



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE EL
VOLTAJE DE MEMBRANA Y EL PH
INTRACELULAR EN ESPERMATOZOIDES DE
HUMANO CAPACITADOS Y NO
CAPACITADOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:
ERIKA MONSERRAT TORRES MORALES**

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ARLET DEL CARMEN LOZA HUERTA

MÉXICO, DF. 2015





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.

1. Datos del alumno:

Erika Monserrat
Torres
Morales
57100613
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308129717

2. Datos del tutor:

Doctora
Arlet del Carmen
Loza
Huerta
5543840191
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Fisiología Celular

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Alberto
Darszon
Israel

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Arturo
Hernández
Cruz

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Arturo
Picones
Medina

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Hortensia Gertrudis
González
Gómez

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de la relación entre el voltaje de membrana y el pH intracelular en espermatozoides de humano capacitados y no capacitados por citometría de flujo
83 p
2015

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Arlet del Carmen Loza Huerta, del grupo del Dr. Arturo Picones Medina en el Laboratorio Nacional de Canalopatías del Instituto de Fisiología Celular-UNAM en Distrito Federal, México



LNC

Laboratorio Nacional de Canalopatías

Investigación financiada por la Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación con el número de proyecto 039/2013



AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Martha † gran parte de la persona que soy hoy es gracias a ti, gracias por el esfuerzo y entrega que pusiste para sacarnos adelante.

A mi hermana Angélica por ser mi constante motivación, por apoyarme y acompañarme en todo momento. Gracias por todo tu amor, eres el principal pilar de mi desarrollo personal y académico, porque juntas hemos aprendido que con esfuerzo podemos alcanzar nuestras metas. Te amo.

A mi papá Marco y hermano Marco, por su cariño y apoyo moral y porque sé que siempre estarán para mí. Los amo.

A mi tía Marcela, porque a pesar de no ser tu responsabilidad, nos has apoyado durante toda la carrera, por la confianza que depositas en nosotros, por tu cariño, y por toda la ayuda que nos brindaste, sin la cual, hubiese sido más difícil mi camino. Te amo.

A Hugo Iván Cruz Rosas, por apoyarme y estar al pendiente de mi progreso, por todas las contribuciones valiosísimas para mi tesis y mi desarrollo académico, y sobre todo por brindarme tu amistad. Muchas gracias, te quiero.

Al Dr. Arturo Picones por depositar su confianza en mí y permitirme formar parte de su equipo de trabajo en su laboratorio.

Considero que son los cimientos de mi desarrollo académico, todos y cada uno de ustedes: Arlet, Oliver, Pedro, Ruth, Mauricio, Arturo Picones. A ustedes que han destinado tiempo para enseñarme cosas nuevas, por brindarme aportes invaluable que servirán para toda mi vida, y por hacer de mi estancia en el Laboratorio Nacional de Canalopatías una experiencia muy divertida y llena de aprendizaje, muchas gracias.

Un agradecimiento especial a mi tutora de Tesis, la Dra. Arlet Loza, que me orientó, apoyó y corrigió con gran paciencia en mi labor científica con un interés y

una entrega que han sobrepasado, por mucho, todas las expectativas que, como alumna, deposité en una persona.

Al Dr. Alberto Darszon, por sus valiosas contribuciones, observaciones, consejos y constante interés en el avance de mi Tesis.

A la M. en C. Paulina Torres, por un boceto de un protocolo a seguir.

A los miembros de mi jurado por el tiempo dedicado para la revisión de mi tesis y sus valiosos comentarios.

A los donadores, pues son parte esencial de éste trabajo.

A todos mis profesores de la carrera, por instruirme, orientarme y dedicar parte de su vida a la enseñanza, son un pilar muy importante de mi formación como Bióloga e hicieron que mi amor por la Biología se hiciera más grande.

Este trabajo fue financiado por la Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación (SECITI) con el número de proyecto 039/2013. Y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo el proyecto Laboratorio Nacional de Canalopatías con el número de proyecto 262969.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.”

- **Albert Einstein**

*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino
como una oportunidad para penetrar en el bello y
maravilloso mundo del saber”*

- **Albert Einstein**

Contenido

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	2
3	ANTECEDENTES	5
3.1	La Fecundación	5
3.1.1	Microambiente vaginal.....	5
3.1.2	Los espermatozoides en el tracto genital femenino	6
3.2	El espermatozoide en humanos.....	6
3.3	Fisiología del espermatozoide donde la regulación del pH_i es crítico.....	7
3.3.1	Iniciación de la movilidad e hiperactivación	8
3.3.2	Capacitación.....	9
3.3.3	Reacción Acrosomal.....	10
3.4	Regulación del pH_i	11
3.4.1	Principales moléculas que participan en la regulación del pH_i	12
3.5	Voltaje de membrana.....	13
3.6	Canales iónicos activados por voltaje	14
3.6.1	Intercambiadores Na^+/H^+	15
3.6.2	Canal de H^+	16
3.7	Citometría de flujo.....	19
4	JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
5	HIPOTÉISIS	22
6	OBJETIVOS	22
7	MATERIALES Y MÉTODO	23
7.1	Reactivos.....	23
7.2	Equipo	24
7.3	Análisis estadístico	24
7.4	Obtención de la muestra de semen	24
7.5	Obtención de los espermatozoides móviles.....	25
7.6	Capacitación.....	25
7.7	Incubación con fluoroforos.....	25
7.8	Calibración del citometro	26

7.9	Compensación y establecimiento de cuadrantes	26
7.10	Adquisición de datos.....	27
7.11	Controles	27
7.12	Calibración del voltaje de membrana	27
7.13	Inhibición de la hiperpolarización de la membrana inducida por valinomicina modificando el K^+ extracelular	28
7.14	Análisis en FlowJo	28
7.14.1	Selección de la muestra a evaluar	29
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
8.1	Cinética BCECF, AM	31
8.2	Cinética DISC ₃ (5)	32
8.3	Cinética Valinomicina	33
8.4	pH intracelular	34
8.5	Voltaje de membrana en reposo	36
8.6	Cambios en el V_m ante la adición de controles	40
8.7	Variación del V_m durante su calibración	43
8.8	Controles experimentales para la variación en el pH_i	51
8.9	Variación del pH_i al cambiar el V_m	53
8.10	Variación del pH_i ante las adiciones de KCl.....	56
8.11	Alcalinización inducida por hiperpolarización vs alcalinización inducida por despolarización	59
9	CONCLUSIONES Y EXPECTATIVAS	61
10	ANEXO	63
10.1	BCECF, AM.....	63
10.2	DiSC ₃ (5).....	64
10.3	IP.....	64
11	BIBLIOGRAFÍA.....	65

Índice de figuras

Figura 1. Espermatozoide humano..	7
Figura 2. pH de los diferentes compartimentos subcelulares.	11
Figura 3. Extrusores de H ⁺ y Cargadores de H ⁺	13
Figura 4. Arquitectura general de los canales activados por voltaje.	15
Figura 5. Conformación Oligomérica y ubicación de los poros en los canales iónicos clásicos activados por voltaje y canal Hv1	17
Figura 6. Establecimiento de cuadrantes	29
Figura 7. Formación de dos poblaciones.	30
Figura 8. Selección de la población a estudiar	30
Figura 9. Cinética de BCECF, AM.	31
Figura 10. Cinética de DiSC ₃ (5)	32
Figura 11. Efecto de la valinomicina	33
Figura 12. Comparación del pH _i en espermatozoides no capacitados y capacitados	35
Figura 13. Ajuste lineal.	37
Figura 14. Comparación del V _m de reposo en espermatozoides no capacitados y capacitados.	38
Figura 15. Comparación del V _m de reposo en espermatozoides capacitados y no capacitados en cada donador.	39
Figura 16. Cambios en el voltaje de membrana (V _m) ante la adición de controles en espermatozoides no capacitados.	41
Figura 17. Cambios en el voltaje de membrana (V _m) ante la adición de controles en espermatozoides capacitados.	42
Figura 18. Curva de calibración de la fluorescencia a valores de voltaje de membrana en espermatozoides de humano no capacitados y capacitados.	45
Figura 19. Gradiente electroquímico de los principales iones que influyen en el V _m .	46
Figura 20. Inhibición de la hiperpolarización de la membrana inducida por valinomicina modificando el K ⁺ extracelular en espermatozoides no capacitados.	48

Figura 21. Modificación del voltaje de equilibrio del K y del Cl al modificar la concentración extracelular de KCl.	49
Figura 22. Inhibición de la hiperpolarización de la membrana inducida por valinomicina modificando el K^+ extracelular en espermatozoides capacitados..	50
Figura 23. Cambios en el pH intracelular (pHi) ante la adición de vehículos y controles positivos en espermatozoides de humano no capacitados y capacitados.	52
Figura 24. Variación del pHi al cambiar el voltaje de membrana en espermatozoides de humano no capacitados y capacitados..	54
Figura 25. Variación del pHi al cambiar el voltaje de membrana en espermatozoides no capacitados..	57
Figura 26. Variación del pHi al cambiar el voltaje de membrana en espermatozoides capacitados.	58
Figura 27. Alcalinización citosólica inducida por hiperpolarización vs alcalinización inducida por despolarización de la membrana en espermatozoides de humano.....	59

PALABRAS CLAVE

Espermatozoide, alcalinización, hiperpolarización, despolarización, canal iónico, intercambiador Na^+/H^+ , canal de protones H_v1

LISTA DE ABREVIATURAS (orden alfabético)

ATP: Adenosin trifosfato

BSA: albumina de suero fetal bovino

BCECF, AM: (2', 7'-Bis-(2-Carboxyetil)-5-(and-6)-Carboxifluorescein, Acetoximetil Ester)

CMF: Citometría de flujo

DISC₃ (5): (3,3'-Dipropylthiadicarbocyanine Iodide)

DMSO: Dimetil sulfóxido

DP: Despolarización

E_x: Voltaje de equilibrio electroquímico de un ion

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacil etanosulfónico

HP: Hiperpolarización

IP: Ioduro de propidio

mM: Milimolar

mV: Milivoltios

MP: Membrana plasmática

NHE: Intercambiador sodio/proton

pH_e: potencial de hidrógeno extracelular

pH_i: potencial de hidrógeno intracelular o citosólico

RA: Reacción acrosomal

V_m: Voltaje de membrana

[X]_i: Concentración de un ión intracelular

[X]_e: Concentración de un ión extracelular

ZP: Zona pelúcida

1 RESUMEN

La fecundación es un proceso esencial para la reproducción sexual y es una manera de originar variabilidad genética; para que la fecundación sea posible, los espermatozoides deben pasar por un proceso llamado capacitación, el cual ocurre en el tracto genital femenino. Durante la capacitación ocurren cambios metabólicos y a nivel de la membrana plasmática y metabólico; por ejemplo, se sabe que los espermatozoides capacitados tienen un pH intracelular (pH_i) más alcalino y una concentración de calcio intracelular mayor que los espermatozoides no capacitados, entre otros. Es por lo anterior que la regulación del pH_i es esencial para la fisiología espermática, el pH_i puede ser regulado por el voltaje de membrana. Para llevar a cabo este estudio se ocuparon espermatozoides de humano capacitados y no capacitados. Se evaluó la relación del pH_i y el voltaje de membrana considerando dos entidades moleculares que son activadas por voltaje; el intercambiador Na^+/H^+ activado por hiperpolarización y el canal de protones H_v1 activado por despolarización. Para estudiar dicha relación se indujo una hiperpolarización de la membrana celular con valinomicina o se despolarizó con adiciones de KCl. Además se realizó la comparación del voltaje de membrana de reposo de los espermatozoides capacitados y no capacitados. Todo esto se realizó utilizando como alternativa al estudio de la fisiología espermática la citometría de flujo, la cual nos permite analizar varios parámetros simultáneamente, en este caso se midió viabilidad con Ioduro de Propidio, pH_i con BCECF y voltaje de membrana con DiSC. Se corroboró que el canal de protones H_v1 es el principal responsable de la alcalinización intracelular, principalmente en espermatozoides capacitados. Por otro lado nuestros resultados sugieren la misma tendencia previamente reportada: los espermatozoides capacitados están más hiperpolarizados (-44.8 mV) que los no capacitados (-37.3 mV), sin embargo, nuestros resultados indican que esta diferencia no es estadísticamente significativa.

2 INTRODUCCIÓN

Este trabajo está enfocado al estudio del gameto masculino, el espermatozoide, el cual es una célula haploide, con un núcleo altamente condensado y cuyo única función es llevar a cabo la fecundación. Para que se lleve a cabo la fecundación, son necesarios dos eventos: la hiperactivación y la reacción acrosomal (RA), la segunda consiste en la liberación de la vesícula acrosomal que contiene enzimas que degradan y atraviesan la cubierta externa del gameto femenino.

Los mamíferos son animales de fecundación interna, en la cual los espermatozoides son liberados dentro del tracto genital femenino durante la eyaculación y son capaces de moverse; sin embargo, no cuentan con la capacidad para llevar a cabo la RA y fecundar al gameto femenino (óvulo). Para que adquieran esta capacidad, los espermatozoides pasan por una serie de cambios fisiológicos, que en conjunto son denominados como el proceso de capacitación. Ésta no se produce sino hasta que los espermatozoides se encuentran dentro del tracto reproductor femenino por un cierto período de tiempo (Gilbert 2000).

