, C. L. R., & Publicover, S. J. (2002). Zona pellucida and progesterone-induced Ca²⁺ signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *Journal of andrology*, 23(3), 306–315.
- Ko, S. B. H., Zeng, W., Dorwart, M. R., Luo, X., Kim, K. H., Millen, L., Goto, H., et al. (2004). Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nature cell biology*, 6(4), 343–350.
- König, J., Schreiber, R., Voelcker, T., Mall, M., & Kunzelmann, K. (2001). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibits ENaC through an increase in the intracellular Cl⁻ concentration. *EMBO reports*, 2(11), 1047–1051.
- Kopf, G. S., & Gerton, G. L. (1991). The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. *Elements of Mammalian Fertilization* (pp. 153–203). Boca Ratan, FL.
- Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E. V, Sanjay, A., Pilder, S. H., Salicioni, A. M., & Visconti, P. E. (2010). Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *The Journal of biological chemistry*, 285(11), 7977–7985.
- Krester D, & Kerr J. (1988). *In The Physiology of Reproduction*. (Knobil E and Neill JD, Eds. Raven Press, Ed.) (pp. 837–932). New York: USA.
- Kunzelmann, K, Kathöfer, S., Hipper, A., Gruenert, D., & Gregner, R. (1996). Culture-dependent expression of Na⁺ conductances in airway epithelial cells. *Pflugers Arch.*, 431(4), 578–586.
- Kunzelmann, K, Kiser, G. L., Schreiber, R., & Riordan, J. R. (1997). Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS letters*, 400(3), 341–344.

- Kunzelmann, Karl. (2003). ENaC is inhibited by an increase in the intracellular Cl(-) concentration mediated through activation of Cl(-) channels. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 445(4), 504–512.
- Kunzelmann, Karl, Schreiber, R., Nitschke, R., & Mall, M. (2000). Control of epithelial Na⁺ conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflügers Archiv*, 440(2), 193–201.
- Lakoski, K. A., Carron, C. P., Cabot, C. L., & Saling, P. M. (1988). Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biology of reproduction*, 38(1), 221–233.
- Lamprecht, G., & Seidler, U. (2006). The emerging role of PDZ adapter proteins for regulation of intestinal ion transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291(5), G766–G777.
- Langlais, J., & Roberts, K. D. (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research*, 12(2), 183–224.
- Lansdell, K. a, Cai, Z., Kidd, J. F., & Sheppard, D. N. (2000). Two mechanisms of genistein inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in murine cell line. *The Journal of physiology*, 524 Pt 2, 317–330.
- Lee, M., & Muallem, S. (2009). Physiology of duct cell secretion. *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery* (p. 1024). John Wiley & Sons.
- Lehrich, R. W., & Forrest, J. N. (1995). Tyrosine phosphorylation is a novel pathway for regulation of chloride secretion in shark rectal gland. *Am J Physiol*, 269(4 Pt 2), F594–600.
- Li, C.-Y., Jiang, L.-Y., Chen, W.-Y., Li, K., Sheng, H.-Q., Ni, Y., Lu, J.-X., et al. (2010). CFTR is essential for sperm fertilizing capacity and is correlated with sperm quality in humans. *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(2), 317–327.
- Liévano, a, Santi, C. M., Serrano, C. J., Treviño, C. L., Bellvé, a R., Hernández-Cruz, A., & Darszon, A. (1996). T-type Ca²⁺ channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS letters*, 388(2-3), 150–154.
- Lindemann, C. B., & Kanous, K. S. (1989). Regulation of mammalian sperm motility. *Archives of andrology*, 23(1), 1–22.
- Lishko, P. V, Botchkina, I. L., Fedorenko, A., & Kirichok, Y. (2010). Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*, 140(3), 327–337.

- Lishko, P. V, Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387–91.
- Livera, G., Xie, F., Garcia, M. A., Jaiswal, B., Chen, J., Law, E., Storm, D. R., et al. (2005). Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoon function. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(5), 1277–1290.
- Llanos, M. N., Ronco, A. M., Aguirre, M. C., & Meizel, S. (2001). Hamster sperm glycine receptor: evidence for its presence and involvement in the acrosome reaction. *Molecular reproduction and development*, 58(2), 205–215.
- Lodish H, B., Kaiser C, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, & P, M. (2007). *Molecular Cell Biology*. (W. H. Freeman y Co, Ed.) (6th ed.). New York.
- Loo, M. a, Jensen, T. J., Cui, L., Hou, Y., Chang, X. B., & Riordan, J. R. (1998). Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *The EMBO journal*, 17(23), 6879–6887.
- López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís-López, A., Santi, C. M., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2014). Membrane Hyperpolarization during Human Sperm Capacitation. *Molecular human reproduction*, 1–46.
- Luconi, M., Krausz, C., Forti, G., & Baldi, E. (1996). Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biology of reproduction*, 55(1), 207–16.
- Lukacs, G. L., & Verkman, a S. (2012). CFTR: folding, misfolding and correcting the ΔF508 conformational defect. *Trends in molecular medicine*, 18(2), 81–91.
- Ma, T., Thiagarajah, J. R., Yang, H., Sonawane, N. D., Folli, C., Galiotta, L. J. V, & Verkman, A. S. (2002). Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin – induced intestinal fluid secretion, 110(11), 1651–1658.
- Martínez-López, P., Treviño, C. L., De la Vega-Beltrán, J. L., De Blas, G., Monroy, E., Beltrán, C., Orta, G., et al. (2011). TRPM8 in mouse sperm detects temperature changes and may influence the acrosome reaction. *Journal of cellular physiology*, 226(6), 1620–1631.
- Matchkov, V. V, Aalkjaer, C., & Nilsson, H. (2004). A cyclic GMP-dependent calcium-activated chloride current in smooth-muscle cells from rat mesenteric resistance arteries. *The Journal of general physiology*, 123(2), 121–134.
- McCarty, N. (2000). Permeation through the CFTR chloride channel. *The journal of experimental biology*, 203(Pt 13), 1947–1962.

- McCarty, N. A., McDonough, S., Cohen, B. N., Riordan, J. R., Davidson, N., & Lester, H. a. (1993). Voltage-dependent block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by two closely related arylaminobenzoates. *The Journal of general physiology*, *102*(1), 1–23.
- Mcintosh, I., & Cuttingt, G. B. (1992). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulador and etiology and pathogenesis of cystic fibrosis. *FASEB J.*, *6*(10), 2775–2782.
- McPartlin, L. a, Visconti, P. E., & Bedford-Guaus, S. J. (2011). Guanine-nucleotide exchange factors (RAPGEF3/RAPGEF4) induce sperm membrane depolarization and acrosomal exocytosis in capacitated stallion sperm. *Biology of reproduction*, *85*(1), 179–188.
- Means, R. (1983). Cyclic Adenosine 3',5' Monophosphate, calcium and protein phosphorylation in Motility and Protein. *Biology of reproduction*, *28*, 75–104.
- Medina, J. F., Recalde, S., Prieto, J., Lecanda, J., Saez, E., Funk, C. D., Vecino, P., et al. (2003). Anion exchanger 2 is essential for spermiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(26), 15847–52.
- Meizel, S. (1997). Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Developmental biology*, *182*(1), 67–75.
- Melendrez, C. S., & Meizel, S. (1995). Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl⁻ channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Biology of reproduction*, *53*(3), 676–683.
- Melendrez, C. S., & Meizel, S. (1996). Immunochemical identification of the glycine receptor/Cl⁻channel in porcine sperm. *Biochemical and biophysical research communications*, *223*(3), 675–678.
- Miranda, P. V, Allaire, A., Sosnik, J., & Visconti, P. E. (2009). Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm. *Biology of reproduction*, *80*(5), 897–904.
- Monks, N. J., Stein, D. M., & Fraser, L. R. (1986). Adenylate cyclase activity of mouse sperm during capacitation in vitro: effect of calcium and a GTP analogue. *International journal of andrology*, *9*(1), 67–76.
- Muanprasat, C., Sonawane, N. D., Salinas, D., Taddei, A., Galietta, L. J. V, & Verkman, a S. (2004). Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: mechanism, structure-activity analysis, and in vivo efficacy. *The Journal of general physiology*, *124*(2), 125–137.
- Muñoz-Garay, C., De la Vega-Beltrán, J. L., Delgado, R., Labarca, P., Felix, R., & Darszon, A. (2001). Inwardly rectifying K⁽⁺⁾ channels in spermatogenic cells:

- functional expression and implication in sperm capacitation. *Developmental biology*, 234(1), 261–274.
- Murashima, Y. L., & Kato, T. (1986). Distribution of γ -aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in the layers of rat oviduct. *Journal of Neurochemistry*, 46(1), 166–172.
- Navarro, B., Kirichok, Y., & Clapham, D. E. (2007). KSper, a pH-sensitive K^+ current that controls sperm membrane potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), 7688–7692.
- Naz, R. K., Morte, C., Ahmad, K., & Martinez, P. (1996). Hexokinase present in human sperm is not tyrosine phosphorylated but its antibodies affect fertilizing capacity. *Journal of andrology*, 17(2), 143–150.
- O'Toole, C. M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R. A., & Florman, H. M. (2000). Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Molecular biology of the cell*, 11(5), 1571–1584.
- Obayashi, K., Horie, M., Washizuka, T., Nishimoto, T., & Sasayama, S. (1999). On the mechanism of genistein-induced activation of protein kinase A-dependent Cl^- conductance in cardiac myocytes. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 438(3), 269–277.
- Ohana, E., Yang, D., Shcheynikov, N., & Muallem, S. (2009). Diverse transport modes by the solute carrier 26 family of anion transporters. *The Journal of physiology*, 587(Pt 10), 2179–2185.
- Orozco L, Velázquez R, Zielenski J, Tsui LC, Chávez M, Lezana JL, Saldaña Y, Hernández E, C. A. (2000). Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G-->A). *Hum Genetics*, 106(3), 360–365.
- Orta, G., Ferreira, G., José, O., Treviño, C. L., Beltrán, C., & Darszon, A. (2012). Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that may participate in the acrosomal reaction. *The Journal of physiology*, 590(Pt 11), 2659–2675.
- Pace, a J., Lee, E., Athirakul, K., Coffman, T. M., O'Brien, D. a, & Koller, B. H. (2000). Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the $Na^{(+)}-K^{(+)}-2Cl^{-}$ cotransporter. *The Journal of clinical investigation*, 105(4), 441–450.
- Park, H. W., Nam, J. H., Kim, J. Y., Namkung, W., Yoon, J. S., Lee, J.-S., Kim, K. S., et al. (2010). Dynamic regulation of CFTR bicarbonate permeability by $[Cl^-]_i$ and its role in pancreatic bicarbonate secretion. *Gastroenterology*, 139(2), 620–631.

- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., & First, N. L. (1989). Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biology of reproduction*, 41(4), 683–699.
- Pastén-Hidalgo, K., Hernández-Rivas, R., Roa-Espitia, A. L., Sánchez-Gutiérrez, M., Martínez-Pérez, F., Monrroy, A. O., Hernández-González, E. O., et al. (2008). Presence, processing, and localization of mouse ADAM15 during sperm maturation and the role of its disintegrin domain during sperm-egg binding. *Reproduction (Cambridge, England)*, 136(1), 41–51.
- Piper, a S., & Large, W. a. (2004). Single cGMP-activated Ca(+)-dependent Cl(-) channels in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *The Journal of physiology*, 555(Pt 2), 397–408.
- Poulsen, J. H., Fischer, H., Illek, B., & Machen, T. E. (1994). Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5340–5344.
- Qu, Z., Wei, R. W., & Hartzell, H. C. (2003). Characterization of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in mouse kidney inner medullary collecting duct cells. *American journal of physiology. Renal physiology*, 285(2), F326–F335.
- Quinton, P. M. (1999). Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiological reviews*, 79(1 Suppl), S3–S22.
- Quinton, P. M., & Reddy, M. M. (1992). Control of CFTR chloride conductance by ATP levels through non-hydrolytic binding. *Nature*, 360(6399), 79–81.
- Rabe, A., Disser, J., & Frömter, E. (1995). Cl⁻ channel inhibition by glibenclamide is not specific for the CFTR-type Cl⁻ channel. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 429(5), 659–62.
- Rabow, L. E., Russek, S. J., & Farb, D. H. (1995). From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABAA receptor research. *Synapse (New York, N.Y.)*, 21(3), 189–274.
- Ren, D. (2011). Calcium signaling in sperm: help from prostasomes. *Science signaling*, 4(173), 1–4.
- Ren, D., & Xia, J. (2010). Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(3), 165–175.
- Reuss, L., Costantin, J., & Bazile, J. (1987). Diphenylamine-2-carboxylate blocks Cl(-)-HCO₃⁻ exchange in Necturus gallbladder epithelium. *Am J Physiol*, 253(1 Pt 1), C80–C89.
- Riordan, J R, Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and

- characterization of complementary DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), 1066–73.
- Riordan, John R. (2005a). Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annual review of physiology*, 67, 701–18.
- Riordan, John R. (2005b). Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annual review of physiology*, 67, 701–718.
- Santi, C M, Orta, G., Salkoff, L., Visconti, P. E., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2013). *K⁺ and Cl⁻ channels and transporters in sperm function*. *Current topics in developmental biology* (Vol. 102, pp. 385–421).
- Santi, Celia M, Darszon, A., & Hernández-Cruz, A. (1996). A dihydropyridine-sensitive T-type Ca²⁺ current is the main Ca²⁺ current carrier in mouse primary spermatocytes. *The American journal of physiology*, 271(5 Pt 1), C1583–C1593.
- Santi, Celia M, Martínez-López, P., De la Vega-Beltrán, J. L., Butler, A., Alisio, A., Darszon, A., & Salkoff, L. (2010). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS letters*, 584(5), 1041–1046.
- Sato, Y., Son, J. H., & Meizel, S. (2000). The mouse sperm glycine receptor/chloride channel: cellular localization and involvement in the acrosome reaction initiated by glycine. *Journal of andrology*, 21(1), 99–106.
- Sato, Y., Son, J. H., Tucker, R. P., & Meizel, S. (2000). The zona pellucida-initiated acrosome reaction: defect due to mutations in the sperm glycine receptor/Cl(-) channel. *Developmental biology*, 227(1), 211–8.
- Schackmanns, R., & Chock PB. (1986). Alteration of Intracellular [Ca²⁺] in Sea Urchin Sperm by the Egg Peptide Speract. *The Journal of biological chemistry*, 261(19), 8719–8728.
- Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M., & Salkoff, L. (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. *The Journal of biological chemistry*, 273(6), 3509–3516.
- Schreiber, R., Hopf, A., Mall, M., Greger, R., & Kunzelmann, K. (1999). The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), 5310–5315.
- Schroeder, B. C., Cheng, T., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2008). Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell*, 134(6), 1019–1029.
- Schultz, B. D., Singh, a K., Devor, D. C., & Bridges, R. J. (1999). Pharmacology of CFTR chloride channel activity. *Physiological reviews*, 79(1 Suppl), S109–S144.