La capacitación consiste en una serie de cambios metabólicos y a nivel de la membrana plasmática y metabólicos, necesarios para que se lleve a cabo la fecundación del ovocito. Estos procesos se producen en el tracto genital femenino y están asociados con la hiperactivación (HA), un tipo distintivo de la movilidad del espermatozoide, caracterizado por la alta velocidad, la progresión hacia adelante y movimiento de latigazo cervical (De Lamirande & Gagnon 1993). Así mismo, durante la capacitación se requiere una alcalinización citosólica (Vredenburg-Wilberg & Parrish 1995; Zeng et al. 1996; Cross & Razy-Faulkner 1997), la cual es debido en parte a un intercambiador iónico dependiente de Na^+ (Zeng et al. 1996). Una vez que se haya completado la capacitación, los espermatozoides pueden proceder a la RA.

La capacitación, así como la mayoría de los procesos celulares son influenciados y operan dentro de una gama restringida de (pH_i). Los cambios en el pH_i afectan el estado de ionización de ácidos débiles y bases que están presentes

en la mayoría de las proteínas y muchas biomoléculas (Boron 2004). Por lo tanto, como la actividad metabólica acidifica el citosol, y las células pueden ser expuestas a un pH externo variable (pH_e), la falta de regulación del pH_i puede tener consecuencias funcionales graves. En general, las células ajustan finamente su pH_i empleando varios mecanismos dinámicos cuyo saldo en términos de producción, eliminación, transporte y amortiguamiento de H^+ determina su valor en un momento determinado. Las células regulan su pH_i disminuyendo o aumentando la actividad de una amplia gama de transportadores de iones de la membrana plasmática que mueven ácidos y/o bases (Ruffin et al. 2014).

Las células pueden presentar cambios drásticos en el tránsito de un estado latente a un estado activo, una condición que a menudo implica un cambio de pH súbito (Nishigaki et al. 2014). Los espermatozoides son un claro ejemplo, ya que están expuestos a cambios dramáticos en la composición iónica de su entorno durante su viaje hacia la fecundación del óvulo. Los espermatozoides de mamíferos se encuentran en un medio ácido con una baja concentración de HCO_3^- en el epidídimo, que los mantiene en reposo, mientras que en el útero de la hembra y en el oviducto, el fluido luminal contiene una alta concentración de HCO_3^- y se vuelve cada vez más alcalino, una condición necesaria para la fecundación (Liu et al. 2012).

El mantenimiento del pH_i dentro de los límites fisiológicos es fundamental para la función celular, en este caso, la fecundación. En particular, existen varias enzimas y transportadores iónicos únicos de espermatozoides que son pH_i dependientes o de alguna manera están relacionados con la regulación pH_i cuya eliminación provoca infertilidad. Es claro que la regulación del pH_i es de suma importancia para la fisiología espermática (Nishigaki et al. 2014). Por otra parte, muchos de estos procesos fisiológicos implican un mecanismo regulador de pH dependiente de Na^+ (Bibring et al. 1984).

Numerosas técnicas han evolucionado en los últimos 30 años para medir pH_i , y sus ventajas y limitaciones se están revisando continuamente. Estos métodos involucran determinaciones en poblaciones de células o en células

individuales que incluyen: 1) la resonancia magnética nuclear (RMN) utilizando ^{31}P , 2) Distribución débil ácido-base, y 3) absorbancia óptica y técnicas de fluorescencia (Loiselle & Casey 2010). En los últimos años el pH_i se está estudiando en los espermatozoides sobre todo con el uso de sondas fluorescentes (Nishigaki et al. 2014).

La citometría de flujo es una tecnología biofísica que mide simultáneamente y luego analiza múltiples características físicas de las células individuales, a medida que circulan en una corriente fluida a través de un haz de luz láser. Las propiedades medidas incluyen tamaño relativo de una partícula, granularidad relativa o complejidad interna, y la intensidad relativa de fluorescencia. Estas características se determinan usando un sistema de acoplamiento óptico-electrónico que registra cómo la célula dispersa la luz láser incidente y emite fluorescencia (Williams et al. 2011). El presente trabajo evaluó, empleando la técnica de citometría de flujo, si existe una relación entre el pH_i y el voltaje de membrana, en los espermatozoides de humano capacitados y no capacitados.

3 ANTECEDENTES

3.1 La Fecundación

La fecundación es un proceso esencial en la reproducción sexual para la preservación de las especies, creando variabilidad genética, en la cual el núcleo del gameto masculino se fusiona con núcleo del gameto femenino, de manera que el nuevo individuo tiene un genoma derivado de ambos progenitores (Jones & Lopez 2006). Sin embargo, ahora sabemos que la herencia es una cuestión tanto de la herencia genética y citoplasmática (Charney 2013) de manera que también hay factores que se heredan por la fusión de citoplasmas y que afectan el desarrollo embrionario. Estos incluyen ARNm, mitocondrias, citoesqueleto y elementos contráctiles, y los restos de la membrana plasmática de los espermatozoides. Aunque la mayoría de estos elementos son eliminados, algunos juegan papeles esenciales en la embriogénesis temprana (Cummins 2001). Además se ha propuesto que la alteración del epigenoma por factores ambientales o tóxicos en las células germinales son un mecanismo por el que se puede promover una herencia transgeneracional de fenotipos y estados de enfermedad (Skinner & Guerrero-Bosagna 2009).

3.1.1 Microambiente vaginal

La acidez vaginal es importante para el mantenimiento de la salud vaginal. La vagina saludable se encuentra generalmente con un pH de 4 ± 0.5 (Cohen 1969; Tevi-Bénissan et al. 1997). Este nivel de acidez inhibe la movilidad de los espermatozoides y los inactiva (Jones & Lopez 2006; Olmsted et al. 2000). Sin embargo, el semen cuyo pH oscila entre 7.2 y 7.8 amortigua el pH vaginal durante varias horas. Esto permite que aumente la movilidad de los espermatozoides y que así haya una oportunidad para la fecundación (Tevi-Bénissan et al. 1997; Jones & Lopez 2006). Desde hace mucho tiempo, se ha observado que conforme se avanza en el tracto genital femenino la acidez disminuye, se sabe que el fluido

luminal uterino contiene una alta cantidad de HCO^{3-} en comparación al plasma seminal (Vishwakarma 1962).

3.1.2 Los espermatozoides en el tracto genital femenino

Alrededor de 1 minuto después de la deposición en la vagina, el semen se vuelve más grueso y menos líquido. Esto es la coagulación del semen provocada por la enzima fibrinogenasa que se encuentra en el plasma seminal, que convierte el fibrinógeno en fibrina. La función principal de esta coagulación es evitar que los espermatozoides mueran en la vagina. Después de aproximadamente 20 min, sin embargo, el semen se licua. Esta licuefacción del semen es provocada por la enzima fibrinolisisina en el plasma seminal, esto permite que los espermatozoides nadan un poco más rápido para llegar al cuello del útero (Jones & Lopez 2006).

Los espermatozoides se depositan primero en la vagina; a continuación pasan al útero a través del cuello uterino y del útero pasan al oviducto, hasta el istmo del oviducto que es la zona habitual de la fecundación: el ámpula. En resumen, los espermatozoides viajan una distancia aproximada de 15 cm a través del tracto reproductivo femenino hasta el punto del oviducto donde se lleva a cabo la fecundación. (Jones y López, 2006).

3.2 El espermatozoide en humanos

El espermatozoide es una célula haploide que constituye el gameto masculino. Son pequeños y se componen principalmente de 1) Una cabeza (2-5 μm de diámetro), que contiene paquetes condensados de cromosomas en el núcleo, dos centriolos, el acrosoma (estructura que posee las propiedades de una membrana) que contiene enzimas hidrolíticas y se encuentra sobre el núcleo en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide) y el núcleo que ocupa la mayor parte de la cabeza. 2) Las mitocondrias, que proveen de energía para el movimiento del flagelo, dispuestas en espiral en la pieza media del flagelo. 3) El flagelo, de longitud variable dependiendo de la especie (10-100 μm), tiene el característico complejo de microtúbulos "9+2" denominado axonema, que se

encuentra en flagelos eucariotas y cilios. El flagelo de los mamíferos tiene fibras accesorias no vistas en organismos inferiores (**Figura 1**).

El volumen citoplasmático del espermatozoide es muy pequeño; el volumen interno del espermatozoide de humano ha sido estimado en ~15 fl. (Kleinhans et al. 1992; Schackmann et al. 1984). Los espermatozoides son incapaces de sintetizar proteínas o ácidos nucleicos. Son células especializadas encargadas de encontrar, fusionarse, y entregar su información genética al ovulo (Darszon et al. 1999).

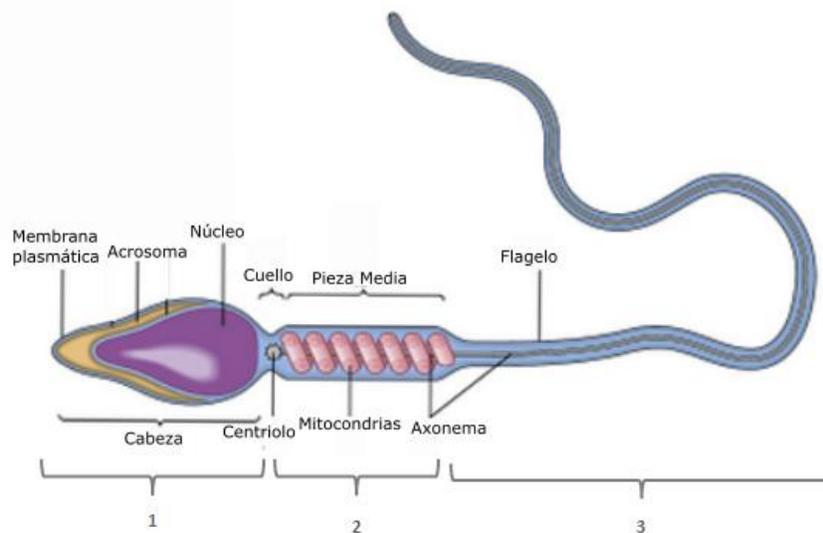


Figura 1. Espermatozoide humano. Estructura del espermatozoide humano, se compone por tres regiones principales, 1) cabeza, 2) media y 3) flagelo (Jones & Lopez 2006).

3.3 Fisiología del espermatozoide donde la regulación del pH_i es crítico

Las células pueden presentar cambios drásticos en el tránsito de un estado latente a un estado activo, una condición que a menudo implica un cambio de pH súbito. Los espermatozoides son un claro ejemplo ya que están expuestos a cambios abruptos en la composición iónica de su entorno durante su viaje hacia la fecundación del óvulo. Es por esto que resulta de vital importancia que existan mecanismos de regulación del pH_i que permitan que éste se mantenga en un

rango determinado y de manera que sean posibles los diferentes procesos que se llevan a cabo en el espermatozoide y así se pueda llevar a cabo la fecundación (Nishigaki et al. 2014).

3.3.1 Iniciación de la movilidad e hiperactivación

Los espermatozoides de mamíferos se encuentran en un medio ácido con una baja concentración de HCO_3^- en el epidídimo, que los mantiene en reposo (Liu et al. 2012). En general, se cree que este estado de los espermatozoides en reposo, se mantiene por la acidificación del pH_i , ya que las dineínas, que son ATPasas del axonema del flagelo de los espermatozoides (proteínas motoras que generan el movimiento flagelar) son altamente dependientes del pH (Christen et al. 1983; Giroux-Widemann et al. 1991). Mientras que en el útero de la hembra y en el oviducto, el fluido luminal contiene una alta concentración de HCO_3^- , convirtiéndose cada vez más alcalino, una condición necesaria para la fecundación (Liu et al. 2012).

Después de la eyaculación, los espermatozoides son expuestos al fluido seminal (cuyo pH es de alrededor de 7.5) (Carr et al. 1985) que permite la movilidad espermática. El nado activado de los espermatozoides es progresivo y simétrico con baja amplitud y alta frecuencia del ritmo flagelar. En contraste con los espermatozoides recuperados en el oviducto, sitio típico de la fecundación, que muestran una movilidad vigorosa y asimétrica, con una amplitud alta y baja frecuencia del ritmo flagelar, denominado hiperactivación (Suarez 2008).

La hiperactivación es necesaria para penetrar la zona pelúcida (ZP). En este sentido la hiperactivación se puede considerar parte de la capacitación, aunque la capacitación se refiere más usualmente a la preparación del espermatozoide para la RA. Se ha establecido que el Ca^{2+} es fundamental para la hiperactivación y CatSper (canal catiónico dependiente de pH y voltaje exclusivo del espermatozoide) es un canal esencial en este proceso. Sin embargo, todavía no se conocen bien cuales son las señales fisiológicas que inducen la hiperactivación (Suarez 2008).

3.3.2 Capacitación

El transporte de los espermatozoides desde la vagina hasta la parte superior del tracto genital femenino es muy rápido (6 horas), sin embargo, el número de espermatozoides en el sitio típico de la fecundación es muy pequeño. El tiempo de espera no es necesariamente para la acumulación de un gran número de espermatozoides y así asegurar la fecundación; sino que este período en el tracto femenino es requerido para que los espermatozoides se capaciten para la fecundación (Chang 1951).

La capacitación espermática es un evento esencial, gradual y necesario para la fecundación que tiene lugar *in vivo* durante la exposición secuencial de los espermatozoides a los diferentes compartimentos del tracto genital femenino durante el transporte de los espermatozoides al sitio típico de la fecundación. La capacitación espermática también puede ser imitada durante la incubación *in vitro* en un medio adicionado con HCO_3^- , Ca^{2+} y albumina, lo que permite estudios detallados, y es ésta capacitación *in vitro* la que ha permitido recavar la mayor parte de nuestro conocimiento actual de los mecanismos y cinética del proceso (Gadella & Van Gestel 2004).

Se sabe que el bicarbonato es un componente clave que induce la capacitación (A. P. Harrison & Gadella 2005). Se han identificado los siguientes procesos: la remoción de colesterol de la membrana plasmática, la eliminación de proteínas adherentes del plasma seminal, una hiperpolarización de la membrana, relacionada con un canal de K^+ exclusivo de espermatozoides (Slo3) (López-González et al. 2014) y el aumento del contenido de AMP cíclico (Nixon & Aitken 2009; Fraser 2010), aumento del pH_i (Vredenburg-Wilberg & Parrish 1995; Zeng et al. 1996; Cross & Razy-Faulkner 1997), éste aumento en el pH_i es debido al menos en parte a un intercambiador aniónico sistémico dependiente de Na^+ (Zeng et al. 1996).

3.3.3 Reacción Acrosomal

El acrosoma es una vesícula secretora grande, derivada del aparato de Golgi y localizada en la región apical de la cabeza del espermatozoide en la mayoría de las especies, a excepción de algunos peces como los teleósteos. Cuando los espermatozoides reciben un estímulo apropiado, ésta vesícula se fusiona con la membrana plasmática y libera su contenido, incluidas enzimas hidrolíticas; este proceso se llama reacción acrosomal (RA). Durante este proceso exocitótico, las membranas acrosomal y plasmática se fusionan en múltiples sitios, exponiéndose elementos de membrana requeridos para la penetración de la capa del óvulo y la fusión posterior con la membrana plasmática del óvulo (Yanagimachi 1998). La RA depende de una elevación del pH_i (Florman et al. 1989; Zeng et al. 1996) y se sabe que el Ca^{2+} es uno de los elementos clave para que ocurra este proceso que se descubrió en invertebrados marinos (Dan, 1954).

En los mamíferos, un aumento pH_i es fundamental para la RA inducida por la ZP (Arnoult et al. 1996). Entre los eventos implicados en este proceso tenemos la hiperpolarización de la membrana (Zeng, Y; Clark, E N; Florman 1995), la fosforilación de proteínas (Leclerc et al. 1996), la pérdida de colesterol (Cross & Razy-Faulkner 1997), el aumento de pH_i (Zeng et al. 1996), la pérdida de moléculas de la superficie celular (Oliphant et al. 1985), y la elevación de la moléculas de la superficie celular (Oliphant et al. 1985), y la elevación del $[Ca^{2+}]_i$ (Baldi et al. 1996). Es decir, la reacción acrosomal es consecuencia de la capacitación de los espermatozoides.

El Ca^{2+} es esencial para la fusión durante la RA; ionóforos de Ca^{2+} desencadenan este proceso *in vitro* y algunos bloqueadores de los canales de Ca^{2+} la inhiben (Darszon et al. 1999). La ZP induce cambios en el potencial de membrana de los espermatozoides (Arnoult et al. 1996) así como un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y el pH_i , que preceden la exocitosis del acrosoma en el espermatozoide (Florman et al. 1992; Florman et al. 1998).

3.4 Regulación del pH_i

La mayoría de los procesos celulares son influenciados y operan dentro de una gama restringida de pH_i. Los cambios en el pH_i afectan el estado de ionización de ácidos débiles y bases que están presentes en la mayoría de las proteínas y muchas biomoléculas (Boron 2004). Por lo tanto, como la actividad metabólica acidifica el citoplasma, cada organelo y compartimento celular tiene un pH variable (**Figura 2**). Cuando las células se exponen a condiciones con pH extracelular (pH_e) variable, la falta de regulación del pH_i puede tener consecuencias funcionales graves en éstas (Casey et al. 2010).

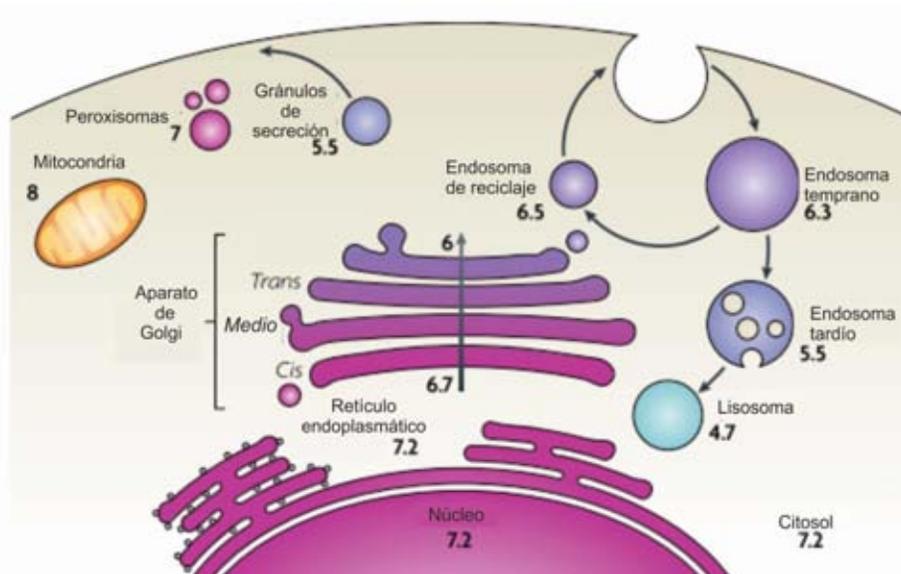


Figura 2. pH de los diferentes compartimentos subcelulares. El pH de organelos y compartimentos celulares individuales en una célula de mamífero prototípica. Los valores se obtuvieron de varias fuentes. El pH mitocondrial se refiere a la matriz, es decir, el espacio contenido entre membrana mitocondrial interna. Los endosomas tempranos se refieren a la clasificación del compartimento endosomal. El pH del endosoma tardío multivesicular se refiere al fluido luminal mayor; el pH del fluido contenido por las vesículas internas podría diferir (Modificada de Casey et al. 2010).

En general, las células ajustan finamente su pH_i empleando varios mecanismos dinámicos cuyo saldo en términos de producción, eliminación, transporte y amortiguamiento de H⁺ determina su valor en un momento

determinado. Las células aumentan o disminuyen la actividad de una amplia gama de transportadores de iones de la membrana plasmática que mueven ácidos y/o bases (Ruffin et al. 2014). Los transportadores de bicarbonato (HCO_3^-) y de H^+ se encuentran entre los principales actores en la regulación del pH_i (Nishigaki et al. 2014).

La alcalinización pH_i es fundamental para muchos aspectos de la fisiología de los espermatozoides. Además, muchos de estos procesos fisiológicos implican un mecanismo regulador de pH dependiente de Na^+ (Bibring et al. 1984; Lee & Garbers 1986). El mantenimiento del pH_i dentro de los límites fisiológicos es fundamental para la función celular. En particular, varias enzimas y transportadores iónicos únicos de espermatozoides cuya eliminación provoca infertilidad son pH dependientes o de alguna manera están relacionados con la regulación pH_i . Entre ellos se encuentran: CatSper, un canal de Ca^{2+} ; Slo3, un canal de K^+ ; intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoides (NHE) y la guanilato ciclasa soluble (GC). Por tanto, es claro que la regulación del pH_i es de suma importancia para la fisiología espermática (Nishigaki et al. 2014).

3.4.1 Principales moléculas que participan en la regulación del pH_i

Los principales transportadores de iones responsables de la regulación del pH_i se pueden ordenar en dos grupos: (1) los transportadores de membrana de H^+ y (2) transportadores de HCO_3^- . El primer grupo incluye intercambiadores Na^+/H^+ de la familia de acarreadores de soluto 9 (SLC9) (Orlowski & Grinstein 2011) y canales de H^+ (Lishko et al. 2010). El segundo grupo está constituido por transportadores de HCO_3^- , por ejemplo el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Boron et al. 2009)

El primer grupo, conocido como extrusores de protones (H^+) inducen una alcalinización intracelular. Los extrusores de H^+ se representan en el lado izquierdo de la **Figura 3**. Todos ellos requieren el aporte de energía, ya sea para la extrusión de H^+ de la célula o para tomar HCO_3^- . El canal de protones H_v1 se activa por una despolarización de la membrana plasmática y por el aumento de la

concentración de H^+ interna, mientras que el intercambiador Na^+/H^+ se activa por una despolarización de la membrana y utiliza la energía del gradiente de Na^+ para sacar H^+ (Murer et al. 1976). El intercambiador de Na^+ impulsado por Cl^-/HCO_3^- fue el primer transportador en ser estudiado como un regulador del pH_i (Boron 2004). El co-transportador electrogénico Na^+/HCO_3^- puede operar como un extrusor de H^+ o como un cargador de H^+ (Deitmer & Schlue 1989).

El segundo grupo, conocido como cargadores de H^+ inducen una acidificación intracelular. Los cargadores de H^+ se representan de lado derecho de la **Figura 3**, estos incluyen tres mecanismos no regulatorios; la entrada pasiva de H^+ , la salida pasiva de OH^- y la de HCO_3^- . El lado derecho de la **Figura 3** muestra también dos transportadores de HCO_3^- que pueden actuar como cargadores de H^+ (Boron 2004).

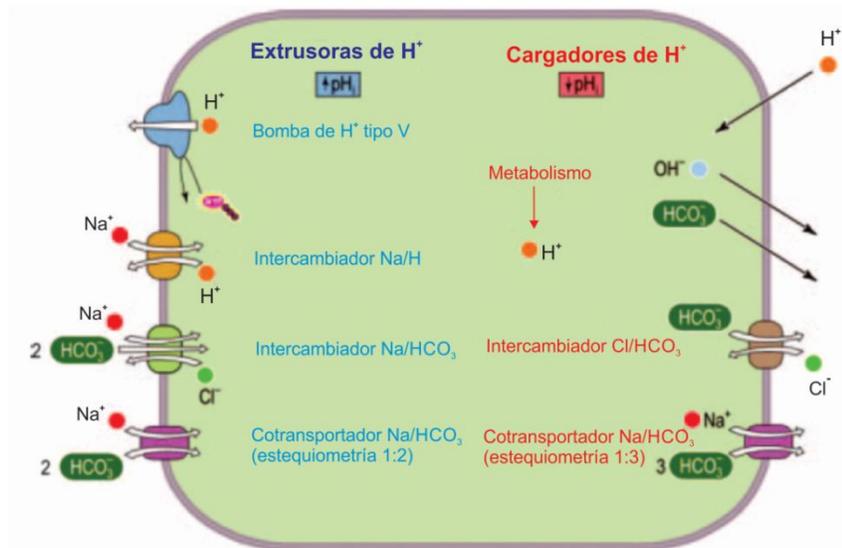


Figura 3. Extrusores de H^+ y Cargadores de H^+ . El estado de equilibrio del pH_i depende del equilibrio entre Extrusores de ácido continuos y de Cargadores de ácido crónicas (Modificado de Boron 2004).

3.5 Voltaje de membrana

La diferencia de potencial eléctrico generalmente se establece entre dos soluciones de electrolitos a diferentes concentraciones, separados por una

membrana permeable a los iones. Esta diferencia de potencial es llamada comúnmente como potencial de membrana (Ohshima & Kondo 1988), formalmente, el potencial se refiere al trabajo que se debe realizar en un campo electrostático para mover cargas eléctricas desde un punto a otro. Por otro lado, como su nombre lo indica, la diferencia de potencial (también denominado voltaje) es una magnitud física que cuantifica la diferencia de potencial eléctrico entre dos puntos, y su unidad de medida es el voltio (**ver análisis dimensional**) (Halliday et al. 2008). Por esta razón en el presente trabajo nos referiremos a esta diferencia como voltaje de membrana (V_m).

$$Em = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_e}{[K]_i} \quad \left| \quad Em = \frac{\left(\frac{J}{\text{mol} \cdot \text{K}}\right)^{(\text{K})}}{C/\text{mol}} \ln \frac{\text{mol}}{\text{mol}} \quad \right| \quad Em = \frac{J}{C} = 1 V$$

El V_m juega un papel importante en fenómenos electroquímicos observados en las biomembranas (Ohshima & Kondo 1988). Éste se genera y se mantiene por gradientes de concentración de iones tales como sodio, potasio, cloruro, y el hidrógeno. Los cambios en el V_m a menudo desempeñan un papel en la señalización transmembranal. El V_m también refleja la integridad física de la membrana citoplasmática (Shapiro 2004).