- Schulz, S., Jakubiczka, S., Kropf, S., Nickel, I., Muschke, P., & Kleinstein, J. (2006). Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males. *Fertility and sterility*, 85(1), 135–8.
- Schwiebert, E. M., Egan, M. E., Hwang, T. H., Fulmer, S. B., Allen, S. S., Cutting, G. R., & Guggino, W. B. (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell*, 81(7), 1063–73.
- Schwiebert, E. M., Morales, M. M., Devidas, S., Egan, M. E., & Guggino, W. B. (1998). Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2674–2679.
- Sears, C. L., Firoozmand, F., Mellander, A., Chambers, F. G., Eromar, I. G., Bot, a G., Scholte, B., et al. (1995). Genistein and tyrphostin 47 stimulate CFTR-mediated Cl⁻ secretion in T84 cell monolayers. *The American journal of physiology*, 269(6 Pt 1), G874–G882.
- Selvaraj, V., Asano, A., Page, J. L., Nelson, J. L., Kothapalli, K. S. D., Foster, J. a, Brenna, J. T., et al. (2010). Mice lacking FABP9/PERF15 develop sperm head abnormalities but are fertile. *Developmental biology*, 348(2), 177–189.
- Serrano, C. J., Treviño, C. L., Felix, R., & Darszon, A. (1999). Voltage-dependent Ca²⁺ channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm. *FEBS letters*, 462(1-2), 171–176.
- Shcheynikov N, Ko SB, Zeng W, Choi JY, Dorwart MR, Thomas PJ, & Muallem S. (2006). Regulatory interaction between CFTR and the SLC26 transporters. *Novartis Found Symp.* (pp. 177–286). Chichester, UK: Jhon Wiley & Sons Ltd.
- Shi, Q., & Roldan, E. R. (1995). Evidence that a GABAA-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Biology of reproduction*, 52(2), 373–381.
- Shuba, L. M., Asai, T., Pelzer, S., & McDonald, T. F. (1996). Activation of cardiac chloride conductance by the tyrosine kinase inhibitor, genistein. *British journal of pharmacology*, 119(2), 335–345.
- Shumaker, H., Amlal, H., Frizzell, R., Ulrich, C. D., & Soleimani, M. (1999). CFTR drives Na⁺-nHCO₃ cotransport in pancreatic duct cells: a basis for defective HCO₃ secretion in CF. *The American journal of physiology*, 276(1 Pt 1), C16–C25.
- Silber, S. J. (1994). A modern view of male infertility. *Reproduction, fertility, and development*, 6(1), 93–104.
- Sinclair, M. L., Wang, X. Y., Mattia, M., Conti, M., Buck, J., Wolgemuth, D. J., & Levin, L. R. (2000). Specific expression of soluble adenylyl cyclase in male germ cells. *Molecular reproduction and development*, 56(1), 6–11.

- Singh, a K., Sjöblom, M., Zheng, W., Krabbenhöft, A., Riederer, B., Rausch, B., Manns, M. P., et al. (2008). CFTR and its key role in in vivo resting and luminal acid-induced duodenal HCO₃⁻ secretion. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 193(4), 357–365.
- Singh, A. K., Riederer, B., Chen, M., Xiao, F., Krabbenhöft, A., Engelhardt, R., Nylander, O., et al. (2010). The switch of intestinal Slc26 exchangers from anion absorptive to HCO₃⁻ secretory mode is dependent on CFTR anion channel function. *American journal of physiology. Cell physiology*, 298(5), C1057–C1065.
- Sleight, S. B., Miranda, P. V., Plaskett, N.-W., Maier, B., Lysiak, J., Scrable, H., Herr, J. C., et al. (2005). Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biology of reproduction*, 73(4), 721–729.
- Stead, R., Hodson, M., Batten, J., Adams, J., & Jacobs, H. (1987). Amenorrhoea in cystic fibrosis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1987, 26(2), 187–195.
- Stein, D. M., & Fraser, L. R. (1984). Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation in vitro. *Gamete Research*, 10(3), 283–299.
- Stewart, A. K., Yamamoto, A., Nakakuki, M., Kondo, T., Alper, S. L., & Ishiguro, H. (2009). Functional coupling of apical Cl⁻ / HCO₃⁻ exchange with CFTR in stimulated HCO_3^- secretion by guinea pig interlobular pancreatic duct. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296(6), G1307–G1317.
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., & Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature*, 471(7338), 382–386.
- Stutts, M J, Canessa, C. M., Olsen, J. C., Hamrick, M., Cohn, J. a, Rossier, B. C., & Boucher, R. C. (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5225), 847–850.
- Stutts, M Jackson, Rossier, B. C., & Boucher, R. C. (1997). Cystic Fibrosis Transmembrane Protein Kinase A-mediated Regulation of Epithelial Sodium Kinetics. *J Biol Chem.*, 272(22), 14037–14040.
- Suarez, S S. (1996). Hyperactivated motility in sperm. *Journal of andrology*, 17(4), 331–335.
- Suarez, S S, Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B., & Powell, R. L. (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biology of reproduction*, 44(2), 375–381.
- Suarez, Susan S. (2008a). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *The International journal of developmental biology*, 52(5-6), 455–462.

- Suarez, Susan S. (2008b). Control of hyperactivation in sperm. *Human reproduction update*, 14(6), 647–57.
- Suarez, Susan S, & Dai, X. (1992). Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biology of reproduction*, 46(4), 686–91.
- Sullivan, S. K., Agellon, L. B., & Schick, R. (1995). Identification and partial characterization of a domain in CFTR that may bind cyclic nucleotides directly. *Current biology : CB*, 5(10), 1159–1167.
- Sutovsky, P. (2009). Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert reviews in molecular medicine*, 11(April), e1–e12.
- Tabcharani, J. a, Linsdell, P., & Hanrahan, J. W. (1997). Halide permeation in wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels. *The Journal of general physiology*, 110(4), 341–354.
- Tabcharani, J. A., Rommens, J. M., Hou, Y. X., Chang, X. B., Tsui, L. C., Riordan, J. R., & Hanrahan, J. W. (1993). Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature*, 366(6450), 79–82.
- Taddei, A., Folli, C., Zegarra-Moran, O., Fanen, P., Verkman, a S., & Galiotta, L. J. V. (2004). Altered channel gating mechanism for CFTR inhibition by a high-affinity thiazolidinone blocker. *FEBS letters*, 558(1-3), 52–56.
- Tanihara, F., Nakai, M., Men, N. T., Kato, N., Kaneko, H., Noguchi, J., Otoi, T., et al. (2014). Roles of the zona pellucida and functional exposure of the sperm-egg fusion factor “IZUMO” during in vitro fertilization in pigs. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, 85(4), 395–404.
- Tanphaichitr, N., Zheng, Y. S., Kates, M., Abdullah, N., & Chan, A. (1996). Cholesterol and phospholipid levels of washed and percoll gradient centrifuged mouse sperm: presence of lipids possessing inhibitory effects on sperm motility. *Molecular reproduction and development*, 43(2), 187–195.
- Teixeira, S., Sá, R., Grangeia, A., Silva, J., Oliveira, C., Ferráz, L., Alves, A., et al. (2013). Immunohistochemical analysis of CFTR in normal and disrupted spermatogenesis. *Systems biology in reproductive medicine*, 59(1), 53–59.
- Thiagarajah, J. R., Broadbent, T., Hsieh, E., & Verkman, A. S. (2004). Prevention of toxin-induced intestinal ion and fluid secretion by a small-molecule CFTR inhibitor. *Gastroenterology*, 126(2), 511–519.
- Tian, Y., Kongsuphol, P., Hug, M., Ousingawat, J., Witzgall, R., Schreiber, R., & Kunzelmann, K. (2011). Calmodulin-dependent activation of the epithelial calcium-dependent chloride channel TMEM16A. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(3), 1058–1068.

- Travis, a J., Merdiushev, T., Vargas, L. a, Jones, B. H., Purdon, M. a, Nipper, R. W., Galatioto, J., et al. (2001). Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Developmental biology*, 240(2), 599–610.
- Treviño, C. L., Felix, R., Castellano, L. E., Gutiérrez, C., Rodríguez, D., Pacheco, J., López-González, I., et al. (2004). Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca(2+) channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS letters*, 563(1-3), 87–92.
- Treviño, C. L., Serrano, C., Beltra, C., Felix, R., & Darszon, A. (2001). Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS letters*, 509, 119–125.
- Trezise, A. E., Linder, C. C., Grieger, D., Thompson, E. W., Meunier, H., Griswold, M. D., & Buchwald, M. (1993). CFTR expression is regulated during both the cycle of the seminiferous epithelium and the oestrous cycle of rodents. *Nature genetics*, 3(2), 157–164.
- Tsumura, T., Hazama, A., Miyoshi, T., Ueda, S., & Okada, Y. (1998). Activation of cAMP-dependent Cl⁻ currents in guinea-pig paneth cells without relevant evidence for CFTR expression. *The Journal of physiology*, 512(Pt 3), 765–777.
- Turner, R. M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, fertility, and development*, 18(1-2), 25–38.
- Turner, T. T. (2008). De Graaf's thread: the human epididymis. *Journal of andrology*, 29(3), 237–250.
- Vankeerberghen, a, Wei, L., Teng, H., Jaspers, M., Cassiman, J. J., Nilius, B., & Cuppens, H. (1998). Characterization of mutations located in exon 18 of the CFTR gene. *FEBS letters*, 437(1-2), 1–4.
- Vega-briceño, L. E. (2010). CFTR : Más que un canal de cloro. *Neumología pediátrica.cl*, 5(1), 10–14.
- Verkman, A. S., & Galiotta, L. J. V. (2009). Chloride channels as drug targets. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(2), 153–171.
- Visconti, P E, Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development (Cambridge, England)*, 121(4), 1129–1137.
- Visconti, P E, Galantino-Homer, H., Ning, X., Moore, G. D., Valenzuela, J. P., Jorgez, C. J., Alvarez, J. G., et al. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *The Journal of biological chemistry*, 274(5), 3235–3242.

- Visconti, P E, & Kopf, G. S. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of reproduction*, 59(1), 1–6.
- Visconti, P E, Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., Olds-Clarke, P., et al. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development (Cambridge, England)*, 121(4), 1139–1150.
- Visconti, P E, & Tezón, J. G. (1989). Phorbol esters stimulate cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation in hamster spermatozoa during in vitro capacitation. *Biology of reproduction*, 40(2), 223–231.
- Visconti, P E, Westbrook, V. a, Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., & Diekman, a B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of reproductive immunology*, 53(1-2), 133–150.
- Visconti, Pablo E, Krapf, D., De la Vega-Beltrán, J. L., Acevedo, J. J., & Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian journal of andrology*, 13(3), 395–405.
- Voltz, J. W., Brush, M., Steplock, D., Weinman, E. J., & Sikes, S. (2007). Phosphorylation of PDZ1 Domain Attenuates NHERF-1 Binding to Cellular Targets. *The Journal of biological chemistry*, 282(46), 33879–33888.
- Vredenburg-Wilberg, W. L., & Parrish, J. J. (1995). Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Molecular reproduction and development*, 40(4), 490–502.
- Walensky, L. D., & Snyder, S. H. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *The Journal of cell biology*, 130(4), 857–869.
- Walsh, K. B., & Wang, C. (1996). Effect of chloride channel blockers on the cardiac CFTR chloride and L-type calcium currents. *Cardiovascular research*, 32(2), 391–9.
- Wang, S., Raab, R. W., Schatz, P. J., Guggino, W. B., & Li, M. (1998). Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS letters*, 427(1), 103–108.
- Wassarman, P M. (1999). Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*, 96(2), 175–83.
- Wassarman, P M, Jovine, L., & Litscher, E. S. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology*, 3(2), E59–E64.

- Wassarman, Paul M. (2005). Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *Journal of cellular physiology*, 204(2), 388–391.
- Wassarman PM, & Albertini DF. (1994). The mammalian ovum. In E. . E. Knobil and J. D. Neill (Ed.), *In The Physiology of Reproduction*. (Second., pp. 79–122). New York.: Raven Press.
- Weinreich, F., Wood, P. G., Riordan, J. R., & Nagel, G. (1997). Direct action of genistein on CFTR. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 434(4), 484–491.
- Wennemuth, G., Westenbroek, R. E., Xu, T., Hille, B., & Babcock, D. F. (2000). CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm. *The Journal of biological chemistry*, 275(28), 21210–21217.
- Wertheimer, E. V, Salicioni, A. M., Liu, W., Trevino, C. L., Chavez, J., Hernández-González, E. O., Darszon, A., et al. (2008). Chloride Is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 283(51), 35539–35550.
- Wilke, M., Buijs-Offerman, R. M., Aarbiou, J., Colledge, W. H., Sheppard, D. N., Touqui, L., Bot, A., et al. (2011). Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 10 Suppl 2, S152–S171.
- Wistrom, C. A., & Meizel, S. (1993). Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl⁻ channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Developmental biology*, 159(2), 679–690.
- Wolgemuth, D. J., Manterola, M., & Vasileva, A. (2013). Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis. *The International journal of developmental biology*, 57(2-4), 159–168.
- Wong, P. Y. (1998). CFTR gene and male fertility. *Molecular human reproduction*, 4(2), 107–110.
- Woo, A. L., James, P. F., & Lingrel, J. B. (2002). Roles of the Na,K-ATPase alpha4 isoform and the Na⁺/H⁺ exchanger in sperm motility. *Molecular reproduction and development*, 62(3), 348–56.
- Xia, J., & Ren, D. (2009). Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels. *Biology of reproduction*, 80(6), 1092–1098.
- Xu, W. M., Shi, Q. X., Chen, W. Y., Zhou, C. X., Ni, Y., Rowlands, D. K., Yi Liu, G., et al. (2007). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9816–9821.