3.6 Canales iónicos activados por voltaje

Los canales iónicos activados por voltaje son proteínas de membrana que conducen iones a altas tasas de transporte y que pueden ser regulados por el voltaje a través de la membrana. El sensor de voltaje es una región del segmento transmembranal de la proteína con aminoácidos cargados que se mueven en respuesta a cambios en el campo eléctrico de la membrana (**Figura 4**). El movimiento del sensor inicia un cambio conformacional en la puerta de la vía conductora controlando así el flujo de iones (Bezanilla 2005).

Se propone que los canales activados por voltaje están conformados por tres partes básicas: el sensor de voltaje, el poro o la vía de conducción y la compuerta (Bezanilla 2005).

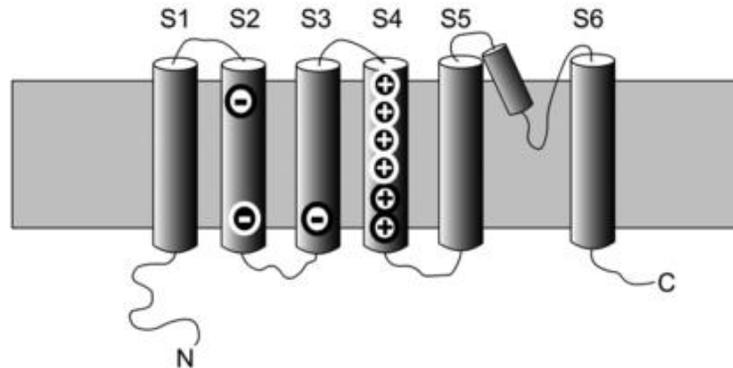


Figura 4. Arquitectura general de los canales activados por voltaje. El fondo gris representa la bicapa lipídica. Los cilindros son segmentos transmembranales. Los segmentos S5 y S6 y el poro (el loop entre los segmentos 5 y 6) son los responsables de la conducción de los iones. Los segmentos del 1 al 4 se denominan la parte sensible al voltaje del canal. Los signos + o - en blanco indican las cargas que se han implicado en la detección de voltaje (Bezanilla 2005).

Las regiones S1-S4 de un canal iónico típico comprenden el dominio de detección de voltaje, dentro de la cual S4, en particular, tiene una serie de residuos de Arginina cargadas que aparecen para detectar el voltaje de membrana. Las regiones S5-S6 de las cuatro copias de las subunidades ilustradas forman un solo poro central que se abre y se cierra durante la activación (DeCoursey 2008).

3.6.1 Intercambiadores Na^+/H^+

Son proteínas integrales de membrana que catalizan el intercambio de Na^+ por H^+ a través de la bicapa lipídica y se distribuyen de forma ubicua en casi todos los organismos. Contribuyen a los mecanismos homeostáticos que regulan el pH_i , volumen celular y pH intraorganelo (Donowitz et al. 2005). Se sabe que los espermatozoides de mamíferos expresan cuatro isoformas de NHEs, NHE1 (SLC9A1), NHE5 (SLC9A5) (Garcia & Meizel 1999; Woo et al. 2002), NHE específico de espermatozoide (NHEs) (SLC9C1) (Wang et al. 2003) y NHE específica de testículo (NHA1/SLC9B1) (Liu et al. 2010).

Se demostró que NHEs es esencial para la función espermática ya que su eliminación causó infertilidad en ratones macho debido a un defecto severo en la

movilidad del espermatozoide (Wang et al. 2003). Por otro lado, se ha demostrado previamente que la capacitación de espermatozoides de humano requiere concentraciones milimolares de Na^+ en el medio de incubación para mantener un pH_i elevado (Garcia & Meizel 1996).

Por otro lado, se ha encontrado que la inhibición de NHE por 5-(N-etil-N-isopropil) amiloride (EIPA) resulta en recobrar la acidificación citosólica. Estos resultados sugieren que un mecanismo de intercambio Na^+/H^+ representa una importante vía de regulación del pH_i en espermatozoides humanos previamente capacitados, sin embargo, EIPA no afecta al NHE del espermatozoide (Woo et al. 2002; Wang et al. 2003).

La inhibición de la regulación de pH_i dependiente de NHE en espermatozoides capacitados no es suficiente para bloquear la iniciación de la RA por Progesterona (Woo et al. 2002; Wang et al. 2003). Sin embargo, el mecanismo de regulación de pH_i puede verse afectado por esta inhibición (Garcia & Meizel 1996).

3.6.2 Canal de H^+

La existencia de un canal iónico de membrana plasmática selectivo para los protones se demostró primero por Thomas & Meech en 1982, pero pasaron varias décadas para que la molécula responsable de este fenómeno fuera identificada (Ramsey et al. 2006).

El canal de protones dependiente de voltaje (H_v1) tiene una secuencia básicamente similar a S1-S4, pero las regiones S5-S6 están ausentes. Aunque tres residuos de Arginina están presentes en la región S4 en el canal de protones, no está claro que contribuyen a la activación por voltaje. Debido a que las regiones S5-S6 que componen el poro de los canales activados por voltaje ordinarios están ausentes, la forma de conducción por esta vía no se entiende completamente. Estudios recientes sugieren que los segmentos del canal H_v1 actúan como un dímero, donde cada subunidad tiene un poro (Koch et al. 2008).

A Clásico canal iónico activado por voltaje **B** Canal de protones activado por voltaje



Figura 5. Conformación Oligomérica y ubicación de los poros en los canales iónicos clásicos activados por voltaje y canal Hv1. Los canales iónicos clásicos activados por voltaje se componen de cuatro subunidades (K_v) o de cuatro dominios (Na^+ y Ca^{2+}). **(A)** Cada subunidad o dominio se compone de seis dominios transmembranales (S1-S6). Los primeros cuatro segmentos albergan el dominio sensible a voltaje. Los segmentos S5-S6 forman el dominio del poro. **(B)** El canal H_v1 presenta una composición oligomérica que involucra a dos subunidades, que es una de las diferencias más notorias en comparación con otros canales activados por voltaje (Castillo et al. 2015).

En el 2006 se identificaron dos grupos de canales de H^+ activados por voltaje (Ramsey et al. 2006; Sasaki et al. 2006) que se componen de 4 segmentos transmembranales, estructuralmente similares a los dominios sensibles a voltaje que se encuentran en otros canales iónicos activados por voltaje. Estos canales existen como un homodímero con dos poros y donde cada subunidad forma un poro permeable a H^+ . (DeCoursey 2008). El canal H_v1 es activado por una despolarización de la membrana y por el aumento en la concentración de H^+ intracelular, lo que provoca la salida de H^+ (DeCoursey 2008; Lishko & Kirichok 2010). El endocannabinoide anandamida y el zinc extracelular son bloqueadores potentes de H_v1 (Lishko & Kirichok 2010). Registros de espermatozoides humanos hechos por patch-clamp revelaron una conductancia de H^+ dependiente de voltaje relativamente grande (Lishko et al. 2010).

En los espermatozoides de humano, el canal de protones activado por voltaje (H_v1) es la principal vía de extrusión de H^+ que controla el pH intracelular (Lishko & Kirichok 2010). Por otro lado, la actividad del canal CatSper es fuertemente potenciada por la alcalinización intracelular. Ya que los canales H_v1 y CatSper se

encuentran en el mismo dominio subcelular, la extrusión de protones a través de H_v1 debería inducir una alcalinización intraflagelar y activar los canales iónicos CatSper. Por lo tanto, la acción combinada de H_v1 y CatSper en espermatozoides humanos puede inducir la elevación del pH y Ca^{2+} intracelular necesarias para la activación del espermatozoide en el tracto reproductivo femenino (Lishko & Kirichok 2010).

El voltaje umbral de activación de H_v1 depende de la diferencia de pH (ΔpH) a través de la membrana plasmática. A un pH intracelular de 5.5 y un pH extracelular de 7.4, el umbral de activación de H_v1 es de aproximadamente -60 mV (Lishko et al. 2010). Sin embargo, ya que el pH_i del espermatozoide es más alto que 5.5, en condiciones fisiológicas, el umbral de activación de H_v1 es menos negativo, y el canal no debe estar activo en el espermatozoide humano en un voltaje de membrana en reposo. Bajo estas condiciones, H_v1 puede ser activado por cualquier despolarización de la membrana o por la anandamida extracelular (Lishko & Kirichok 2010).

Ya que H_v1 saca protones y por lo tanto lleva cargas positivas hacia fuera de la célula, H_v1 podría producir una hiperpolarización de la membrana la cual limitaría su propia actividad, a menos que esta hiperpolarización sea compensada por otros mecanismos de transporte electrogénicos (Lishko & Kirichok 2010).

Curiosamente, la actividad de H_v1 en el espermatozoide es mucho mayor en espermatozoides capacitados (Lishko et al. 2010). La corriente de H_v1 en espermatozoides capacitados se caracteriza por una amplitud mayor, la cinética de activación más rápida, y un cambio negativo del voltaje de activación (Lishko et al. 2010.), que puede estar asociada con la fosforilación del canal (DeCoursey, 2008). Puesto que la fosforilación de múltiples proteínas es un paso crucial en el proceso de la capacitación espermática (Visconti et al. 2011), se cree que la fosforilación puede mejorar la capacidad de H_v1 para causar elevación del pH_i durante la capacitación.

El canal de H_v1 se ha identificado en muchas especies, y se encontró que

participa en una amplia variedad de procesos fisiológicos especializados como la alcalinización de condrocitos después de un choque hipotónico (Sánchez et al. 2006), la regulación del voltaje de membrana y pH_i en fibroblastos cardíacos de humano (El Chemaly et al. 2006), la bioluminiscencia en dinoflagelados (Smith et al. 2011), la producción de calcita por algas unicelulares (Beaufort et al. 2011; Taylor et al. 2011); fertilización en espermatozoides de anfibios y humano (Lishko et al. 2010), entre otras.

3.7 Citometría de flujo

Numerosas estrategias se han desarrollado en los últimos 30 años para medir el pH_i y el V_m . Sus ventajas y limitaciones se están revisando continuamente. Estas técnicas involucran determinaciones en poblaciones de células o en células individuales e incluyen: 1) ^{31}P resonancia magnética nuclear (RMN), 2) Distribución débil ácido-base, y 3) absorbancia óptica y técnicas de fluorescencia (Loiselle & Casey 2010). En los últimos años el pH_i se está estudiando en los espermatozoides sobre todo con el uso de sondas fluorescentes (Nishigaki et al. 2014). Cada técnica tiene limitaciones prácticas y teóricas para determinar el pH_i cuantitativamente (Adler & Fraley 1977).

La citometría de flujo (CMF) es una tecnología biofísica que mide simultáneamente y luego analiza múltiples características físicas de las células individuales, a medida que fluyen en una corriente fluida a través de un haz de luz láser. Las propiedades medidas incluyen tamaño relativo de una partícula, granularidad relativa o complejidad interna, y la intensidad relativa de fluorescencia. Estas características se determinan usando un sistema de acoplamiento óptico-electrónico que registra cómo la célula dispersa la luz láser incidente y emite fluorescencia (Williams et al. 2011).

La CMF se ha utilizado ampliamente para estudiar los espermatozoides de mamífero en las áreas de toxicología reproductiva, veterinaria (preseleccionar el sexo de la descendencia por la clasificación de los espermatozoides portadores de cromosomas X o Y) y para la andrología clínica (para evaluar el potencial de

fertilidad de los individuos). El uso de la CMF permitió que se pueda medir rápidamente una variedad de características de los espermatozoides, célula por célula, tales como el recuento de espermatozoides, la viabilidad, integridad acrosomal, la función mitocondrial y la integridad del ADN; el último está involucrado en un fracaso post-fecundación e inviabilidad del embrión (Cordelli et al. 2005).

La CMF ofrece un enfoque automatizado capaz de medir la cantidad de una o más marcas fluorescentes asociadas con las células de una manera imparcial, que ofrece propiedades inigualables de precisión, sensibilidad, rapidez, el análisis multiparamétrico en un número estadísticamente relevante de células. La creciente disponibilidad de sondas fluorescentes ha estimulado el interés en una variedad de métodos para abordar muchas propiedades del espermatozoide (Cordelli et al. 2005).

4 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la alcalinización del pH citosólico durante la capacitación es fundamental para muchos procesos fisiológicos de los espermatozoides, es de gran importancia conocer cómo se lleva a cabo ésta regulación. En particular nuestro interés surge por un reporte en el que dan a conocer que durante la capacitación ocurre una hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide de humano (López-González et al. 2014).. Nosotros nos propusimos evaluar cuál es la relación que hay entre el voltaje de membrana y el pH_i , así como las entidades moleculares que participan en esta regulación. Debido a que se conocen dos entidades moleculares que participan en la regulación del pH_i : el intercambiador Na^+/H^+ , activado por hiperpolarización y el canal de protones H_v1 , activado por despolarización, decidimos evaluar cuál de estos dos canales contribuye en mayor medida a la alcalinización citosólica.