- Yanagimachi, R. (1969). In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *Journal of reproduction and fertility*, 18(2), 275–286.
- Yanagimachi, R. (1994a). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote (Cambridge, England)*, 2(4), 371–372.
- Yanagimachi, R. (1994b). Physiology of Reproduction. In E. Knobil and J.D. Neil (Ed.), *The physiology of reproduction*. (Second., pp. 189–317). New York, NY, USA: Raven Press, Ltd.
- Yang, D., Shcheynikov, N., Zeng, W., Ohana, E., So, I., Ando, H., Mizutani, A., et al. (2009). IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO₃⁻ secretion by stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct. *The Journal of clinical investigation*, 119(1), 193–202.
- Yeung, C. H., Barfield, J. P., & Cooper, T. G. (2006). Physiological volume regulation by spermatozoa. *Molecular and cellular endocrinology*, 250(1-2), 98–105.
- Yoo, D., Flagg, T. P., Olsen, O., Raghuram, V., Foskett, J. K., & Welling, P. A. (2004). Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *The Journal of biological chemistry*, 279(8), 6863–6873.
- Young, A., & Chu, D. (1990). Distribution of GABA_A , and GABA_B , Receptors in Mammalian Brain: Potential Targets for Drug Development. *Drug Development Research*, 21, 161–167.
- Zeng, X.-H., Yang, C., Kim, S. T., Lingle, C. J., & Xia, X.-M. (2011). Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K⁺ current in mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5879–5884.
- Zeng, Y., Clark, E., & Florman, H. (1995). Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Developmental biology*, 171, 554–563.
- Zeng, Y., Oberdorf, J. a, & Florman, H. M. (1996). pH regulation in mouse sperm: identification of Na⁽⁺⁾-, Cl⁽⁻⁾-, and HCO₃⁽⁻⁾-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Developmental biology*, 173(2), 510–520.
- Zhang, Z. R., McDonough, S. I., & McCarty, N. a. (2000). Interaction between permeation and gating in a putative pore domain mutant in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biophysical journal*, 79(1), 298–313.
- Zhang, Z.-R., Zeltwanger, N., & McCarty, N. (2000). Direct Comparison of NPPB and DPC as Probes of CFTR Expressed in Xenopus Oocytes. *Journal of Membrane Biology*, 175, 35–52.

- Zhou, J., Gugger, E. T., Tanaka, T., Guo, Y., Blackburn, G. L., & Clinton, S. K. (1999). Biochemical and Molecular Action of Nutrients Soybean Phytochemicals Inhibit the Growth of Transplantable Human Prostate Carcinoma and Tumor Angiogenesis in Mice 1 , 2. *J Nutr*, 129(9), 1628–1635.
- Zhu, L., & Inaba, K. (2011). Lipid rafts function in Ca²⁺ signaling responsible for activation of sperm motility and chemotaxis in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Molecular reproduction and development*, 78(12), 920–929.
- Zielenski, J., & Tsui, L. C. (1995). Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annual review of genetics*, 29, 777–807.

10 APÉNDICE

Artículo y capítulo en libro publicados como producto de los resultados de esta tesis:

- 1. Figueiras-Fierro D**, Acevedo JJ, Martínez-López P, Escoffier J, Sepúlveda FV, Balderas E, Orta G, Visconti PE, Darszon A. *Electrophysiological evidence for the presence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in mouse sperm*. Journal Cell Physiology Volume 228, Issue 3, pages 590-601. doi: 10.1002/jcp.24166.
- 2. Treviño CL**, Orta G, **Figueiras-Fierro D**, De la Vega-Beltran JL, Ferreira G, Balderas E, Darszon A. 2014. *Chapter 6: Cl channels and transporters in sperm physiology*. in Sexual Reproduction in Animals and Plants. Springer Open (ed). Tokio, Japan. Pages 59-84.

Electrophysiological Evidence for the Presence of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) in Mouse Sperm

DULCE FIGUEIRAS-FIERRO,¹ JUAN JOSÉ ACEVEDO,² PABLO MARTÍNEZ-LÓPEZ,¹ JESSICA ESCOFFIER,³ FRANCISCO V. SEPÚLVEDA,⁴ ENRIQUE BALDERAS,¹ GERARDO ORTA,¹ PABLO E. VISCONTI,^{3,*} AND ALBERTO DARZON^{1,*}

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología,

Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos, Mexico

²Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos,

Cuernavaca Morelos, Mexico

³Department of Veterinary and Animal Science, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts

⁴Centro de Estudios Científicos (CECs), Valdivia, Chile

Mammalian sperm must undergo a maturational process, named capacitation, in the female reproductive tract to fertilize the egg. Sperm capacitation is regulated by a cAMP/protein kinase A (PKA) pathway and involves increases in intracellular Ca^{2+} , pH, Cl^- , protein tyrosine phosphorylation, and in mouse and some other mammals a membrane potential hyperpolarization. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a Cl^- channel modulated by cAMP/PKA and ATP, was detected in mammalian sperm and proposed to modulate capacitation. Our whole-cell patch-clamp recordings from testicular mouse sperm now reveal a Cl^- selective component to membrane current that is ATP-dependent, stimulated by cAMP, cGMP, and genistein (a CFTR agonist, at low concentrations), and inhibited by DPC and CFTR_{inh}-172, two well-known CFTR antagonists. Furthermore, the Cl^- current component activated by cAMP and inhibited by CFTR_{inh}-172 is absent in recordings on testicular sperm from mice possessing the CFTR ΔF508 loss-of-function mutation, indicating that CFTR is responsible for this component. A Cl^- selective like current component displaying CFTR characteristics was also found in wild type epididymal sperm bearing the cytoplasmic droplet. Capacitated sperm treated with CFTR_{inh}-172 undergo a shape change, suggesting that CFTR is involved in cell volume regulation. These findings indicate that functional CFTR channels are present in mouse sperm and their biophysical properties are consistent with their proposed participation in capacitation.

J. Cell. Physiol. 228: 590–601, 2013. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Mouse epididymal sperm need to undergo a maturational process in the female reproductive tract, named capacitation, to become competent to fertilize the female gamete and generate a new individual. This complex process involves plasma membrane reorganization, cholesterol removal, protein tyrosine phosphorylation, membrane hyperpolarization (in mouse and other species), and increases in intracellular pH (pH_i), Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), and Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$) (Darszon et al., 2005; Hernandez-Gonzalez et al., 2007; Krapf et al., 2010; Santi et al., 2010; McPartlin et al., 2011). Capacitation prepares sperm to undergo a physiologically induced exocytotic reaction, known as acrosome reaction (AR; Yanagimachi, 1994; Visconti et al., 2011), and is accompanied by the development of hyperactivated motility, an asymmetric mode of flagellar beating (Suarez and Ho, 2003). Sperm protein tyrosine phosphorylation, hyperpolarization and hyperactivation depend on a cAMP/protein kinase A (PKA) pathway, where a bicarbonate (HCO_3^-)-dependent soluble adenylylase (SACY) is a key player (Buck et al., 1999; Chen et al., 2000; Kaupp and Weyand, 2000; Esposito et al., 2004; Hess et al., 2005). HCO_3^- is essential for capacitation to stimulate SACY, yet how it enters sperm is not fully understood (reviewed in Salicioni et al., 2007).

In mouse sperm, the capacitation-associated hyperpolarization is thought to result from activity changes in K^+ channels (Slo3 (Santi et al., 2010; Zheng et al., 2011)) and inward rectifiers (Muñoz-Garay et al., 2001; Acevedo et al., 2006), amiloride sensitive epithelial Na^+ channels (ENaCs;

Hernandez-Gonzalez et al., 2006) and the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR; Hernandez-Gonzalez et al., 2007; Xu et al., 2007). CFTR channels are known to modulate ENaCs (and vice versa) in several tissues (Schreiber et al., 1999;

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Contract grant sponsor: DGAPA;
Contract grant number: IN211809.
Contract grant sponsor: CONACyT;
Contract grant numbers: 49113, 128566.
Contract grant sponsor: NIH;
Contract grant numbers: R01 HD44044, HD038082.
Contract grant sponsor: Conicyt PFB.

*Correspondence to: Alberto Darszon, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos, México. E-mail: darszon@ibt.unam.mx

**Correspondence to: Pablo E. Visconti, Department of Veterinary and Animal Science, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts. E-mail: pvisconti@vasci.umass.edu

Manuscript Received: 5 September 2011

Manuscript Accepted: 17 July 2012

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 25 July 2012.
DOI: 10.1002/jcp.24166

Kunzelmann et al., 2000; Berdiev et al., 2009), and evidence indicates this may occur in mouse sperm (Hernandez-Gonzalez et al., 2007; Escoffier et al., 2012). On the other hand, it is known that external Cl^- is required for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation, hyperactivation, the Zona pellucida (ZP)-induced AR and fertilization (Wertheimer et al., 2008). The Cl^- equilibrium potential (E_{Cl^-}) for non-capacitated sperm has been estimated at ~ -31 and ~ -24.5 mV for capacitated sperm. Furthermore, it has been shown that $[\text{Cl}^-]_i$ increases during capacitation (Hernandez-Gonzalez et al., 2007). Altogether, these data suggest that Cl^- has an essential role in the regulation of this process (Wertheimer et al., 2008).

The CFTR channel belongs to the ATP-binding cassette (ABC) transporter family (Riordan et al., 1989). It has two transmembrane domains (TMD1 and TMD2), each comprised of six membrane-spanning regions, two nucleotide-binding domains (NBD1 and NBD2; Holland and Blinght, 1999; Higgins and Linton, 2004) and a regulatory (R) domain containing potential sites for phosphorylation by PKA and protein kinase C (Riordan et al., 1989; Baukowitz et al., 1994; Hwang et al., 1994). The TMDs contribute to pore formation, while NBD and R domains control channel activity. CFTR is expressed in respiratory airways, the digestive apparatus and the reproductive tracts (Poulsen et al., 1994; Quinton, 1999). It is a Cl^- channel activated by PKA (Anderson et al., 1991; Sheppard and Welsh, 1999; Li et al., 2007) and regulated by Cl^- , ATP levels, membrane potential, and protein-protein interactions (Schwiebert et al., 1998; Boucher, 2004; Riordan, 2005).

Certain CFTR mutations produce cystic fibrosis, an inherited autosomal recessive disease leading to progressive lung and pancreatic insufficiency, and to severe fertility reduction (Silber, 1994; Guggino and Stanton, 2006). Infertility in cystic fibrosis patients is mostly due to congenital bilateral absence of the vas deferens with resultant obstructive azoospermia (Wong, 1998). Cystic fibrosis patients producing sperm may have a specific defect in sperm-ZP penetration (Silber, 1994) and up to 50% of the sperm are dimorphic. In addition, it has been proposed that CFTR participates in spermatogenesis (Treize et al., 1993; Gong et al., 2001). Taking into account that the frequency of CFTR heterozygosity is twofold higher in infertile men than in the general population, mutations in this channel may lead to male infertility (Schultz et al., 2006). However, the physiological roles of CFTR in mammalian reproductive physiology are not well understood.

Immunological and pharmacological evidence has indicated the presence of CFTR channels in human and mouse sperm and their participation in capacitation (Hernandez-Gonzalez et al., 2007; Xu et al., 2007). Here we report whole-cell patch-clamp recordings from testicular mouse sperm that reveal a Cl^- selective current component that is ATP-dependent and stimulated by cAMP, cGMP, and genistein, a CFTR agonist (at low concentrations). This current is inhibited by diphenylamine-2-carboxylic acid (DPC) and CFTR_{inh}-172, two well-known CFTR antagonists (Schultz et al., 1999; Zhang et al., 2000; Ma et al., 2002; Taddei et al., 2004; Caci et al., 2008). Notably, the Cl^- current component activated by cAMP and inhibited by CFTR_{inh}-172 is absent in recordings on testicular sperm from the CFTR ΔF508 loss-of-function mutant mice, showing that CFTR is responsible for this component. Furthermore, a similar current component was also found in wild type epididymal sperm bearing the cytoplasmic droplet. These findings support the presence of functional CFTR channels in mouse sperm and are consistent with their proposed participation in capacitation. In addition, consistent with the well-known role of Cl^- channels in cell volume regulation (Yeung et al., 2005), our results indicate that CFTR_{inh}-172 causes shape changes in mouse sperm.

Materials and Methods

Materials

Dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP), dibutyryl cyclic GMP (db-cGMP), 8-bromo cyclic GMP (8Br-cGMP), 8-bromo adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (8Br-cAMP), diphenyl-amine-2-carboxylate (DPC), genistein, *n*-methyl-D-glucamine (NMDG), sodium gluconate (GluNa), NMDG-metanesulphonate (NMDG-MeSO₃), NMDG-gluconate (NMDG-gluconate), and 3-[(3-trifluoromethyl)phenyl]-5-[(4 carboxyphenyl)methylene]-2-thioxo-4thiazolidinone (CFTR_{inh}-172) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Stock solutions were prepared in DMSO, except 8Br-cGMP and 8Br-cAMP that were solubilized in water, and stored at -20°C until use. Db-cAMP, db-cGMP, 8Br-cGMP, and 8Br-cAMP were prepared fresh and used at the indicated concentration. DMSO in medium was always less than 0.1% and alone had no effect on channel activity.

Mouse sperm preparations

All experimental protocols were approved by the local Animal Care and Bioethics Committee. Testicular and epididymal sperm were obtained from 3-month-old CD-1 mice as previously described (Acevedo et al., 2006; Martínez-López et al., 2011). Mice carrying the F508del *Cftr* mutant gene (Van Doorninck et al., 1995; French et al., 1996) and generously provided by Dr. B. J. Scholte from Erasmus MC Rotterdam, the Netherlands, were also used. The genetic background of these mice is C57Bl/6j obtained by 13 backcrosses to wt from the original 129/FVB strain (Wilke et al., 2011). Homozygous mutants were obtained by breeding heterozygous mice and fed with normal chow and acidified water ad lib. Genotyping was done by PCR as described (Van Doorninck et al., 1995).

Testicles were excised after cervical dislocation and suspended on ice-cold dissociation solution containing (in mM): 130 NaCl, 3 KCl, 10 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 5 HEPES, and 10 glucose (pH 7.4). The tunica albuginea was removed and the seminiferous tubules separated using dissecting tweezers. Tubules were dispersed into individual cells and/or synaplasts and testicular sperm by mechanical dispersion using Pasteur pipettes. The cells were stored at 4°C until assayed. Subsequently ~ 300 μl aliquots of cell suspension were dispensed into a recording chamber (1 ml total volume) and subjected to electrophysiological recording. Cauda epididymal mouse sperm were collected by placing minced cauda epididymis in Whittens medium. After 20 min the sperm suspension was washed in 10 ml of the same medium by centrifugation at $800\times g$ for 10 min at room temperature. Sperm were then resuspended in the indicated medium and used for electrophysiology.

Whole cell currents from mouse sperm

Whole-cell ionic currents were obtained by patch-clamping the sperm cytoplasmic droplet in testicular and epididymal sperm and analyzed as reported (Ren and Xia, 2010; Kirichok and Lishko, 2011). Recordings were performed using an Axopatch 200A patch-clamp amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at room temperature 22°C . Pulse protocols, data capture and analysis were performed using pCLAMP 9 software (Axon, Molecular Devices, Palo Alto, CA), Origin 7.5 (Microcal Software, Northampton MA) and Sigma Plot 10 (SYSTAT Software, Foster City). The currents were captured on-line at a sampling rate of 5–10 kHz and filtered (2–5 kHz; internal 4-pole Bessel filter) using a computer attached to a Digidata 1200 interface (Axon). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass (Kimble[®]) and had resistances of 8–10 M Ω when filled with internal solution. All external and internal solutions were adjusted with sucrose to have 300 and 290 mOsm, respectively. Initial experiments were performed with a physiological extracellular solution containing (in mM): 130 NaCl, 3 KCl, 10 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 5 HEPES,

10 glucose, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The internal solution contained (in mM): 120 CsCl, 10 CsF, 4.6 CaCl₂, 10 EGTA (free Ca²⁺ 75 nM), 5 HEPES, adjusted to pH 7.3 with CsOH. To isolate CFTR Cl⁻ currents, extracellular solutions contained (in mM): 145 NMDG-Cl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, adjusted to pH 7.2 with NMDG or alternatively (in mM): 145 TEACl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, adjusted to pH 7.2 with NMDG. The internal solution contained (in mM): 35 NMDG-Cl, 110 NMDG-gluconate, 2 CaCl₂, 2 EGTA (free Ca²⁺ ~10 μM), 2 MgCl₂, 3 ATP-Mg, 10 HEPES, adjusted to pH 6.8 with NMDG. Experiments were also carried out lowering the internal solution free Ca²⁺ concentration to a physiological level of ~60 nM by increasing EGTA to 5 mM or basically eliminating it using 10 mM EGTA. In these latter experiments extracellular Ca²⁺ was also removed (Fig. 3G, H and inset). Free Ca²⁺ concentration was estimated using MaxChelator software V2.00 (Chris Patton, Stanford University, USA). ATP was absent inside the patch pipette only when its role was examined and in Figure 1. To confirm that currents were

mainly carried by Cl⁻, NMDG-Cl was replaced by NMDG-MeSO₃ or NMDG-gluconate in the external solution (Fig. 2C). Db-cAMP, 8Br-cGMP, genistein, DPC, and CFTR_{inh}-172 in the extracellular solution were applied using a perfusion system (ALA Scientific Instruments, Great Neck, NY). Reversibility was examined after perfusing external solution without inhibitor or without agonist and inhibitor for 5 min. Since stimulation by cyclic nucleotides of CFTR is reversible in minutes (Tsumura et al., 1998; Riordan, 2005), recovery was estimated with respect to the control current, except for the experiments in epididymal sperm. Unless indicated otherwise, currents were evoked from a holding potential of -40 mV, with pulses from -80 to 100 mV in 20 mV increments and lasting 600 ms. In all cases capacitive currents were compensated electronically and no leak current compensation was used.

Sperm analysis by flow cytometry

Sperm were obtained from CDI male mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) by manually triturating cauda

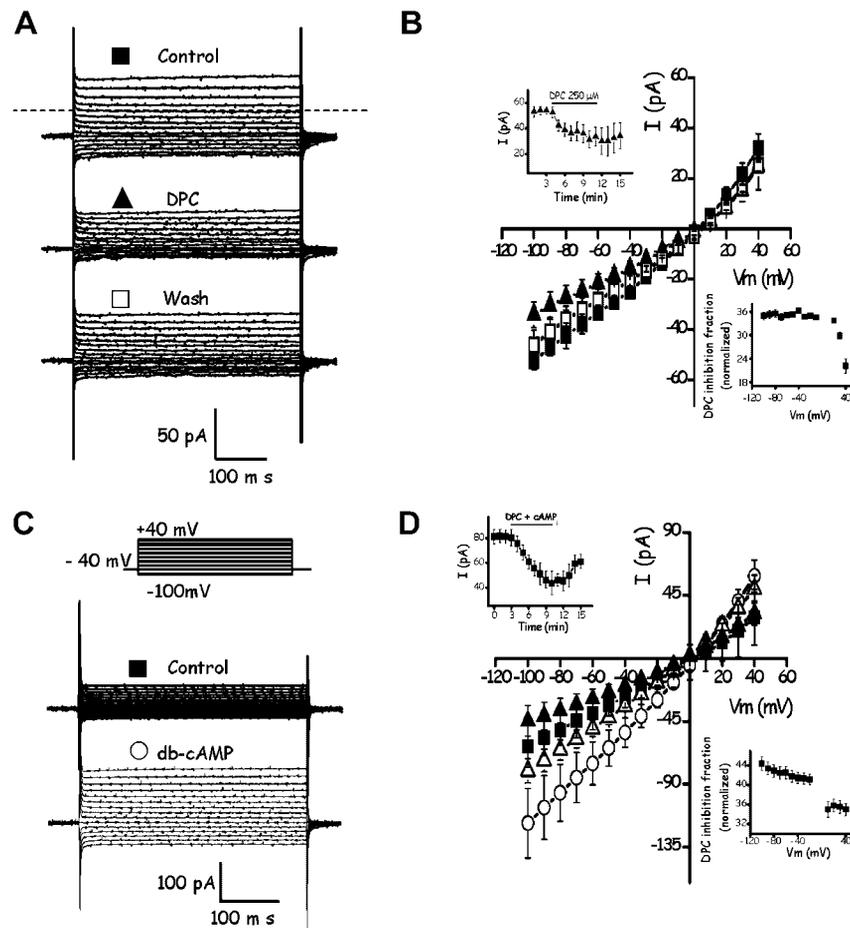


Fig. 1. DPC inhibits and db-cAMP stimulates the macroscopic currents of testicular sperm. **A**, representative macroscopic currents before (■ Control), during (▲ DPC), and after (□ Wash) DPC (250 μM) exposure. The currents were evoked using 200 ms square test pulses from a holding potential of -40 mV to voltages between -100 to 40 mV in 10 mV increments. The dotted line in **A** represents zero current. **B**, mean whole cell current-voltage (*I*-*V*) relationships recorded in **A**. Addition of 250 μM DPC (▲) reduced the normalized currents ~35% at -100 mV with respect to the control (■). Current inhibition by DPC is partially reversible (□ Wash). The top inset in the figure shows the kinetics of DPC inhibition at -100 mV. Symbols represent the means ± SD of 18 cells. Some SD bars were smaller than the symbols. The bottom inset in the figure depicts the DPC percent inhibition of the currents as a function of voltage. Symbols represent the means ± SEM of six independent experiments. **C**, db-cAMP (○) significantly increased control currents recorded under physiological ionic conditions. db-cAMP (100 μM) stimulated by ~89% the control sperm currents. **D**, *I*-*V* relationships for the currents in **C**. The top inset in the figure illustrates the kinetics of DPC inhibition of the currents activated by cAMP at -100 mV. Symbols represent the means ± SD of 18 cells. Some SD bars were smaller than the symbols. The bottom inset shows the DPC percent inhibition of the cAMP activated currents as a function of voltage. Symbol represents the means ± SEM of six experiments. Currents were normalized with respect to the maximum current of the control at -100 mV.

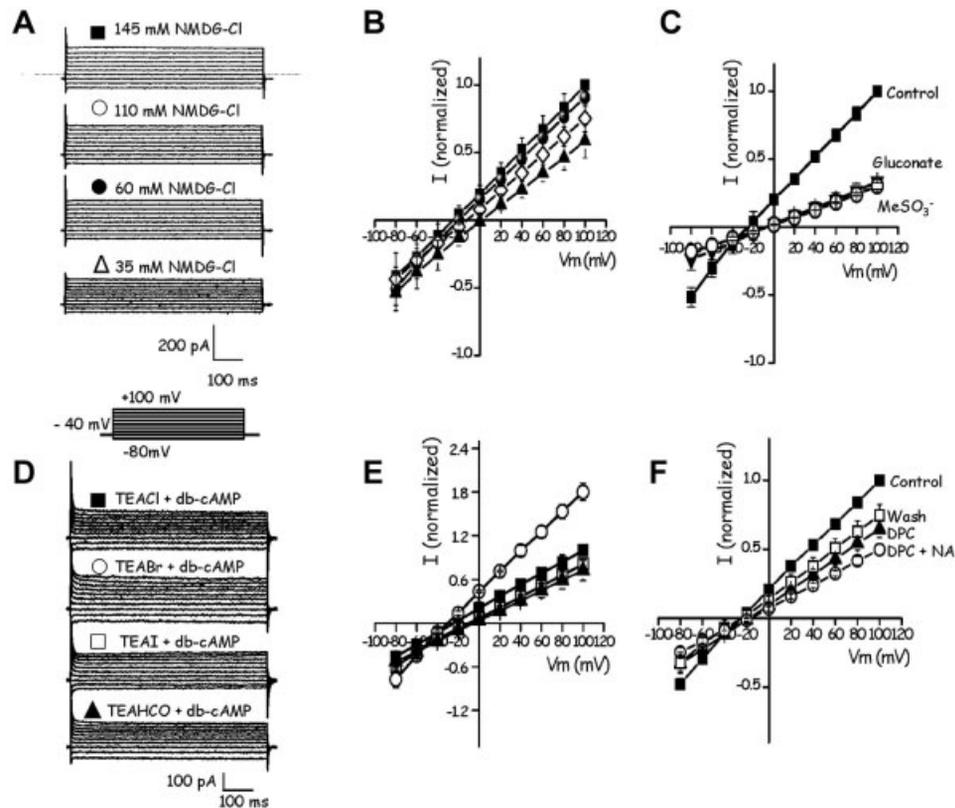


Fig. 2. Effect of extracellular Cl^- concentration on whole-cell currents in testicular mouse sperm. **A:** Whole-cell Cl^- currents recorded in the presence of 35 mM intracellular Cl^- (as NMDG-Cl) and different extracellular Cl^- concentrations (mM): 145 NMDG-Cl (■), 110 NMDG-Cl (○), 60 NMDG-Cl (●) y 35 NMDG-Cl (△). The currents were recorded by applying square voltage pulses from a holding potential of -40 mV to test potentials ranging from 100 to -80 mV in 20 mV steps. The applied voltage protocol is shown between A and D. **B:** I-V relationships of the currents in (A), showing the change in zero-current values (reversal potential, E_{rev}) as extracellular Cl^- was reduced. **C:** I-V plots illustrating the current changes that result when external Cl^- (■) is replaced by MeSO_3^- (○) or gluconate (▼). Symbols represent the means \pm SEM of five experiments. Some SEM bars were smaller than the symbols. **D:** Whole-cell currents recorded in the presence of extracellular Cl^- , Br^- , I^- , and HCO_3^- , respectively. The currents were obtained from sperm exposed to 145 mM TEA salts of the following external anions Cl^- (■), Br^- (○), I^- (□), and HCO_3^- (▲), respectively, after stimulation with db-cAMP. The applied voltage protocol is shown under (A). **E:** I-V curves obtained from the currents in (D). Replacement of external Cl^- by Br^- , I^- , and HCO_3^- in these experiments shifted E_{rev} giving a permeability selective sequence of $\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{HCO}_3^-$. Symbols represent the means \pm SEM of three experiments. **F:** I-V curve shows blockage by DPC (250 μM , ▲) and additional inhibition by NA (50 μM , ○) of the basal sperm Cl^- currents (■). The inhibitory effect of blockers was partially reversible (□ Wash). All pipette solutions contained ATP. Symbols represent the means \pm SEM of five experiments; some SEM bars were smaller than symbols. The currents were normalized with respect to the Cl^- current of the control (145 mM external Cl^-) at 100 mV.

epididymis in a 1 ml drop of Whitten's HEPES-buffered medium. This medium does not support capacitation unless supplemented with 5 mg/ml bovine serum albumin (BSA, fatty acid-free) and 15 mM of NaHCO_3 . After 10 min, the fraction of motile sperm was diluted four times in medium for capacitation, adding NaHCO_3 and BSA. Sperm were incubated in capacitation medium at 37°C for 60 min. To test the effect of CFTR_{inh-172} inhibitor on capacitation, sperm were preincubated with the inhibitor in non-capacitating medium for 15 min prior to beginning of capacitating period. Before assaying the sperm by flow cytometry, sperm suspensions were filtered through a 100- μm nylon mesh (Small Parts, Inc. Miami Lakes, FL, USA). Analyses were conducted using a LSR II flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) by using a 488-nm argon excitation laser. Recording of scatter properties of all events stopped when 50,000 events were reached. Two dimensional plots of sideways- (SSC) and forward-scatter (FSC) properties were obtained using FlowJo™ software v7.6 (Adam Treister and Mario Roederer, Tree Star, Inc. USA). FSC and SSC light properties are proportional to the cell-surface area (size) and the granularity of the cell, respectively.

Statistical analysis

Most data are expressed as the means \pm SEM of n independent experiments. Only Figures 1B, D and 3B show the raw values of the currents with the SD to appreciate their magnitude and variability. The means were compared using paired Student's t -test and $P = 0.05$ was considered to be the limit of statistical significance.