La mayoría de estudios de fisiología espermática se han hecho tradicionalmente con técnicas de fluorescencia de poblaciones y con electrofisiología. Sin embargo, la citometría de flujo nos brinda un par de ventajas sobre las técnicas mencionadas, por lo que representa una alternativa para el estudio de la fisiología del espermatozoide. La CMF permite analizar una cantidad sorprendente de células en un tiempo muy corto, además, con la posibilidad de medir varios parámetros al mismo tiempo. Esta técnica posibilita descartar a las células muertas y aquellas que se marcan de manera significativamente anormal con el fluoróforo, permitiéndonos así, seleccionar la población de espermatozoides en la que se puede analizar la respuesta al estímulo de interés sin sesgar los datos.

Si bien, la citometría de flujo es una técnica indirecta para medir los parámetros de interés, es un excelente acercamiento al estudio de algún fenómeno, que se puede complementar con estudios de electrofisiología.

5 HIPOTÉISIS

Los cambios en el potencial de membrana son inversamente proporcionales a los de pH_i en los espermatozoides de humano. Una hiperpolarización de la membrana plasmática de los espermatozoides induce una alcalinización intracelular, tanto en los espermatozoides no capacitados como en los capacitados.

6 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los cambios del voltaje de membrana (V_m) y del pH intracelular (pH_i) en los espermatozoides de humano en condiciones no capacitantes y capacitantes mediante la técnica de citometría de flujo.

Objetivos particulares

- Calibrar los cambios del voltaje de membrana (E_m) a diferentes concentraciones de potasio extracelular por citometría de flujo.
- Determinar cuál es la relación entre el pH_i en función del voltaje de membrana con el uso de citometría de flujo.

7 MATERIALES Y MÉTODO

7.1 Reactivos

Medio no capacitante: se utilizó medio Ham's F-10 con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) (1.2g/L) (Sigma-Aldrich, #cat. N6013).

Medio capacitante: se utilizó el mismo medio Ham's F-10 ocupado para la condición no capacitante, suplementado con 2 mM de CaCl_2 (Sigma-Aldrich, #cat. C3881) y albumina de suero fetal bovino (BSA) 5 mg/ml (Sigma-Aldrich, #cat. A7906).

Medio de registro para humano: Se utilizó MRH (D-Glucosa 5mM, Hepes 20 mM, KCl 4 mM, Lactato de sodio 10 mM, MgCl_2 1 mM, NaCl 120 mM, NaHCO_3 25 mM, Piruvato de sodio 1 mM, CaCl_2 2 mM) como medio fisiológico para tener a las células después de la capacitación y se llevó a un pH de 7.4.

Medición de pH: Se utilizó 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(6)-Carboxifluoresceína, Acetoximetil Ester (BCECF-AM) 100 nM (Invitrogen MP, #cat. B1170).

Medición del voltaje de membrana: se utilizó DiSC3 (5) 25 nM (Invitrogen, #cat. D306).

Determinación de viabilidad celular: se utilizó yoduro de propidio 100 nM (Invitrogen, #cat. L-7011).

Inducción de hiperpolarización: se utilizó valinomicina 2 μM (Sigma #cat. 10501005).

Inducción de depolarización: se utilizó cloruro de potasio (KCl) (Sigma, #cat. P3911) (se realizaron adiciones de 0.6, 1.5, 3, 6, 12 y 24 mM sobre la concentración de K^+ extracelular).

Como control positivo para espermatozoides muertos se utilizó 0.1% de tritón X-100 (t-Octilfenoxipolietoxietanol) (Sigma-Aldrich, #cat: X100).

7.2 Equipo

Para la medición de pH_i y el voltaje de membrana se usó el citómetro de flujo BD Accuri C6 con:

Laser de excitación: 488 nm y 640 nm.

Detectores: FL1 533/30 nm para detectar BCECF, FL2 585/40 nm para detectar IP, FL3 > 670 nm, y FL4 675/25 nm para detectar DiSC.(Anon 2014)

7.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y la elaboración de gráficas se utilizó GraphPad Prism 6. Se utilizó la prueba de T de Student pareada.

7.4 Obtención de la muestra de semen

Se trabajó con espermatozoides de humano provenientes de donadores sanos de 20 a 30 años que tuvieron al menos dos días de abstinencia sexual y que cumplieron con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS): volumen ≥ 1.5 ml, pH ≥ 7.2 , concentración espermática ≥ 15 millones de células por ml, cantidad total de espermatozoides ≥ 39 millones de células por eyaculación, $\geq 32\%$ con movilidad progresiva, $\geq 4\%$ con morfología normal y con $\geq 58\%$ de viabilidad.

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación, se colectaron en frascos de plástico estériles y se incubaron a 37°C en una atmosfera con CO₂ al 5% durante aproximadamente 30 minutos, tiempo en el cual se llevó a cabo la licuefacción de la muestra, es decir, que el semen pase de una consistencia viscosa a una más líquida.

7.5 Obtención de los espermatozoides móviles

Para seleccionar los espermatozoides con mayor movilidad se realizó la técnica de Swim-up que consiste en poner en la base de tubos de ensayo una muestra de 500 μ l de semen licuado y en la parte superior se agregó 1 ml de medio Ham's F-10 (suplementado con 2 mM de CaCl_2 para espermatozoides no capacitados y además albumina de suero fetal bovino (BSA) 5 mg/ml para espermatozoides capacitados) a un ángulo de aproximadamente 30° para aumentar la superficie de contacto entre el semen y el medio Ham's y así recuperar un mayor número celular teniendo cuidado de no mezclar las dos fases y se incubó durante una hora a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Posteriormente se recuperaron 800 μ l de la parte superior del medio Ham's F-10 en la cual se obtienen los espermatozoides móviles y la concentración de células se determinó en una cámara Mackler.

7.6 Capacitación

Los espermatozoides recuperados en el Swim-up en condiciones capacitantes (1hr de swim-up) se capacitaron *in vitro* incubándolos en un medio capacitante a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ durante aproximadamente 4 horas más.

Los espermatozoides recuperados en el Swim-up en condiciones no capacitantes (1hr de swim-up) se colocaron en medio no capacitante y se incubaron igualmente a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ por el mismo tiempo que los espermatozoides capacitados.

Para cada condición experimental, se añadieron 500 μ l de la suspensión de espermatozoides en tubos eppendorf de 1.5 ml (aproximadamente 1 millón de espermatozoides por tubo).

7.7 Incubación con fluoroforos

- a) **BCECF, AM:** los espermatozoides se incubaron con BCECF a 100 nM en medio Ham's, durante 5 minutos a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Posteriormente se

centrifugaron, se quitó el sobrenadante (Que contiene el exceso de colorante no incorporado a las células) y se resuspendió en MRH.

- b) DiSC₃(5):** una vez lavados los espermatozoides, se incubaron aproximadamente 3 minutos (dependiendo de cada donador) con DiSC₃ (5) a 25 nM a 37°C/5% CO₂ antes de la adquisición de datos en el citómetro de flujo para cada condición experimental.
- c) Ioduro de Propidio:** pasado el tiempo de incubación del DiSC₃ (5), se le agregó yoduro de propidio (100 nM), incubándolo 1 minuto y se procedió a la adquisición de datos.

7.8 Calibración del citómetro

La calibración del equipo se realizó con perlas de validación Spherotech 6-picos (653145) (FL4) que contiene una mezcla de partículas (3.0-3.4 µm) en seis intensidades de fluorescencia diferentes. Las partículas son excitadas con luz láser a una longitud de onda de 600-650 nm. Y 8-picos (653145) (FL1, FL2, FL3) que contiene una mezcla de partículas (3.0-3.4 µm) con ocho diferentes intensidades de fluorescencia que se excitan con el láser azul (488 nm).

7.9 Compensación y establecimiento de cuadrantes

La compensación permite corregir la superposición que existe cuando se utilizan fluoróforos con espectros de emisión similares. Esta se realizó siempre antes de cada experimento, usando células “sin teñir” como control negativo para fluorescencia, células incubadas solamente con BCECF como control positivo para nuestro detector FL1, células incubadas solamente con DiSC como control positivo para nuestro detector FL4, y células muertas (se permeabilizaron con Tritón X-100) marcadas solamente con ioduro de propidio como control positivo para nuestro detector FL2. Una vez que se tuvieron los valores correctos se establecieron los cuadrantes para seleccionar nuestra población, positiva para BDCECF y DiSC y negativa para yoduro de propidio.

7.10 Adquisición de datos

Una vez compensado el equipo se procedió a la adquisición de datos. De la adquisición total (comparación tamaño/complejidad) se seleccionó la población de espermatozoides, de ésta se seleccionaron las células únicas (comparando altura/área). Se adquirieron 10 000 eventos (células únicas) para cada condición experimental, adquiriendo siempre el antes y después de cada condición experimental, es decir, para cada condición se adquirió primero 10 000 células únicas sólo con los fluoróforos, y después se adquirieron 10 000 células únicas con el respectivo reactivo. Los datos de fluorescencia de las células se obtuvieron usando un Citómetro de flujo Accuri C6 (Becton Dickinson).

7.11 Controles

Con el fin de evaluar la respuesta provocada por los vehículos y controles, se adquirieron muestras a las que se les adicionó sólo uno de los siguientes reactivos:

- a) **DMSO:** se utilizó DMSO al 0.4% como vehículo.
- b) **MRH:** para ver los cambios en fluorescencia debidos a la dilución.
- c) **Cloruro de Amonio:** se utilizó NH_4Cl a 20 mM como control positivo para alcalinización.
- d) **Valinomicina:** se utilizó valinomicina a 2 μM como control positivo para hiperpolarización.
- e) **Progesterona:** se utilizó Pg a 4 μM como control positivo para inducir de manera fisiológica una alcalinización o hiperpolarización.

7.12 Calibración del voltaje de membrana

Para obtener nuestros resultados en unidades de voltaje y no en UAF se siguió el siguiente protocolo.

A un tubo eppendorf de 1.5 ml se le agregaron 500 μl de la suspensión de espermatozoides, se incubó con los fluoróforos como se describió previamente en el apartado 7.6. Posteriormente se le añadió valinomicina a 2 μM . Y se le hicieron

adiciones consecutivas de KCl (3, 6, 12 y 24 mM). La adquisición se hizo después de cada adición. Lo anterior se realizó en espermatozoides capacitados y no capacitados para cada uno de los donadores.

7.13 Inhibición de la hiperpolarización de la membrana inducida por valinomicina modificando el K⁺ extracelular

Con la idea de evaluar el efecto de la despolarización de la membrana sobre el pH_i se llevó a cabo el siguiente protocolo.

Se utilizaron 7 tubos Eppendorf de 1.5 ml a los cuales se le agregaron 500 µl de la suspensión de espermatozoides, se incubaron con los fluoróforos como ya se describió. Después a cada tubo se le añadió una concentración distinta de KCl (0.3, 0.6, 1.5, 3, 6, 12 y 24 mM). Posteriormente se le añadió valinomicina a cada tubo. La adquisición se hizo después de cada adición en espermatozoides capacitados y no capacitados.

7.14 Análisis en FlowJo

De la adquisición total se seleccionó la población de espermatozoides (**Figura 6a**) en función del tamaño (FSC) y la granularidad (SSC), de ésta se seleccionaron las células únicas (**Figura 6b**) descartando agregados en función del área (FSC-A) y la altura (FSC-H). Finalmente se establecieron los cuadrantes para cada colorante (**Figura 6c y 6d**). Para esto se hicieron experimentos independientes en el que se ocuparon espermatozoides sin ningún fluoróforo (en rojo), espermatozoides a los que se les adicionó solamente IP (en naranja) y espermatozoides a los que se les agregó únicamente BCECF o DiSC (en azul).

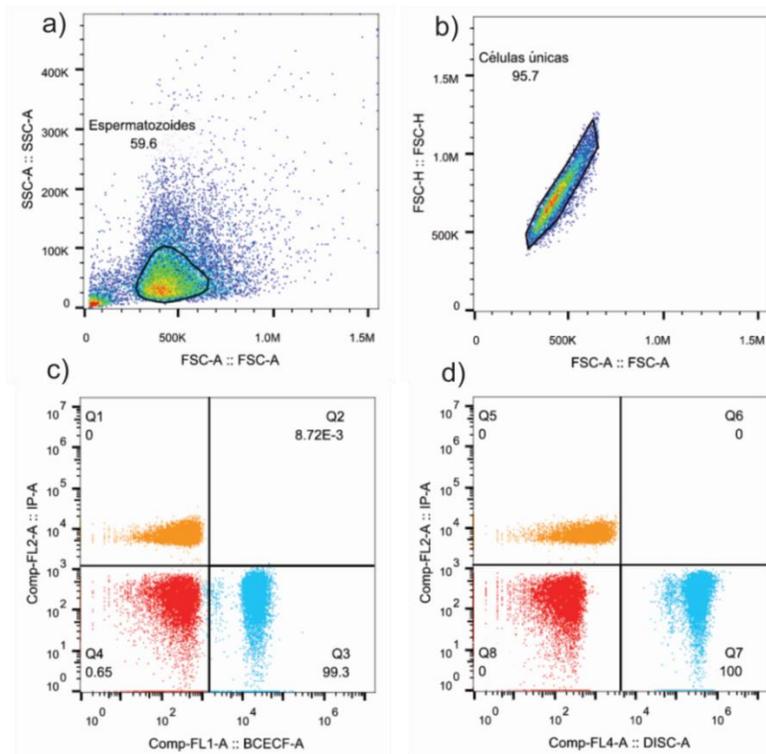


Figura 6. Establecimiento de cuadrantes. Gráficos proporcionados por FlowJo. a) selección de la población de espermatozoides, b) selección de células únicas, c) establecimiento del cuadrante para positivo BCECF (en azul), positivo IP (en naranja) y células sin fluoróforo (en rojo), d) establecimiento del cuadrante para positivo DiSC (en azul), positivo IP (en naranja) y células sin fluoróforo (en rojo). Tanto en c) como en d) el cuadrante superior derecho corresponde a células cargadas con IP y con DiSC. Se muestran espermatozoides capacitados.