RESULTS

Previously we and others have shown the presence of CFTR in sperm using immunological detection and specific inhibitors; however, CFTR currents have not been characterized before. To directly determine the functional presence of CFTR channels, we recorded whole-cell currents by sealing at the cytoplasmic droplet of mouse testicular sperm (Santi et al., 2010; Kirichok and Lishko, 2011). Initially currents were evoked in cells exposed to physiological external solution (see Materials and Methods Section) from a -40 mV holding potential by square voltage steps, lasting 300 ms, from -100 to 40 mV in 10 mV increments (Fig. 1A). At positive potentials the

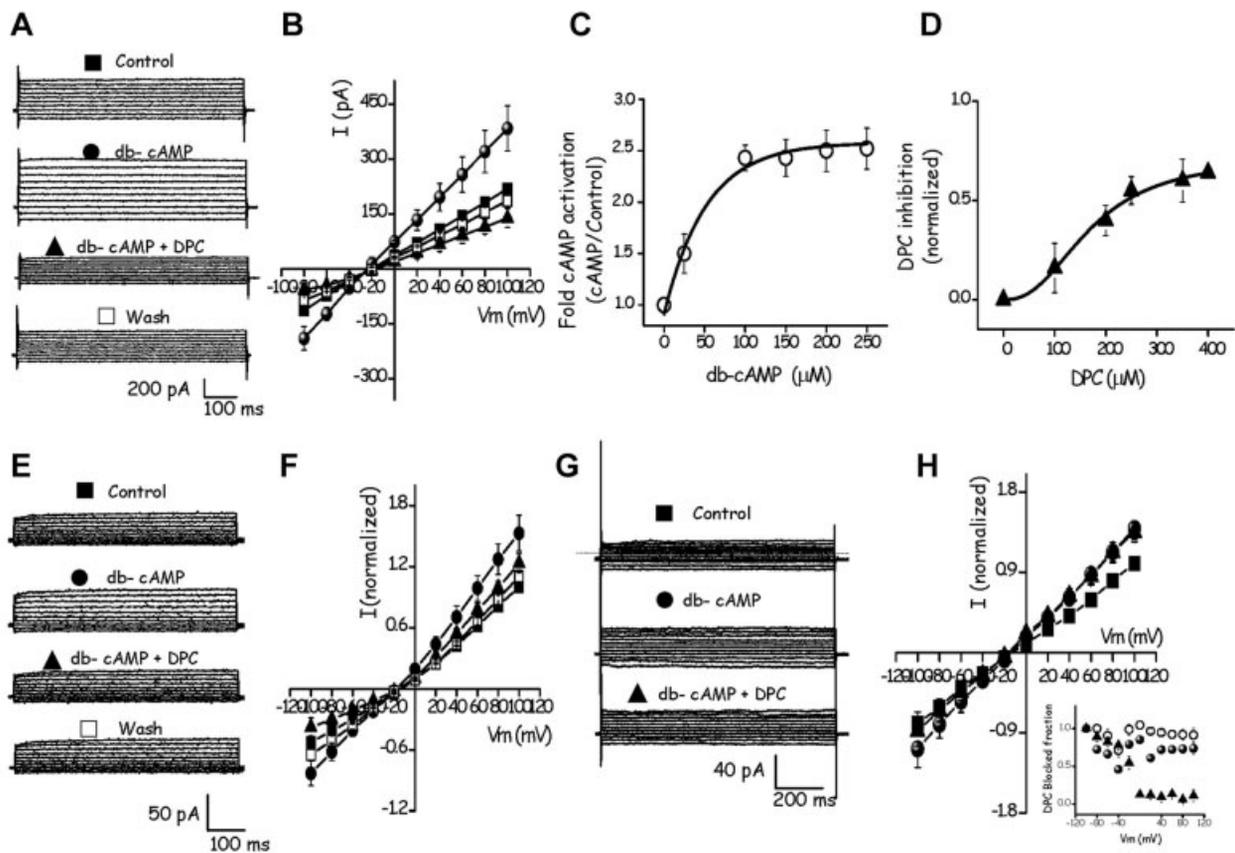


Fig. 3. DPC inhibits the db-cAMP stimulated whole-cell Cl^- currents in testicular mouse sperm in a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and voltage dependent manner. (A) Currents were obtained applying a voltage protocol as in Figure 2A, to sperm exposed to Cl^- recording solutions (external: 145 NMDG-Cl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 HEPES, adjusted to pH 7.2 with NMDG/internal: 35 NMDG-Cl, 110 NMDG-gluconate, 2 CaCl_2 , 2 EGTA (free $\text{Ca}^{2+} \sim 10 \mu\text{M}$), 2 MgCl_2 , 3 ATP-Mg, 10 HEPES, adjusted to pH 6.8 with NMDG). Control Cl^- currents (■ Control) were significantly stimulated by extracellular db-cAMP (100 μM ; ● db-cAMP) and inhibited following the addition of extracellular DPC (250 μM ; ▲ db-cAMP + DPC). DPC inhibition was partially reversible (□ Wash). (B) I-V relationships of the currents in (A). Symbols represent the means \pm SD of six cells. Some SD bars were smaller than the symbols. (C) Dose-response curve for db-cAMP on the whole-cell Cl^- currents in testicular mouse sperm. Fold activation of macroscopic Cl^- current at +100 mV plotted as a function of [db-cAMP] (○). A Hill equation was adjusted to the data (solid line) yielding an $\text{EC}_{50} = \sim 35 \mu\text{M}$. (D) Fractional block of macroscopic Cl^- current as a function of [DPC] at -80 mV (▲), blockade was significantly inhibited by 250 μM DPC (▲ db-cAMP + DPC). This effect is partially reversible (□ Wash). (E) I-V relationships of the currents in (E). (G) In the absence of external and internal Ca^{2+} (see Materials and Methods Section) db-cAMP increased control currents (● db-cAMP) which were inhibited by 250 μM DPC only at negative potentials (▲ db-cAMP + DPC). (H) I-V relationship of the currents in (G). The inset in the figure shows the DPC blocked fraction of the currents as a function of voltage and $[\text{Ca}^{2+}]_i$. All pipette solutions contained ATP. Symbols represent the means \pm SEM of six independent experiments (some SEM bars were smaller than symbols) with the exception of (B) which shows SDs, and (F) and (H) where $n = 3$. Current-voltage relations (B, F, and H) show data normalized with respect to the control Cl^- current measured at +100 mV.

currents rapidly activate and remain constant over the employed time window. The currents at negative potentials are slightly smaller than those at positive potentials (compare slopes of the I-V curves in Fig. 1B). Addition of DPC (250 μM), a CFTR inhibitor, reduced the current at -100 mV by $35 \pm 5\%$ ($n = 6$; Fig. 1A middle) in a partially reversible manner (Fig. 1A bottom). Figure 1B illustrates I-V curves obtained from experiments in Figure 1A. The top inset in Figure 1B illustrates the time course of DPC inhibition of the currents at -100 mV ($n = 18$). The bottom inset in Figure 1B shows the voltage dependence of the DPC percent inhibition ($n = 6$) which is similar to that reported earlier for heterologously expressed CFTR (McCarty et al., 1993).

Because cAMP-dependent phosphorylation is a prerequisite for CFTR function, we also examined the effect of a membrane-permeable cAMP analog (db-cAMP). Addition of db-cAMP (100 μM) activated the currents by $87 \pm 2\%$ ($n = 6$) at -100 mV in physiological extracellular solution (Fig. 1C, bottom). Part D

illustrates the I-V curves obtained from experiments shown in Figure 1C. In addition, we also recorded the currents with cAMP (100 μM) in the pipette (Fig. 1D, open triangles). The top inset in Figure 1D illustrates the time course of DPC inhibition of the intracellular cAMP activated currents at -100 mV ($n = 18$). The bottom inset in Figure 1D again shows that the DPC percent inhibition is voltage dependent ($n = 6$).

The experiments described above were carried out using physiological solutions therefore several types of channels may contribute to the currents. However, the results show that there is a cAMP and DPC sensitive component that could be due to CFTR. DPC at similar concentrations can also inhibit Ca^{2+} activated Cl^- channels (CaCCs), which at an estimated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of 75 nM would be activated $\sim 30\%$ (Arreola et al., 1996), and other cAMP stimulated Cl^- currents (Tsumura et al., 1998). The DPC-resistant current recorded under these conditions reflects the contribution of other ionic channels present in sperm (Santi et al., 2010; Martínez-López et al., 2011).

To further establish the functional presence of CFTR channels in mouse sperm, we modified the ionic composition of the solutions to determine the selectivity of the DPC-sensitive currents and included 3 mM ATP in the pipette solution in all further experiments unless indicated. This was done by substituting all monovalent cations by the non-permeant NMDG and following the reversal potential (E_{rev}) at different extracellular Cl^- concentrations (NMDG-Cl), keeping $[Cl^-]_i$ at 35 mM (Fig. 2A). Panel B of this figure illustrates the I-V curves obtained at different external Cl^- concentrations, where the E_{rev} values are consistent with the theoretical E_{Cl^-} values calculated from the Nernst equation (Table 1). As expected, replacement of most Cl^- (95%) in the external solution with $MeSO_3^-$ or gluconate $^-$, two impermeant anions, significantly decreased the current, eliminated the DPC inhibition and shifted E_{rev} away from E_{Cl^-} (-24.5 mV) to -2.2 ± 0.8 mV ($MeSO_3^-$, $n = 5$) and -3 ± 0.6 mV (gluconate, $n = 5$; Fig. 2C). Furthermore, experiments comparing E_{rev} (Table 2) for sperm exposed to different external anions and stimulated with db-cAMP gave a selectivity sequence $Br^- \geq Cl^- > I^- > HCO_3^-$ (see Fig. 2E), in agreement with that displayed by heterologously expressed CFTR (Anderson et al., 1991). Figure 2D shows whole-cell currents recorded in these conditions. Together, these results indicate that the fraction of current inhibited by DPC corresponds to sperm Cl^- currents that have a component most likely conducted through CFTR.

As CFTR may not be the only Cl^- channel in mouse sperm and our internal solution had $\sim 10 \mu M$ free Ca^{2+} we performed experiments in the presence of niflumic acid (NA), an inhibitor better known for blocking Ca^{2+} activated Cl^- channels ($IC_{50} \sim 10 \mu M$; Hartzell et al., 2005), to examine this latter channel's contribution. Using Cl^- as the main charge carrier, we first exposed sperm to 250 μM DPC, which should block most CFTR current ($IC_{50} = 175 \mu M$, see Fig. 3G) and partially affect CaCCs (Schroeder et al., 2008), and then added 50 μM NA which significantly increased inhibition of the Cl^- currents from $37 \pm 3\%$ to $50 \pm 0.4\%$ ($n = 5$; Fig. 2F). The DPC- and NA-induced inhibition largely reversed upon washing ($74.5 \pm 0.4\%$; Fig. 2F; $n = 5$), as described for heterologously expressed CFTR experiments (Schultz et al., 1999) and Ca^{2+} activated Cl^- channels in *Xenopus* oocytes (Hartzell et al., 2005).

To dissect the contribution of both CFTR and CaCCs to the total Cl^- currents in mouse testicular sperm we compared recordings with 10 μM (Fig. 3A and B) and 60 nM free Ca^{2+} (Fig. 3E and F) inside the pipette, and without Ca^{2+} in the pipette and in the external media (Fig. 3G and H). Figure 3A shows that 100 μM db-cAMP significantly increased the current by $75 \pm 12\%$ ($+100$ mV, $n = 9$). A concentration-response study indicated an IC_{50} of $\sim 35 \mu M$ for db-cAMP (Fig. 3C), which is close to that described for heterologously expressed CFTR (Sullivan et al., 1995). As expected, the addition of this permeant cAMP analog shifted the E_{rev} of the activated currents closer to the theoretical E_{Cl^-} of -31.9 mV (Fig. 3B) and potentiated the DPC inhibition at 250 μM of the Cl^- currents by $69.8 \pm 10\%$ at

TABLE 1. Reversal potential (E_{rev}) data obtained from the currents in sperm and theoretical E_{Cl^-} values at different extracellular Cl^- concentrations

Cl^- concentration (mM; bath solution ^a /pipette solution ^b)	Experimental E_{rev} (mV)	Theoretical E_{Cl^-} (mV)
145/35	-24.5 ± 0.4	-31.9
110/35	-22.9 ± 0.2	-25.4
60/35	-11.5 ± 0.2	-11
35/35	$+1.4 \pm 0.2$	0

The data represents the means \pm SEM of six experiments.

^aBath solutions contained (in mM): 145 (110, 60, or 35) NMDG-Cl, 0 (35, 65, or 110) NMDG-gluconate, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, adjusted to pH 7.2/NMDG.

^bThe pipette solution contained (in mM): 35 NMDG-Cl, 110 NMDG-gluconate, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 3 ATP-Mg, 2 EGTA, 10 HEPES, adjusted to pH 6.8/NMDG.

TABLE 2. Permeability of CFTR channels to intracellular anions in mouse sperm

Extracellular anion	E_{rev} (mV)	P_X/P_{Cl}	n
Bromide	-30.2 ± 1.2	1.2	3
Chloride	-26.5 ± 1.0	1	3
Iodide	-9.3 ± 1.8	0.54	3
Bicarbonate	-6.3 ± 1.1	0.48	3

Summary of mean reversal potentials and permeability ratios measured with different extracellular anions in mouse sperm. See Materials and Methods Section for details.

-80 mV (Fig. 3A and B). This inhibition was partially reversible (Fig. 3A bottom and B) and displayed an IC_{50} of $\sim 175 \mu M$ (Fig. 3D), similar to the previously observed inhibition on heterologously expressed CFTR (Zhang et al., 2000). However, the Hill coefficient (n_H) of the DPC blockade obtained was ~ 3 and not 1 as anticipated for CFTR alone (Zhang et al., 2000). This result is consistent with the presence in mouse sperm of both CFTR and CaCCs, whose n_H is ~ 3 (Qu et al., 2003). Experiments performed using 8Br-cAMP instead of db-cAMP yielded similar results ($n = 3$; not shown).

Figure 3E and F shows that at 60 nM $[Ca^{2+}]_i$ db-cAMP increased the current by $53 \pm 8\%$ at $+100$ mV ($n = 3$, \pm sd). The DPC blockade at positive potentials, where CFTR is not inhibited by this compound, depends on $[Ca^{2+}]_i$. At $+100$ mV blockade decreased from $63.8 \pm 25\%$ ($n = 9$, \pm sd) at 10 μM to $19.3 \pm 6.8\%$ ($n = 6$, \pm sd) at 60 nM $[Ca^{2+}]_i$, while at -80 mV it was $69.8 \pm 10\%$ at 10 μM and $51.4 \pm 15\%$ at 60 nM $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 3E and F). Finally, the currents and I-V curves obtained in the absence of external Ca^{2+} and using internal solutions with 0 free Ca^{2+} to eliminate all CaCCs activity are shown in figures G and H. At $+100$ mV db-cAMP stimulated the current by $39 \pm 4.6\%$ ($n = 3$, \pm sd). As expected, blockade was only observed at negative potentials where CFTR is sensitive to this compound ($18 \pm 2.3\%$ at -100 mV, $n = 3$, \pm sd). The inset in Figure 3H summarizes how $[Ca^{2+}]_i$ affects the voltage dependence of the DPC blockade. These results agree with published findings of the DPC voltage dependent blockade of CFTR currents (McCarty et al., 1993; Walsh and Wang, 1996; Schultz et al., 1999; Zhang et al., 2000). In addition, these findings corroborate the presence of CaCCs in mouse sperm (Espinosa et al., 1998), which were not further characterized.