7.14.1 Selección de la muestra a evaluar

Al hacer el análisis de las células se observó que se formaban dos poblaciones, esto fue más evidente en los espermatozoides no capacitados (**Figura 7a**) que en los capacitados. Esto provocaba que en el gráfico de distribución de las células se formara un gráfico con dos picos (**Figura 7b**), lo que tiene como consecuencia que la media geométrica no representara la fluorescencia de la población con mayor número celular, porque no se tiene una distribución normal.

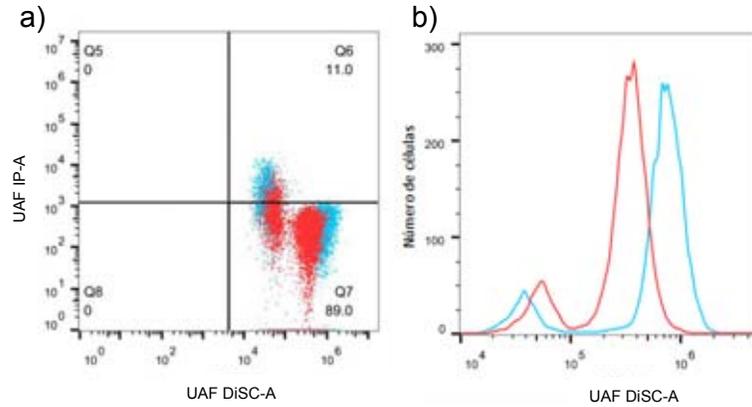


Figura 7. Formación de dos poblaciones. Gráficos representativos en los que se muestra el voltaje de membrana en espermatozoides no capacitados antes (en rojo) y después de la adición de valinomicina (en azul). a) gráfico de puntos en el que se observa claramente dos poblaciones, b) gráfico de distribución de las células con dos picos.

Al analizar las adquisiciones se observó que la población que responde a valinomicina se posiciona de lado derecho (la población con mayor densidad celular). La población de lado izquierdo se despolariza, lo que nos indica que son células que no se encuentran en buenas condiciones y/o que están muriendo. Por esta razón se decidió estudiar solamente la población de lado derecho (**Figura 8a**) y de esta manera nuestros gráficos representaban solamente a las células con la respuesta a la valinomicina esperada (**Figura 8b**), y así nuestro valor de la media geométrica no se sesgaba.

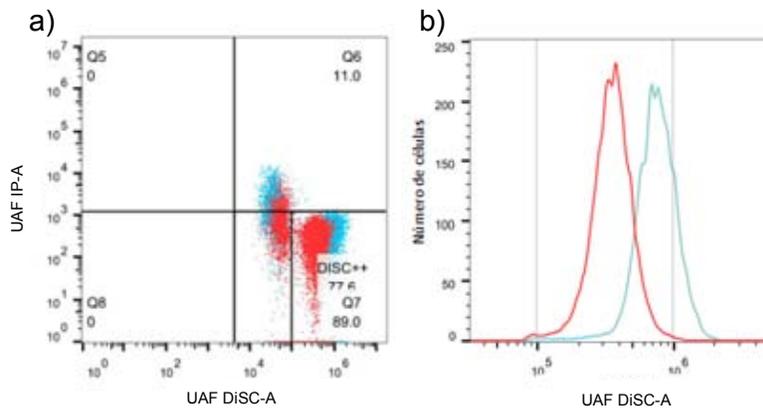


Figura 8. Selección de la población a estudiar. Para evitar el sesgo de datos se decidió analizar solamente la población que responde a valinomicina, es decir, la que se hiperpolarizaba ante la adición de valinomicina. a) establecimiento del cuadrante DiSC ++ que incluye solamente a las células que responden a valinomicina, b) gráfico de distribución de las células con distribución normal.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Cinética BCECF, AM

Debido a que el BCECF es permeable a la membrana, éste se incorpora y permanece en el espacio citoplasmático. Para conocer el comportamiento y fluctuaciones de los fluoróforos en el tiempo se realizó la curva de calibración de BCECF. Las células se cargaron en MRH y en HAM's para ver si había alguna diferencia durante 10 minutos, haciendo una adquisición cada minuto.

Para poder comparar las diferentes curvas, se normalizaron las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF), siendo 1 el primer valor de las UAF para cada curva. En la **Figura 9** se muestra el promedio normalizado de las UAF \pm error estándar.

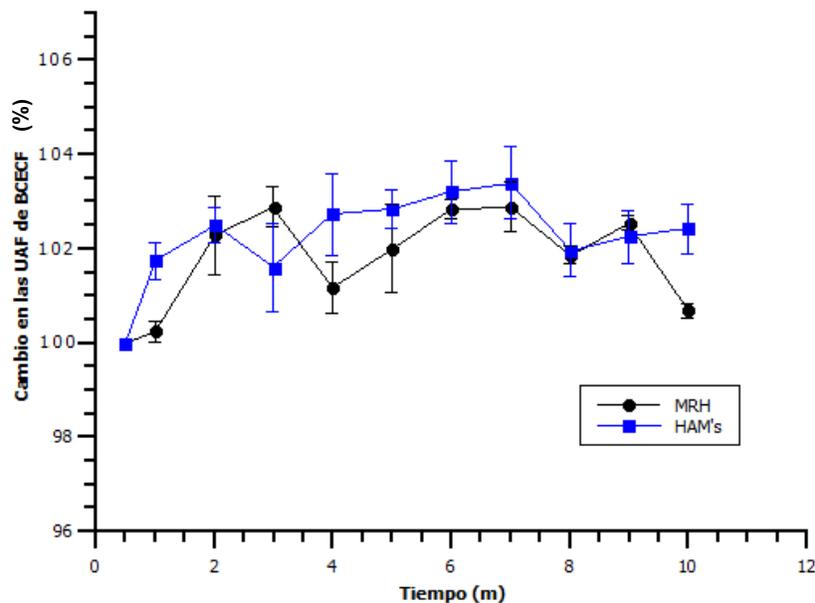


Figura 9. Cinética de BCECF, AM. Se cargaron las células con BCECF en MRH (en negro) y en HAM's (en azul) durante 5 minutos, posteriormente se lavaron y se prosiguió con la adquisición. Se adquirieron 10 000 células cada minuto, durante 10 minutos. N=4

Como se puede observar en la **Figura 9** El BCECF no es perfectamente estable, sin embargo, nunca aumenta o disminuye más de 4%, este resultado es

importante para poder discutir las respuestas a nuestras condiciones experimentales.

Al no observar diferencias significativas entre cargar las células con el fluoróforo en MRH y HAM's, se decidió cargar en HAM's.

8.2 Cinética DiSC₃ (5)

El DiSC es un colorante catiónico que se particiona entre el medio extracelular e intracelular dependiendo del potencial eléctrico de la célula. Para determinar el tiempo necesario para su partición se realizó la curva de calibración para cada donador antes de comenzar con el experimento, tanto para células capacitadas como no capacitadas. En la **Figura 10** se muestra el promedio normalizado de las UAF \pm error estándar, se estableció como 0 la adquisición sin fluoróforo. Se adquirieron 10 000 células cada minuto durante 10 minutos.

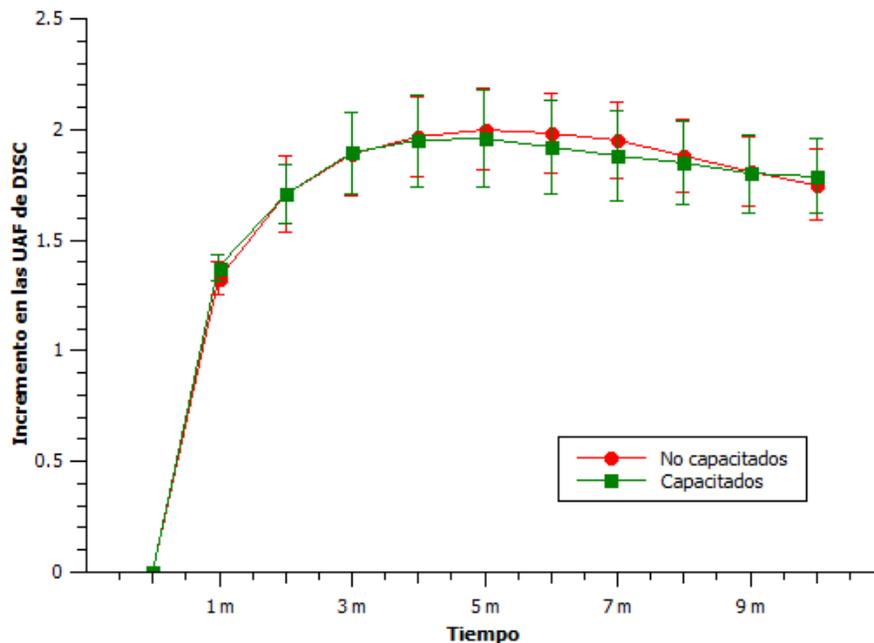


Figura 10. Cinética de DiSC₃ (5). Se cargaron las células con DiSC y se prosiguió con la adquisición. Se adquirieron 10 000 células cada minuto, durante 10 minutos, tanto en células capacitadas (en verde) como no capacitadas (en rojo). N=8

Una vez hecha la curva de calibración se comenzó con el experimento, en el cual, dependiendo del donador, la adquisición se llevó a cabo aproximadamente a partir del minuto tres, donde el DiSC es más estable.

8.3 Cinética Valinomicina

Así mismo se realizó la curva de calibración de la valinomicina para saber en qué momento después de la adición de valinomicina se llega al máximo de hiperpolarización inducida, y así saber en qué minuto adquirir las células.

En la **Figura 11** se muestra el promedio normalizado de las UAF \pm error estándar, se estableció como 0 la adquisición sin valinomicina. Se adquirieron 10 000 células cada minuto durante 5 minutos.

Ésta cinética determinó que la acción de la valinomicina es inmediata, es decir, la valinomicina induce la máxima hiperpolarización enseguida de ser añadida. Los experimentos se realizaron dejando incubar la valinomicina un minuto.

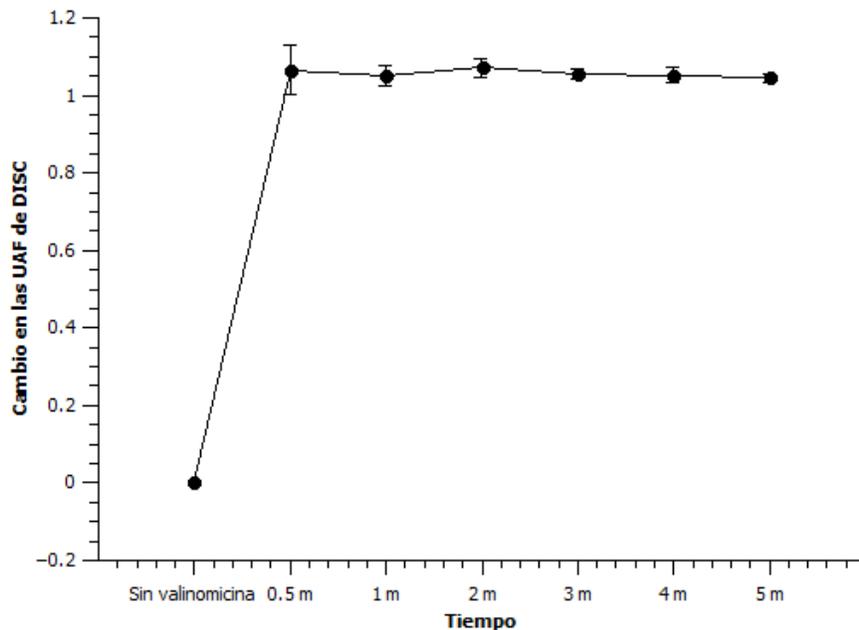


Figura 11. Efecto de la valinomicina. Se le adiciono valinomicina 2 μ M a células cargadas con DiSC, La primera adquisición se hizo a los 30 segundos, y después se realizó una adquisición cada minuto durante 5 minutos. N=4

8.4 pH intracelular

La regulación del pH_i es esencial para la función celular, es crítico para la actividad de enzimas (Perez-Sala et al. 1995) y el transporte de iones (Masuda et al. 1998). La difusión pasiva de iones está basada en sus gradientes electroquímicos y depende de su permeabilidad. La ecuación de Nernst predice el V_m que se alcanza cuando se llega al equilibrio de Donnan; si estos cálculos se realizan para H^+ , el nivel predicho de pH_i , cuando el pH_e es 7.4 es de aproximadamente 6.4, considerablemente más bajo que el pH_i medido bajo estas condiciones. De ello se deduce, por lo tanto, que existen mecanismos que regulan el pH_i , y lo mantienen a un nivel por encima del predicho por el gradiente electroquímico (Boyer & Hedley 1994). En particular, los espermatozoides tienen un pH_i de 6.70 ± 0.01 (Fraire-Zamora & González-Martínez 2004) y la alcalinización citosólica es esencial para que ocurra la capacitación (Vredenburg-Wilberg & Parrish 1995; Zeng et al. 1996; Cross & Razy-Faulkner 1997) y la RA (Arnoult et al. 1996).

La medición del pH_i usando sondas fluorescentes representa una alternativa para llevar a cabo estudios *in situ*. Sin embargo, al ser una técnica indirecta de medición de pH, nuestros resultados son en UAF, por lo tanto sólo podemos reportar el cambio del pH_i en porcentaje, o en UAF. Existen alternativas para poder calibrar la medición del pH_i , y así poder reportar los resultados en unidades de pH, sin embargo, por cuestiones técnicas, en el presente trabajo se reportan los resultados del pH_i en porcentaje.

Al contar con las mediciones del pH_i en espermatozoides capacitados y no capacitados, se quiso hacer la comparación para corroborar la alcalinización durante la capacitación, sin embargo, al llevar a cabo dicha comparación se observó que las UAF son de menor magnitud en los espermatozoides capacitados que en los no capacitados, esto se puede explicar por la presencia de suero fetal bovino en el medio capacitante, el cual absorbe BCECF, y como consecuencia las UAF son menores en los espermatozoides capacitados. Por ésta razón, para

estudios posteriores se deberán considerar como no capacitados el tiempo cero en condiciones capacitantes, para que de ésta manera todas las muestras estén expuestas a la misma concentración de albúmina.

En la **Figura 12** se muestran los resultados de un donador en el que si se observó un aumento en la fluorescencia de BCECF en los espermatozoides capacitados (**Figura 12a**), se normalizó el promedio de las UAF, estableciendo el valor de los espermatozoides no capacitados como el 100% (**Figura 12b**).

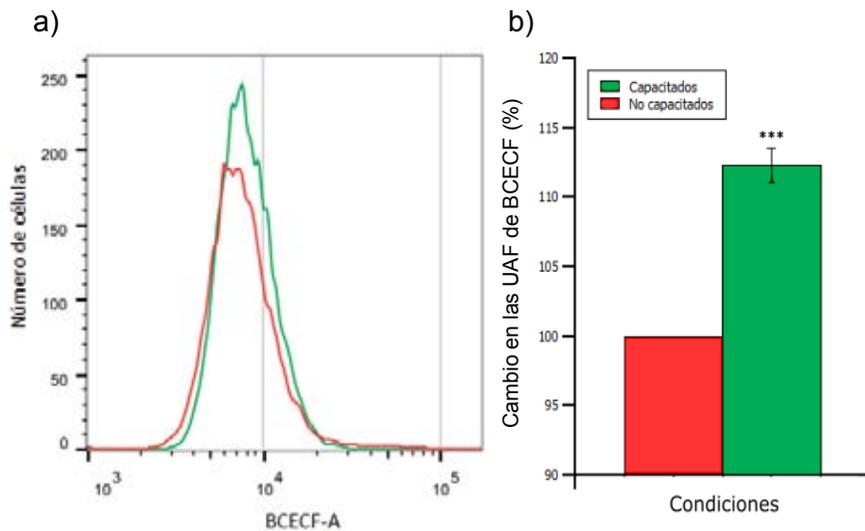


Figura 12. Comparación del pHi en espermatozoides no capacitados y capacitados. La alcalinización citosólica es esencial para que ocurra la capacitación espermática. Se realizó la comparación entre el pHi de los espermatozoides no capacitados con el pHi de los espermatozoides capacitados de un donador en el que si se observó un aumento de de la fluorescencia del BCECF. a) Gráfico de distribución de las células en el que se observa un aumento en la fluorescencia de BCECF en los espermatozoides capacitados (en verde) a comparación de los no capacitados (en rojo), b) Gráfica de barras en el que se compara el pHi de espermatozoides capacitados y no capacitados \pm error estándar. N=1 donador, 13 valores de promedio de UAF. ***($P \leq 0.001$)

Sólo en uno de los ocho donadores se observó un aumento en la fluorescencia de BCECF después de la capacitación, y la diferencia fue significativa ($P \leq 0.001$). Nuestros resultados no contradicen lo ya reportado sobre

la alcalinización citosólica durante la capacitación, sino que por cuestiones metodológicas no pudimos observar ésta alcalinización en todos los casos. Es necesaria la calibración de la fluorescencia para la medición del pH_i tanto en condiciones capacitantes como no capacitantes, para poder reportar el pH en unidades correspondientes y así determinar la magnitud de ésta alcalinización.

8.5 Voltaje de membrana en reposo

Se sabe que en los espermatozoides de ratón y bovinos, ocurre una hiperpolarización de la membrana durante la capacitación. Los espermatozoides no capacitados de ratón y bovino tienen un voltaje de membrana aproximado de -35 y -30 mV, respectivamente. En comparación con los espermatozoides capacitados de ratón y bovino que tienen un voltaje de membrana aproximado de -50 y -60 mV, respectivamente (Zeng, Y; Clark, E N; Florman 1995). A pesar de su importancia, este evento no había sido examinado de manera adecuada en los espermatozoides de humano. Años después se reportó que al igual que en los espermatozoides de ratón y bovino, en los espermatozoides de humano también ocurre una hiperpolarización de la membrana en espermatozoides capacitados. Siendo la diferencia entre capacitados y no capacitados significativa (López-González et al. 2014).

Se realizó la calibración de la medición del voltaje de membrana (V_m) obtenida en el citómetro de flujo, usando la ecuación de Nernst (**Ecuación 1**) para ajustar el V_m teórico, y haciendo una regresión lineal (**Figura 12**) para calcular el V_m experimental.

$$E_m = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_e}{[K]_i} \quad (1)$$

Donde R es la constante de los gases (8.314472 J/K* mol), T es la temperatura absoluta (en grados Kelvin), z es la cantidad de mol de electrones que participan en la reacción, F es la constante de Faraday (aproximadamente 96500 C/mol), \ln es el logaritmo neperiano, $[K]_e$ es la concentración extracelular de potasio y $[K]_i$ es la concentración intracelular de potasio.

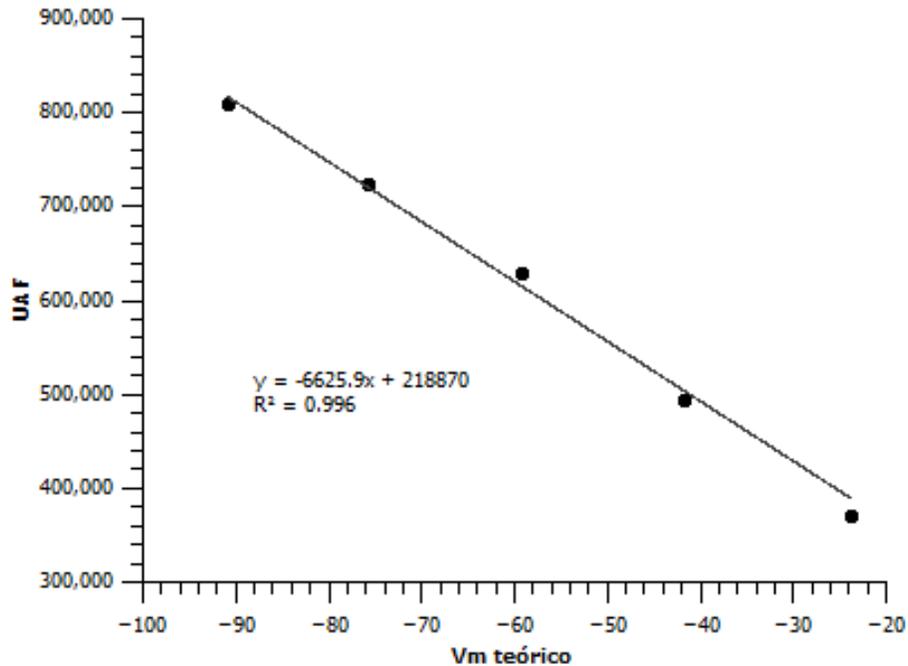


Figura 13. Ajuste lineal. Ejemplo representativo de cómo se llevó a cabo el ajuste lineal. El eje x corresponde al V_m teórico, y el eje y corresponde al promedio de las UAF. Se realizó un ajuste lineal para poder obtener el V_m experimental.

Se adquirió el control (V_m en reposo), y posteriormente se le adicionó valinomicina para inducir una HP, que representa nuestro V_m más negativo, cercano al voltaje de equilibrio del potasio. Enseguida se le hicieron adiciones consecutivas al MRH de KCl con diferente concentración (0.6, 1.5, 3, 6, 12 y 24 mM) para despolarizar la membrana. De esta manera conocemos la concentración extracelular de KCl, y podemos ocupar la ecuación de Nernst para calcular el V_m teórico, que ubicamos en el eje de las ordenadas y las UAF en el eje dependiente (**Figura 13**). Posteriormente se realizó una regresión lineal para obtener el V_m experimental (x) con ayuda de la ecuación de la recta (**Ecuación 2**).

$$y = mx + b \quad (2)$$

Despejando x nos queda:

$$x = \frac{y-b}{m} \quad (3)$$

Donde y es el promedio de las UAF, b es la ordenada al origen y m es la pendiente. Para obtener el V_m de cada condición experimental, el único valor que cambiamos en la **Ecuación 2** es el del promedio de las UAF (y).

Esta calibración se realizó para cada donador, lo que nos permitió obtener el V_m para cada condición experimental, incluyendo el V_m de reposo de cada donador, tanto para espermatozoides capacitados como para no capacitados. En general se observó que los espermatozoides capacitados están más hiperpolarizados que los espermatozoides no capacitados, sin embargo, ésta diferencia no fue significativa (**Figura 14**).

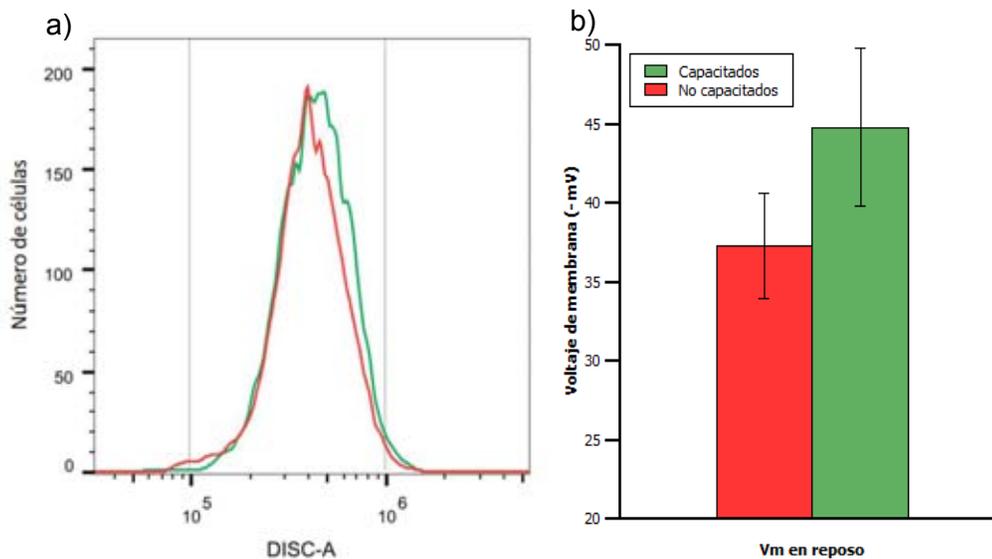


Figura 14. Comparación del V_m de reposo en espermatozoides no capacitados y capacitados. Se adquirieron un total de 10 000 células por cada condición experimental, cargadas con BCECF 100 nM, DiSC₃ (5) 25 nM, y IP 100 nM. De todas las células adquiridas se analizó la población “DiSC++” (véase material y método) y que estaban vivas (negativas para yoduro de propidio). a) Gráfico de distribución de las células representativo de la comparación entre el promedio de la UAF de espermatozoides capacitados (en verde) y no capacitados (en rojo). b) Grafica de barras que muestra el promedio del V_m de reposo de espermatozoides capacitados -44.8 mV (en verde) y no capacitados -37.3 mV (en rojo) \pm error estándar. N=8 diferentes donadores, 104 valores de V_m en reposo. No hubo diferencia significativa.

Nuestros resultados sugieren fuertemente que en general ocurre una hiperpolarización de la membrana durante la capacitación de los espermatozoides de humano, como ya se había reportado previamente (López-González et al. 2014). En promedio los espermatozoides no capacitados tienen un $V_m = -37.3$ mV y los espermatozoides capacitados tienen un $V_m = -44.8$ mV. Sin embargo, ésta diferencia no fue significativa.