In our hands, obtaining the whole cell configuration was significantly more difficult in the absence of $[Ca^{2+}]_i$; therefore in the rest of the experiments it was maintained at 10 μM , except for the experiments in epididymal sperm. Heterologously expressed CFTR is also stimulated by cGMP ($IC_{50} \sim 0.3 \mu M$; Sullivan et al., 1995). Experiments adding 20 μM 8Br-cGMP to testicular mouse sperm stimulated the sperm Cl^- currents and these currents were sensitive to DPC. The DPC induced inhibition was partially reversed upon washing (Fig. 4A and B). Both the pharmacology and the ionic selectivity of the mouse sperm currents contain a component whose properties are consistent with those of CFTR. To test further the notion that the Cl^- currents stimulated by cyclic nucleotides and inhibited by DPC are through CFTR, CFTR_{inh-172} (2–5 μM), a more specific and reversible blocker of this channel, was tested. All the current stimulated by the cyclic nucleotide analogs was eliminated by this inhibitor which decreased the current beyond the unstimulated level (Fig. 4C and D). Considering the cyclic nucleotide stimulated current as 100%, CFTR_{inh-172} inhibited 50% of the 8Br-cGMP-dependent current and 60% of that stimulated by db-cAMP (Fig. 4C–F). In addition, CFTR_{inh-172} (2–5 μM) and DPC (250 μM) also inhibited ($19.9 \pm 4\%$, $n = 6$; $21.8 \pm 4\%$, $n = 5$, respectively) the Cl^- currents in the absence of cyclic nucleotide (Supplementary Fig. 1, DPC values at -80 mV). This indicates that there are basally active CFTR channels and explains why addition of the inhibitors decreases the current beyond the unstimulated current level.

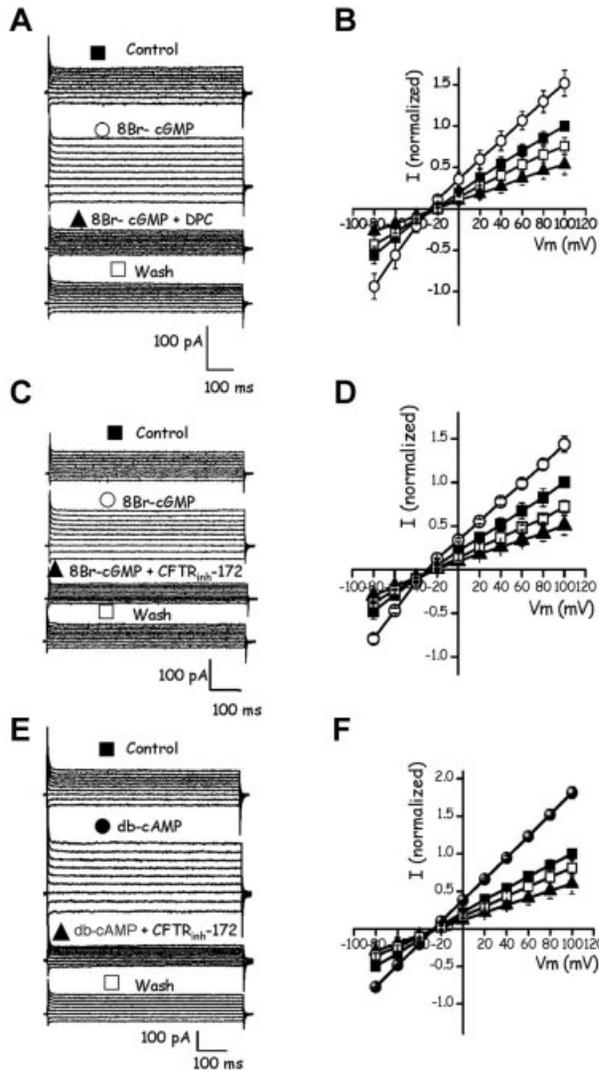


Fig. 4. DPC and CFTR_{inh}-172, two CFTR channel inhibitors, block the 8Br-cGMP and db-cAMP stimulated whole-cell Cl⁻ currents in testicular mouse sperm. (A) Representative recordings from a whole-cell patch-clamp experiments in control conditions as in Figure 3A (■ Control) showing Cl⁻ current activation by 8Br-cGMP (20 μM; ○ 8Br-cGMP) and their inhibition by 250 μM DPC (▲ 8Br-cGMP + DPC). Blockade by DPC was partially reversible (□ Wash). (B) I-V curves of the currents in (A). (C) 8Br-cGMP-stimulated Cl⁻ currents (○ 8Br-cGMP) were also significantly inhibited by 5 μM CFTR_{inh}-172 (▲ 8Br-cGMP + CFTR_{inh}-172) and this effect was partially reversible (□ Wash). (D) I-V relationships of the currents recorded in (C). (E) Cl⁻ currents (■ Control) are also significantly stimulated by db-cAMP (100 μM; ● db-cAMP) and inhibited by extracellular CFTR_{inh}-172 (5 μM; ▲ db-cAMP + CFTR_{inh}-172) in a partially reversible manner (□ Wash). (F) I-V relationships of the currents in (E). The applied voltage protocol is as in Figure 3. The currents were recorded under the ionic conditions as in Figure 3A. Symbols represent the means ± SEM of six experiments; some of the SEM bars were smaller than symbols. The currents in I-V plots were normalized with respect to the maximum of the control Cl⁻ current at +100 mV.

CFTR is characteristically activated by genistein (Wang et al., 1998; Gadsby and Nairn, 1999), a phenomenon that was indirectly shown to occur in mature mouse sperm (Hernandez-Gonzalez et al., 2007). Figure 5A–D shows that 20 μM genistein caused a DPC sensitive stimulation (54 ± 0.5% at 20 μM, at -80 mV; n = 6) of the sperm currents,

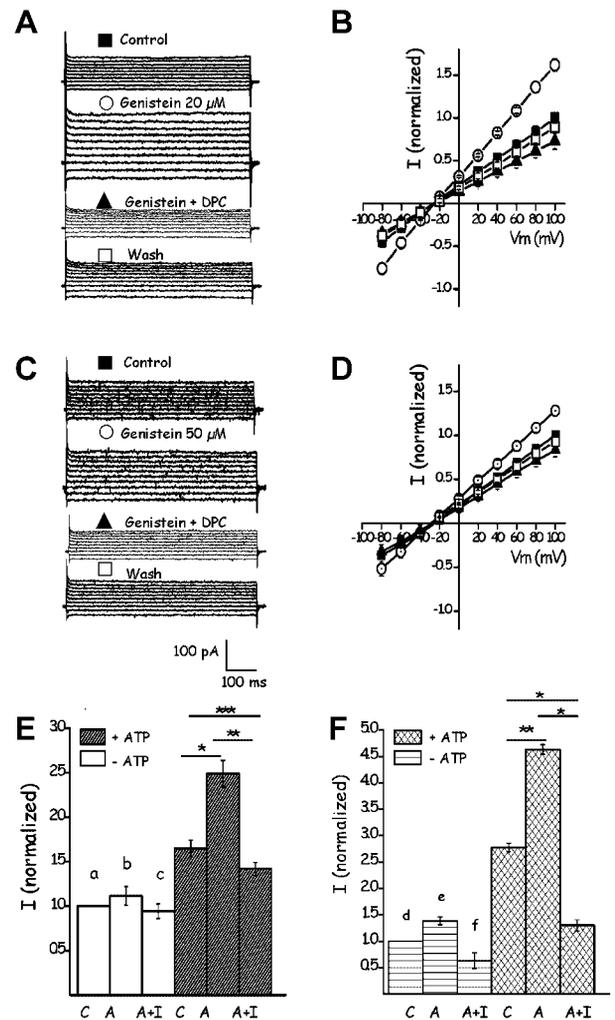


Fig. 5. Genistein increases the whole-cell Cl⁻ currents in testicular mouse sperm. A: Genistein at 20 μM (○ Genistein) potentiated Cl⁻ currents with respect to control currents (■ Control). The stimulated current was inhibited by DPC (250 μM; ▲ Genistein + DPC) reversibly (□ Wash). B: I-V curves of the currents in (A). C: Notably, a higher isoflavonoid concentration (○ Genistein 50 μM) stimulated the currents to a lesser extent than as seen with 20 μM (A). DPC (250 μM) caused the anticipated inhibition of the current (▲ Genistein + DPC) in a partially reversible form (□ Wash). D: I-V relationships of the currents in (C). The currents were obtained applying a voltage protocol as in Figure 2A and using the ionic conditions as in Figure 3A. E and F: ATP dependence of the db-cAMP-activated testicular mouse sperm Cl⁻ currents and their blockade by DPC. The concentrations used were: 100 μM db-cAMP (A), 100 μM db-cAMP + 250 μM DPC (A + I) in the control condition (C) in the presence (▨) or absence (□) of ATP (3 mM). Currents were recorded under ionic conditions as in Figure 4. The macroscopic Cl⁻ currents at +100 mV (E) and -80 mV (F), normalized with respect to the corresponding control without ATP were used to measure the ATP dependence. Symbols represent the means ± SEM of six experiments. Some SEM bars were smaller than the symbols. a, b, and c were not significantly different; *P < 0.05; ***P < 0.001; ****P < 0.0001. For (F) d, P < 0.05 and e, P < 0.01, f, n.s., *P < 0.05; **P < 0.01.

while at 50 μM a lesser level of stimulation was observed (38 ± 0.7% at 50 μM, at -80 mV; n = 6). These results are consistent with the bell-shaped concentration dependence of the genistein effect on CFTR documented previously (Wang et al., 1998; Gadsby and Nairn, 1999; see Discussion Section).

The stimulation of CFTR caused by cAMP is ATP dependent (Hwang et al., 1994; Ikuma and Welsh, 2000). Figure 5E and F illustrates that the mouse testicular currents mainly carried by Cl^- reproduce this behavior. The permeant analog of cAMP is significantly less able to stimulate the DPC sensitive component of the currents in the absence of ATP both at +100 mV and at -80 mV.

To establish whether the Cl^- currents stimulated by cAMP and inhibited by $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ are due to CFTR channels, we explored if they were present in testicular sperm from ΔF508 CFTR loss-of-function mice. Deletion of phenylalanine 508 (ΔF508) is the most common mutation in cystic fibrosis; it impairs CFTR folding and consequently, its biosynthetic and endocytic processing as well as its Cl^- channel function (Lukacs and Verkman, 2011). As anticipated, the Cl^- currents of sperm from ΔF508 CFTR loss-of-function mice are not stimulated by 100 μM cAMP or inhibited by 5 μM $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ (Fig. 6A and

B). They were by contrast present in sperm obtained from $\text{CFTR}-\Delta\text{F508}$ littermate wild type mice (Fig. 6C and D). These findings strongly argue that CFTR channels are functionally present in testicular mouse spermatozoa.

Recent evidence has indicated that ion channels such as Cav3s recorded in mouse testicular sperm (Martinez-López et al., 2011) cannot be detected in more mature epididymal sperm (Ren and Xia, 2010; Kirichok and Lishko, 2011). To ascertain if CFTR-like currents are functional in more mature sperm these currents were recorded in mouse sperm obtained from the epididymis. Figure 7 shows currents recorded with the same external and internal solutions as Figure 3E and F (containing 3 mM ATP and 60 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$), used to characterize the CFTR currents in testicular sperm, in the presence of NA (50 μM). The currents were significantly stimulated by db-cAMP (63 \pm 5% at +100 mV) and inhibited by $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ at all potentials (71 \pm 3% at +100 mV, $n = 4$; Fig. 7A–C). This inhibition was partially reversible (81 \pm 4%; Fig. 7A bottom and B). These experiments demonstrate that there are Cl^- currents in epididymal sperm that are stimulated by db-cAMP

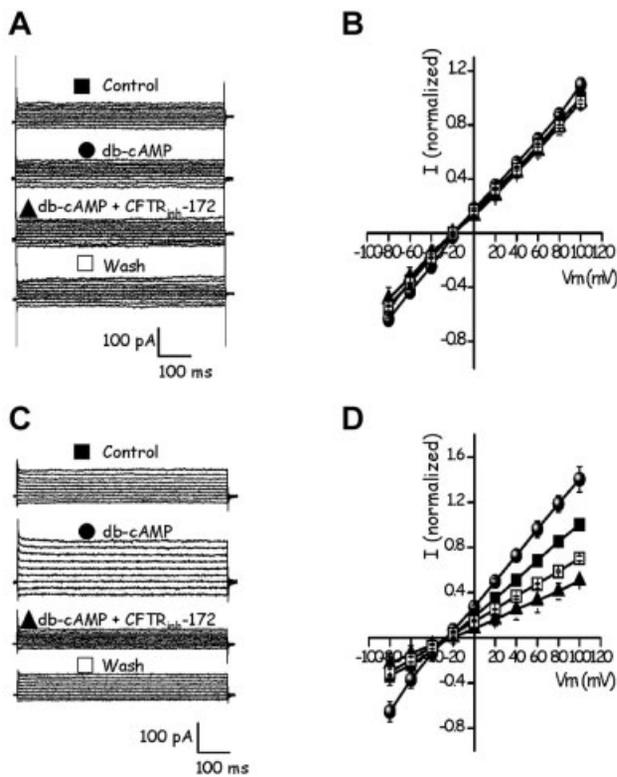


Fig. 6. Anion currents of testicular mouse sperm of $\text{CFTR}-\Delta\text{F508}$ mutant mice are not stimulate by cAMP or inhibited by $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$. **A:** The currents were obtained applying voltage protocol as in Figure 3A, to a sperm obtained from a $\text{CFTR}-\Delta\text{F508}$ mutant mouse bathed with control Cl^- recording solution (145 mM NMDG-Cl external/35 mM NMDG-Cl internal). Whole-cell Cl^- currents were recorded before (■ Control) and after addition of 100 μM db-cAMP (● db-cAMP), 5 μM $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ (▲ db-cAMP + $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$), and finally after washout (□ Wash). **B:** I–V relationships of the currents recorded as in (A). **C:** Currents in a sperm obtained from a wild type litter-mate of the $\text{CFTR}-\Delta\text{F508}$ mutant mice in (A) show that db-cAMP-stimulated Cl^- currents (● db-cAMP) are also significantly inhibited by 5 μM $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ (▲ db-cAMP + $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$) and this effect is partially reversible (□ Wash). **D:** I–V relationships of currents recorded as in C. All pipette solutions contained ATP. These results demonstrate that the Cl^- current component activated by cAMP and inhibited by $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ indeed must correspond to active CFTR. Symbols represent the means \pm SEM of three experiments; some SEM bars were smaller than the symbols. The currents were normalized with respect to the control Cl^- current at 100 mV.

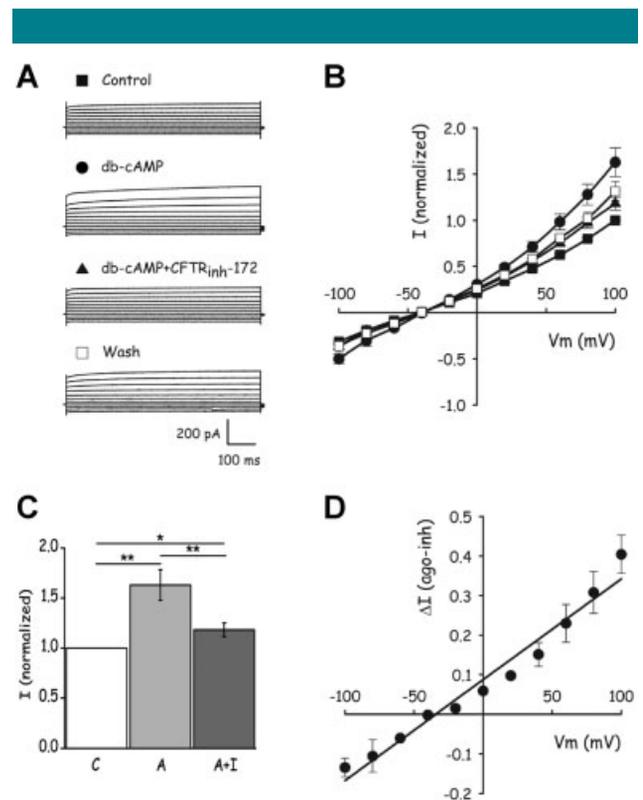


Fig. 7. CFTR channels are functional in epididymal mouse spermatozoa. **A:** Extracellular db-cAMP (100 μM ; ● db-cAMP) significantly stimulates whole-cell control Cl^- currents (■ Control) and $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ at external concentrations that inhibit CFTR (5 μM ; ▲ db-cAMP + $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$) blocked them in a partially reversible manner (□ Wash). The effects of agonist and Inh-172 were recorded with the same external and internal solutions as in Figure 3F (60 nM free Ca^{2+} inside the pipette) used to characterize the CFTR currents in testicular sperm, in the presence of NA (50 μM), to eliminate the contribution of other Cl^- channels. **B:** I–V relationships of the currents in (A). **C:** Summary of activation and inhibition of the Cl^- currents in the presence of CFTR's agonist and antagonists, respectively, on the control Cl^- currents at +100 mV in epididymal sperm. **D:** I–V plot showing the arithmetic difference between the currents in presence of db-cAMP (●) and + $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ (▲) shown in (A). Symbols represent the means \pm SEM of four experiments; some SEM bars were smaller than the symbols. The currents were normalized with respect to the stimulated Cl^- current at +100 mV. ** $P < 0.001$; * $P < 0.05$.

and blocked by CFTR_{inh}-172 similar to those obtained in testicular sperm with characteristics consistent with the presence of the CFTR channel in more mature sperm. These findings indicate functional CFTR channels are preserved as spermatozoa mature in transit from the testicle through the epididymis. Figure 7D illustrates the I–V curve corresponding to the current obtained by subtracting the CFTR_{inh}-172 sensitive current from the db-cAMP stimulated current has the anticipated characteristics of a CFTR-like current. Therefore, as we could not find stimulation by db-cAMP or inhibition by CFTR_{inh}-172 in testicular sperm from Δ F508 CFTR loss-of-function mice, these results strengthen the likelihood that functional CFTR currents are preserved in mouse epididymal sperm. Furthermore, these findings are consistent with other

functional data indicating CFTR channels play a role during capacitation (Guggino and Stanton, 2006; Wertheimer et al., 2008; Chen et al., 2009; Li et al., 2010; Chávez et al., 2012; Escoffier et al., 2012).

Considering that it is well known that Cl⁻ channels participate in volume regulation in many cell types including sperm (Yeung et al., 2005; Duran et al., 2010), we tested the effects of CFTR_{inh}-172 on epididymal capacitated mouse sperm and subjected them to cell sorting (see Materials and Methods Section). This inhibitor caused a significant change in the FSC versus SSC two dimensional dot plots. This observation is consistent with a sperm volume change and suggests the participation of CFTR channels in setting the volume of sperm (Fig. 8).

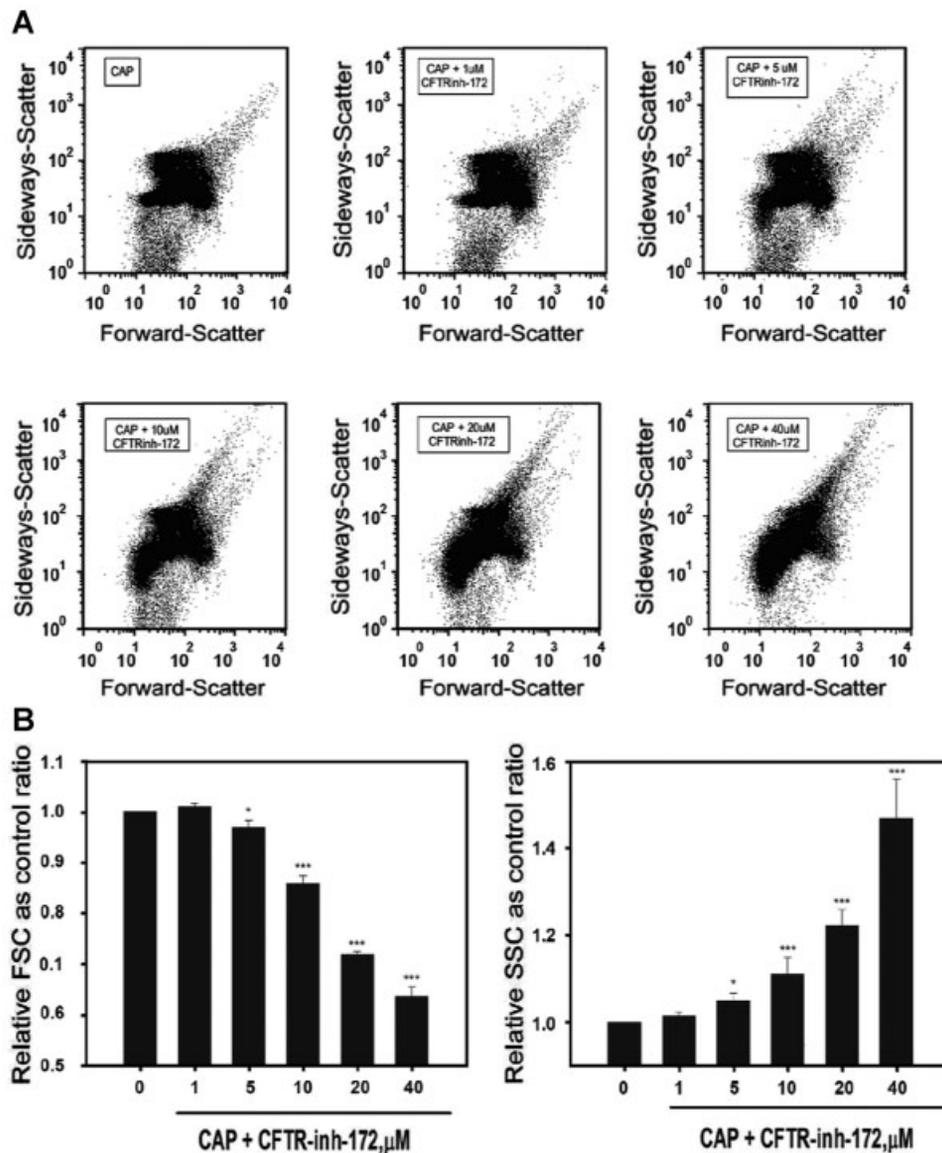


Fig. 8. CFTR_{inh}-172 modifies the sideways-SSC and forward-scatter (FSC) properties of epididymal capacitated mouse sperm. **A:** Two dimensional plots of sideways- (SSC) and forward-scatter (FSC) properties of cauda epididymal mouse sperm incubated under capacitating conditions (CAP) in the absence or in the presence of increasing concentrations of CFTR_{inh}-172 (0, 1, 5, 10, 20, and 40 μ M). Each dot represents the two types of scatter from an individual sperm. **B:** Average \pm SEM of sperm mean forward-scatter and sideways-scatter light of five independent experiments in which sperm were incubated with increasing concentrations of CFTR_{inh}-172 under capacitating conditions ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$) and ($***P < 0.001$) are statistically significant). Histogram of the SSC and FSC mean fluorescence \pm SEM from five independent experiments ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$) and ($***P < 0.001$) are statistically significant.

DISCUSSION

CFTR, a cAMP/PKA, and ATP-regulated Cl^- channel, is mutated in patients with cystic fibrosis. This Cl^- channel plays a crucial role in the transport of Cl^- and HCO_3^- in several cellular types and interacts with other proteins such as ENaCs, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchangers, and the $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter, to control ion transport (reviewed in Riordan, 2005). Notably, CFTR has been immunodetected in the mid piece and the post-acrosomal region of mouse, guinea pig, and human sperm. Pharmacological tools and indirect functional assays have indicated that CFTR participates in capacitation and possibly in hyperactivation, the AR and in fertilization (Hernandez-Gonzalez et al., 2007; Xu et al., 2007; Chen et al., 2009; Li et al., 2010; Visconti et al., 2011).

Membrane potential measurements in mouse sperm revealed that CFTR is activated by cAMP and its activation may lead to the closure of ENaC channels, which are also located in the mouse sperm mid piece (Hernandez-Gonzalez et al., 2006; Hernandez-Gonzalez et al., 2007). ENaC closure was shown to contribute to the hyperpolarization that accompanies mouse sperm capacitation. Our findings suggest that a functional CFTR is required for the $[\text{Cl}^-]_i$ increase and the hyperpolarization that accompany capacitation (Hernandez-Gonzalez et al., 2007). These permeability changes are most likely necessary to achieve the increase in intracellular HCO_3^- that stimulates SACY, a crucial event for capacitation (reviewed in Visconti et al., 2011). The HCO_3^- requirement for capacitation has been widely established (Visconti et al., 2011) and it has been proposed that a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter significantly contributes to the initial increase in intracellular HCO_3^- (Demarco et al., 2003). In addition, HCO_3^- could be entering the cell through $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchangers (Zeng et al., 1996; Chen et al., 2009; Visconti et al., 2011) and through CFTR, as observed in other cell types (Ishiguro et al., 2009; Yang et al., 2009), and proposed in sperm (Chen et al., 2009).

The fact that CFTR has been detected in the sperm post-acrosomal region is consistent with reports indicating its participation in the human sperm AR and in fertilization (Li et al., 2010). However, experiments in the mouse system also performed with DPC and CFTR_{inh}-172, though under different conditions, indicated inhibition occurred during sperm capacitation and not during the AR, and no effects were found on the regulation of the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation (Hernandez-Gonzalez et al., 2007; Wertheimer et al., 2008). These differing findings could also reflect distinct aspects of the mouse and human sperm signaling cascades that are becoming apparent, as in the progesterone activation of CatSper (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011) and the presence of proton channels (Hv; Lishko et al., 2010).

Here we show that whole-cell currents recorded from testicular mouse sperm display a Cl^- selective component that is ATP-dependent, stimulated by cAMP, cGMP, and genistein (a CFTR agonist, at low concentrations), and inhibited by DPC and CFTR_{inh}-172, two well-known CFTR antagonists (Schultz et al., 1999; Ma et al., 2002; Hernandez-Gonzalez et al., 2007; Caci et al., 2008). Remarkably, the genistein effect is higher at 20 μM than at 50 μM (see Fig. 5). An explanation of the biphasic effect of genistein on the CFTR channel suggests that phosphorylated CFTR has two binding sites for genistein, one of higher affinity (5–30 μM) and one of lower affinity (>35 μM ; Wang et al., 1998; Gadsby and Nairn, 1999). It is proposed that genistein interacts with NBD2 lengthening the average time of the channel's open state. The effect of genistein on channel gating is similar to that of the non-hydrolysable ATP analogs, suggesting a possible interaction with NBD2. The association of genistein to the lower affinity site in NBD1 potentially inhibits channel opening (Wang et al., 1998). Possibly, at high concentrations, genistein can also bind weakly to a site within the pore of CFTR

where it may act as an open-channel blocker (Lansdell et al., 2000).

The overall characteristics of a component of the Cl^- currents documented here in mouse testicular sperm match those described for CFTR in many cell types and in heterologously expressed CFTR channels (Gong et al., 2001; Riordan, 2005; Guggino and Stanton, 2006). The presence of functional CFTR in mouse testicular sperm is further demonstrated by the fact that Cl^- currents recorded from sperm from CFTR ΔF508 loss-of-function mice displayed no cAMP stimulation and were insensitive to CFTR_{inh}-172.

It is worth noting that mouse testicular sperm possess Cl^- currents stimulated by db-cAMP, 8-Br-cGMP and genistein that are blocked by NA and DPC at positive potentials (Figs. 2F; 3A, B, E, F; 4A–D; 5A–D) in an ATP dependent manner (Fig. 5E). Part of the blocked currents may be due to CaCCs (Schroeder et al., 2008; Tian et al., 2011), consistent with previous single channel patch-clamp recordings documenting the presence of a NA sensitive Cl^- channel ($\text{IC}_{50} = 11 \mu\text{M}$; Espinosa et al., 1998) with a very similar sensitivity as that of the recently identified Ca^{2+} dependent Cl^- channel TMEM16A (Gaietta, 2009). Matchkov et al. (2004) and Piper and Large (2004) report Ca^{2+} dependent and voltage and time independent Cl^- currents stimulated by cGMP in rat smooth muscle (cGMP $\text{EC}_{50} = 6.4 \mu\text{M}$). In the presence of cGMP these currents are stimulated by cAMP by $\sim 10\%$. Therefore, part of the inhibition caused by DPC at positive potentials upon the cGMP stimulated currents may be also due to CaCCs, and cAMP could also mildly stimulate these currents. Another component of these Cl^- currents is similar to that reported in guinea-pig Paneth cells apparently lacking CFTR. These cells display currents with very similar characteristics to CFTR that are stimulated by db-cAMP, ATP dependent, and blocked by DPC even at positive potentials (Tsumura et al., 1998). If present in mouse sperm, such a current would contribute to the blockade of DPC at positive potentials and its dependence on ATP. Genistein stimulates CFTR but can also inhibit tyrosine kinases (Akiyama and Ogawara, 1991) which could somehow stimulate CaCCs or the CFTR like current (Tsumura et al., 1998) in sperm. Future experiments will have to be performed to examine if these channels and CaCCs can be stimulated by genistein and why DPC blockade at positive potentials is ATP dependent. On the other hand, we do not fully understand why DPC and CFTR_{inh}-172 block a similar fraction of the current at positive potentials possibly indicating that CaCCs and CFTR currents appear to have a similar contribution.

To ascertain whether the CFTR-like currents are maintained during epididymal maturation, epididymal sperm were patch-clamped under the conditions used to study the Cl^- currents using an internal solution containing 60 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The currents we recorded were similar to those seen in testicular sperm (Fig. 7). They were activated by db-cAMP and inhibited by CFTR_{inh}-172; the difference between these two conditions yielded currents displaying I–V characteristics compatible with those of CFTR.

Furthermore, in agreement with the role of Cl^- channels in cell volume regulation (Ando-Akatsuka et al., 2002; Yeung et al., 2005; Duran et al., 2010), the CFTR inhibitor induced volume changes in epididymal mouse sperm. Our overall results are consistent with the functional presence of CFTR channels in mouse sperm and with their proposed participation in sperm physiology.

Acknowledgments

This work was supported by DGAPA: IN211809 (to AD), CONACYT: 49113 and 128566 (to AD), NIH: R01 HD44044 and HD038082 (to PEV). Work at CECs was partially funded by Conicyt PFB. We would also like to thank the Posgrado en

Ciencias Biológicas de la UNAM as DFF is their PhD student. DFF was a fellow of CONACyT, Number 49115. We appreciate the advice of the Dr. María Isabel Niemeyer (CECs) in technical aspects of the work and Dr. B.J. Scholte (Erasmus University) for providing the CFTR-DF508 mice and for technical assistance. The assistance of Marcela Ramírez, Elizabeth Mata, Juan Manuel Baamonde, and José Luis De La Vega is also gratefully acknowledged.

Literature Cited

- Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, De la Vega-Beltrán JL, Treviño CL, Felix R, Darszon A. 2006. KATP channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation. *Dev Biol* 289:395–405.
- Akiyama T, Ogawara H. 1991. Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Methods Enzymol* 201:362–370.
- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. 1991. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253:202–205.
- Ando-Akatsuka Y, Abdullaev I, Lee EL, Okada Y, Sabirov R. 2002. Down-regulation of volume-sensitive Cl⁻ channels by CFTR is mediated by the second nucleotide-binding domain. *Pflügers Arch* 445:177–186.
- Arreola J, Melvin JE, Begenisch T. 1996. Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells. *J Gen Physiol* 108:35–47.
- Baukrowitz T, Hwang T-C, Nairn AC, Gadsby DC. 1994. Coupling of CFTR Cl⁻ channel gating to an ATP hydrolysis cycle. *Neuron* 12:473–482.
- Berdiev BK, Qadri YJ, Benos DJ. 2009. Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol Biosyst* 5:123–127.
- Boucher RC. 2004. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 23:146–158.
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. 1999. Cytosolic adenyllyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:79–84.
- Caci E, Caputo A, Hinzpeter A, Arous N, Fanen P, Sonawane N, Verkman AS, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galletta LJ. 2008. Evidence for direct CFTR inhibition by CFTR (inh)-172 based on Arg347 mutagenesis. *Biochem J* 413:135–142.
- Chávez JC, Hernández-González EO, Wertheimer E, Visconti PE, Darszon A, Treviño CL. 2012. Participation of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl⁻ channel CFTR, and the regulatory factor SLC9A3R1 in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 86:1–14.
- Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgentko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J. 2000. Soluble adenyllyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289:625–628.
- Chen WY, Xu WM, Chen ZH, Ni Y, Yuan YY, Zhou SC, Zhou WW, Tsang LL, Chung YW, Höglund P, Chan HC, Shi QX. 2009. Cl⁻ is required for HCO₃⁻ entry necessary for sperm capacitation in guinea pig: Involvement of a Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger (SLC26A3) and CFTR. *Biol Reprod* 80:115–123.
- Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Treviño CL, Felix R, Beltrán C. 2005. Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* 243:79–172.
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De la Vega-Beltrán JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE. 2003. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 278:7001–7009.
- Duran C, Thompson CH, Xiao Q, Hartzell HC. 2010. Chloride channels: Often enigmatic, rarely predictable. *Annu Rev Physiol* 72:95–121.
- Escoffier J, Krapf D, Navarrete F, Darszon A, Visconti PE. 2012. Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *J Cell Sci* 125:473–485.
- Espinosa F, de la Vega-Beltrán JL, López-González I, Delgado R, Labarca P, Darszon A. 1998. Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl⁻ channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* 426:47–51.
- Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajin-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, Van Duin M, Conti M, Gossen JA. 2004. Mice deficient for soluble adenyllyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2993–2998.
- French PJ, van Doorninck JH, Peters RH, Verbeek E, Ameen NA, Marino CR, de Jonge HR, Bijman J, Scholte BJ. 1996. A delta F508 mutation in mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator results in a temperature-sensitive processing defect in vivo. *J Clin Invest* 98:1304–1312.
- Gadsby DC, Nairn AC. 1999. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev* 79:S77–S107.
- Galletta LJ. 2009. The TMEM16 protein family: A new class of chloride channels? *Biophys J* 97:3047–3053.
- Gong XD, Li JC, Cheung KH, Leung GP, Chew SB, Wong PY. 2001. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat spermatids: Implication for the site of action of antispermatic agents. *Mol Hum Reprod* 7:705–713.
- Guggino WB, Stanton BA. 2006. New insights into cystic fibrosis: Molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:426–436.
- Hartzell C, Putzier I, Arreola J. 2005. Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67:719–758.
- Hernandez-Gonzalez EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, Lopez-Gonzalez I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A, Visconti PE. 2006. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem* 281:5623–5633.
- Hernandez-Gonzalez EO, Treviño CL, Castellano LE, de la Vega-Beltrán JL, Ocampo AY, Wertheimer E, Visconti PE, Darszon A. 2007. Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 282:24397–24406.
- Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, Moss SB. 2005. The “soluble” adenyllyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 9:249–259.
- Higgins CF, Linton KJ. 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 11:918–926.
- Holland IB, Blinght MA. 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 293:381–399.
- Hwang T-C, Nagel G, Nairn AC, Gadsby DC. 1994. Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4698–4702.
- Ikuma M, Welsh MJ. 2000. Regulation of CFTR Cl⁻ channel gating by ATP binding and hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8675–8680.
- Ishiguro H, Steward MC, Naruse S, Ko SB, Goto H, Case RM, Kondo T, Yamamoto A. 2009. CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. *J Gen Physiol* 133:315–326.
- Kaupp UB, Weyand I. 2000. Cell biology. A universal bicarbonate sensor. *Science* 289:559–560.
- Kirichok Y, Lishko PV. 2011. Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol Hum Reprod* 17:478–499.
- Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV, Sanjay A, Pilder SH, Salicioni AM, Visconti PE. 2010. Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem* 285:7977–7985.
- Kunzelmann K, Schreiber R, Nitschke R, Mall M. 2000. Control of epithelial Na⁺ conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflügers Arch* 440:193–201.
- Lansdell KA, Cai Z, Kidd JF, Sheppard DN. 2000. Two mechanisms of genistein inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in murine cell line. *J Physiol* 524:317–330.
- Li C, Krishnamurthy PC, Penmatsa H, Marrs KL, Wang XQ, Zaccolo M, Jalink K, Li M, Nelson DJ, Schuetz JD, Naren AP. 2007. Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia. *Cell* 131:940–951.
- Li CY, Jiang LY, Chen WY, Li K, Sheng HQ, Ni Y, Lu JX, Xu WX, Zhang SY, Shi QX. 2010. CFTR is essential for sperm fertilizing capacity and is correlated with sperm quality in humans. *Hum Reprod* 5:317–327.
- Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. 2010. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 140:327–337.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* 471:387–391.
- Lukacs GL, Verkman AS. 2011. CFTR: Folding, misfolding and correcting the ΔF508 conformational defect. *Trends Mol Med* 18:81–91.
- Ma T, Thiagarajah JR, Yang H, Sonawane ND, Folli C, Galletta LJ, Verkman AS. 2002. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest* 110:1651–1658.
- Martínez-López P, Treviño CL, de la Vega-Beltrán JL, De Blas G, Monroy E, Beltrán C, Orta G, Gibbs GM, O'Bryan MK, Darszon A. 2011. TRPM8 in mouse sperm detects temperature changes and may influence the acrosome reaction. *J Cell Physiol* 226:1620–1631.
- Matchkov VV, Aalkjaer C, Nilsson H. 2004. A cyclic GMP-dependent calcium-activated chloride current in smooth-muscle cells from rat mesenteric resistance arteries. *J Gen Physiol* 123:121–134.
- McCarty NA, McDonough S, Cohen BN, Riordan JR, Davidson N, Lester HA. 1993. Voltage-dependent block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by two closely related arylaminobenzoates. *J Gen Physiol* 102:1–23.
- McPartlin LA, Visconti PE, Bedford-Guass SJ. 2011. Guanine-nucleotide exchange factors (RAPGEF3/RAPGEF4) induce sperm membrane depolarization and acrosomal exocytosis in capacitated stallion sperm. *Biol Reprod* 85:179–188.
- Muñoz-Garay C, De la Vega-Beltrán JL, Delgado R, Labarca P, Felix R, Darszon A. 2001. Inwardly rectifying K⁺ channels in spermatogenic cells: Functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol* 234:261–274.
- Piper AS, Large WA. 2004. Direct effect of Ca²⁺-calmodulin on cGMP-activated Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels in rat mesenteric artery myocytes. *J Physiol* 559:449–457.
- Poulsen JH, Fischer H, Illek B, Machen TE. 1994. Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5340–5344.
- Qu Z, Wei RW, Hartzell HC. 2003. Characterization of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in mouse kidney inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F326–F335.
- Quinton PM. 1999. Physiological basis of cystic fibrosis: A historical perspective. *Physiol Rev* 79:53–522.
- Ren D, Xia J. 2010. Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda)* 25:165–175.
- Riordan JR. 2005. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67:701–718.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J, Drumm ML, Lannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066–1073.
- Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. 2007. Signaling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65:245–259.
- Santi CM, Martínez-López P, de la Vega-Beltrán JL, Butler A, Alisio A, Darszon A, Salkoff L. 2010. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* 584:1041–1046.
- Schreiber R, Hopf A, Mall M, Greger R, Kunzelmann K. 1999. The first nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5310–5315.
- Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. 2008. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134:1019–1029.
- Schultz BD, Singh AK, Devor DC, Bridges RJ. 1999. Pharmacology of CFTR chloride channel activity. *Physiol Rev* 79:S109–S144.
- Schultz S, Jakubczak S, Kropf S, Nickel I, Muschke P, Kleinstein J. 2006. Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males. *Fertil Steril* 85:135–138.
- Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME, Guggino WB. 1998. Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2674–2679.
- Sheppard DN, Welsh MJ. 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79:S23–S45.
- Silber SJ. 1994. A modern view of male infertility. *Reprod Fertil Dev* 6:93–103.
- Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 471:382–386.
- Suarez S, Ho H-C. 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim* 38:119–124.
- Sullivan SK, Agellon LB, Schick R. 1995. Identification and partial characterization of a domain in CFTR that may bind cyclic nucleotides directly. *Curr Biol* 5:1159–1167.
- Taddei A, Folli C, Zegarra-Moran O, Fanen P, Verkman AS, Galletta LJ. 2004. Altered channel gating mechanism for CFTR inhibition by a high-affinity thiazolidinone blocker. *FEBS Lett* 558:52–56.

- Tian Y, Kongsuphol P, Hug M, Ousingsawat J, Witzgall R, Schreiber R, Kunzelmann K. 2011. Calmodulin-dependent activation of the epithelial calcium-dependent chloride channel TMEM16A. *FASEB J* 25:1058–1068.
- Trezise AE, Linder CC, Grieger D, Thompson EW, Meunier H, Griswold MD, Buchwald M. 1993. CFTR expression is regulated during both the cycle of the seminiferous epithelium and the oestrous cycle of rodents. *Nat Genet* 3:157–164.
- Tsumura T, Hazama A, Miyoshi T, Ueda S, Okada Y. 1998. Activation of cAMP-dependent Cl^- currents in guinea-pig Paneth cells without relevant evidence for CFTR expression. *J Physiol* 512:765–777.
- Van Doorninck JH, French PJ, Verbeek E, Peters RH, Morreau H, Bijman J, Scholte BJ. 1995. A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *EMBO J* 14:4403–4411.
- Visconti PE, Krapf D, de la Vega-Beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* 13:395–405.
- Walsh KB, Wang C. 1996. Effect of chloride channel blockers on the cardiac CFTR chloride and L-type calcium currents. *Cardiovasc Res* 32:391–399.
- Wang F, Zeltwanger S, Yang IC, Nairn AC, Hwang TC. 1998. Actions of genistein on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating. Evidence for two binding sites with opposite effects. *J Gen Physiol* 111:477–490.
- Wertheimer EV, Salicioni AM, Liu W, Trevino CL, Chavez J, Hernandez-Gonzalez EO, Darszon A, Visconti PE. 2008. Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 283:35539–35550.
- Wilke M, Buijs-Offerman RM, Aarbiou J, Colledge WH, Sheppard DN, Touqui L, Bot A, Jorna H, de Jonge HR, Scholte BJ. 2011. Mouse models of cystic fibrosis: Phenotypic analysis and research applications. *J Cyst Fibros Suppl* 2:S152–S171.
- Wong PY. 1998. CFTR gene and male fertility. *Mol Hum Reprod* 4:107–110.
- Xu WM, Shi QX, Chen WY, Zhou CX, Ni Y, Rowlands DK, Yi Liu G, Zhu H, Ma ZG, Wang XF, Chen ZH, Zhou SC, Dong HS, Zhang XH, Chung YW, Yuan YY, Yang WX, Chan HC. 2007. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9816–9821.
- Yanagimachi R. 1994. In *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. p 189.
- Yang D, Shcheynikov N, Zeng W, Ohana E, So I, Ando H, Mizutani A, Mikoshiba K, Muallem S. 2009. IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO_3^- secretion by stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct. *J Clin Invest* 119:193–202.
- Yeung CH, Barfield JP, Cooper TG. 2005. Chloride channels in physiological volume regulation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 73:1057–1063.
- Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM. 1996. pH regulation in mouse sperm: Identification of Na^+ -, Cl^- -, and HCO_3^- -dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol* 173:510–520.
- Zhang ZR, Zeltwanger S, McCarty NA. 2000. Direct comparison of NPPB and DPC as probes of CFTR expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 175:35–52.
- Zheng H, Liu W, Anderson LY, Jiang QX. 2011. Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel. *Nat Commun* 2:250. Pages. 1–9.