Al notar que nuestros datos no coincidieron con lo ya reportado (López-González et al. 2014), es decir, al no ser una diferencia significativa comparando el promedio de todos los donadores, se realizó la comparación en cada donador, comparando los espermatozoides capacitados y no capacitados del mismo donador (**Figura 15**).

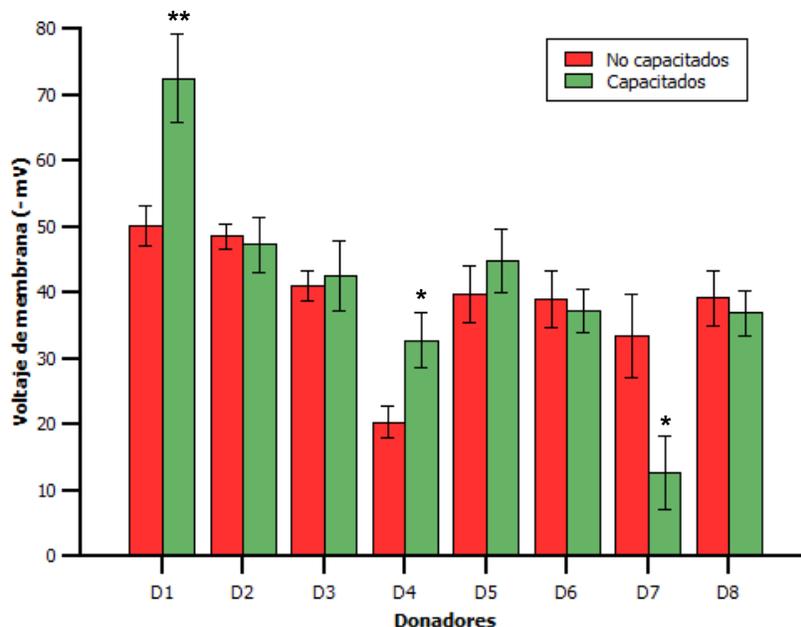


Figura 15. Comparación del V_m de reposo en espermatozoides capacitados y no capacitados en cada donador. Se adquirieron un total de 10 000 células por cada condición experimental, cargadas con BCECF 100 nM, DiSC₃ (5) 25 nM, y IP 100 nM. De todas las células adquiridas se analizó la población “DiSC++” (véase material y método) y que estaban vivas (negativas para yoduro de propidio). Grafica de barras que muestra el promedio del V_m de reposo de espermatozoides capacitados (en verde) y no capacitados (en rojo) de cada donador \pm error estándar. N= 13 valores de promedio de UAF por donador. *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.01$).

Sólo en dos de los ocho donadores (D1 y D4) se observó una hiperpolarización de la membrana significativa en los espermatozoides capacitados. Por otro lado en uno de los ocho donadores (D7) se observó que los espermatozoides capacitados están despolarizados significativamente en comparación con los no capacitados.

Estos resultados explican por qué al comparar el promedio de todos los donadores la diferencia no fue significativa, pues aunque en algunos donadores los espermatozoides capacitados si están más hiperpolarizados significativamente en comparación de los no capacitados, éste comportamiento no es general.

Sin embargo, aunque estos resultados no coinciden con lo reportado (López-González et al. 2014), no podríamos decir cuáles son los correctos, porque en este caso se hizo la calibración de la fluorescencia a valores de voltaje de membrana experimentales y en los reportados no; aunque ellos tienen un mayor número de donadores evaluados.

8.6 Cambios en el V_m ante la adición de controles

Para evaluar el efecto del vehículo sobre el V_m de las células, se adquirieron 10 000 células control (sólo cargadas con los fluoróforos) y después se le adicionó DMSO que fue el vehículo para la valinomicina y la progesterona, y a otro tubo se le adicionó MRH que fue el medio en el que se resuspendió a los espermatozoides. El control positivo para un estímulo hiperpolarizante de la membrana fue la adición de valinomicina, ya que al ser un ionóforo transportador de potasio, favorece su flujo a favor de su gradiente de concentración, es decir, reduce la concentración de K en el citoplasma (Voet & Voet 2010), sacando cargas positivas y volviendo así el voltaje de membrana más negativo, el control positivo para alcalinización fue la adición de cloruro de amonio.

En la **Figura 15** se observan los cambios en el V_m en espermatozoides no capacitados al adicionar controles. Podemos observar que solamente la valinomicina indujo una hiperpolarización en la membrana plasmática de los

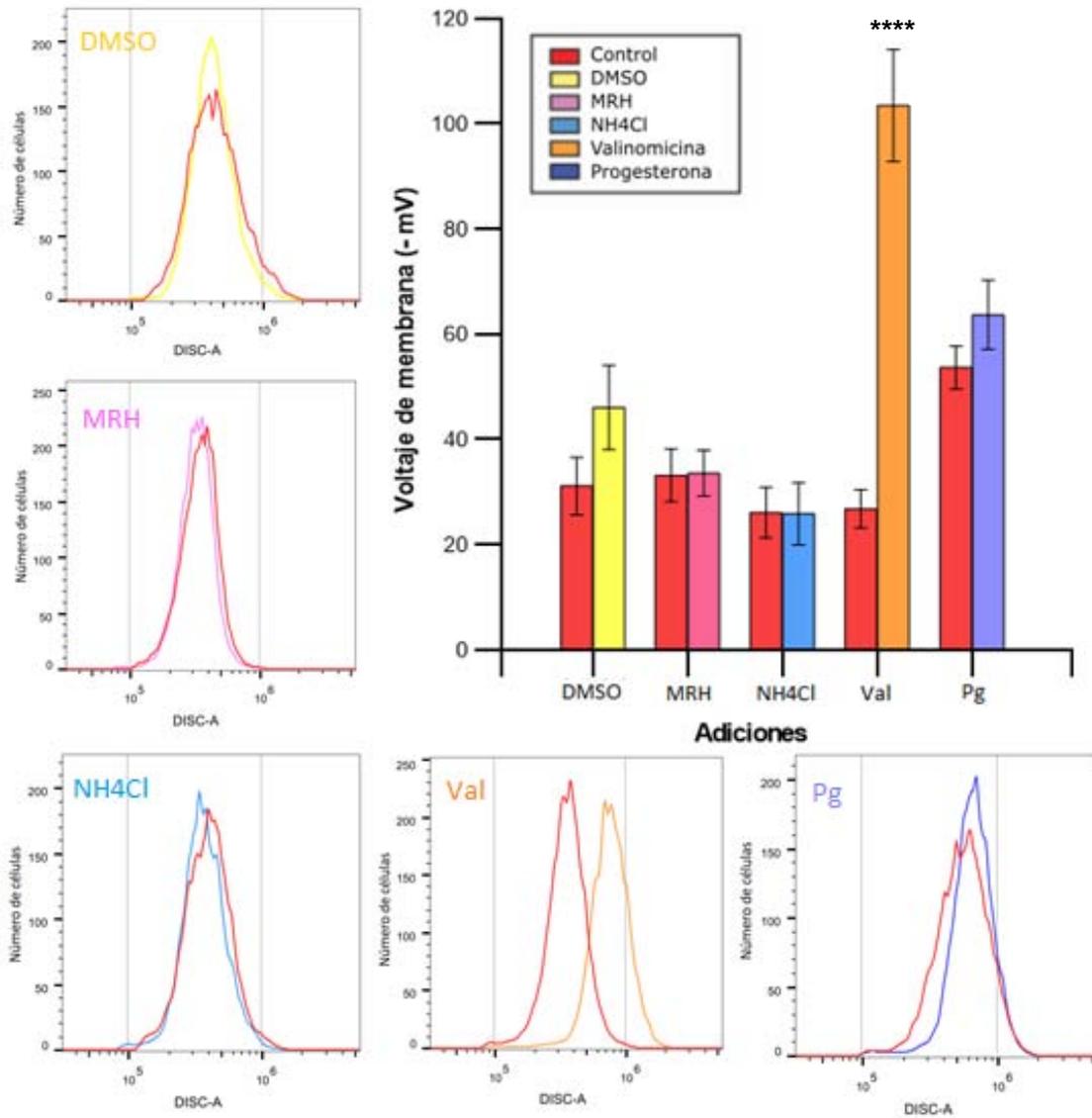


Figura 16. Cambios en el voltaje de membrana (V_m) ante la adición de controles en espermatozoides no capacitados. Se adquirieron un total de 10 000 células por cada condición experimental cargadas con BCECF 100 nM, DiSC₃ (5) 25 nM, y IP 100 nM en ausencia (control en rojo) o presencia (adición) de DMSO (amarillo), MRH (rosa), NH₄Cl 20 mM (azul), valinomicina 2 μ M (naranja) o progesterona 4 μ M (morado). De todas las células adquiridas se analizó la población DiSC⁺⁺ (véase 7.3.1) vivas (negativas para yoduro de propidio). a) Gráficos de distribución de las células representativos de las respuestas ante las adiciones. b) Grafica de barras que muestra el promedio del V_m de cada una de las condiciones experimentales \pm error estándar. N=8 diferentes donadores. ****($P \leq 0.0001$).

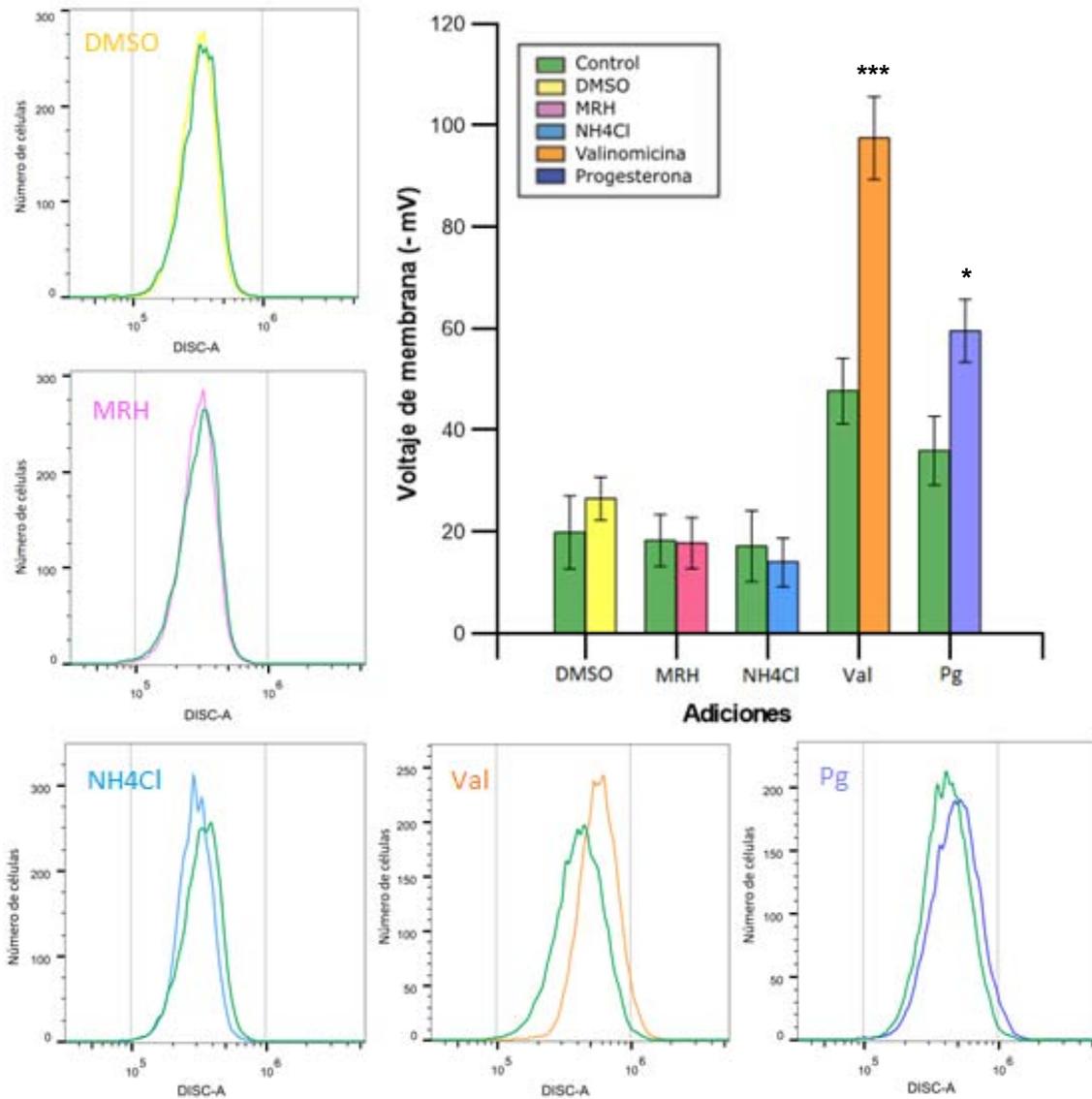


Figura 17. Cambios en el voltaje de membrana (V_m) ante la adición de controles en espermatozoides capacitados. Se adquirieron un total de 10 000 células por cada condición experimental cargadas con BCECF 100 nM, DiSC₃ (5) 25 nM, y IP 100 nM en ausencia (control en verde) o presencia (adición) de DMSO (amarillo), MRH (rosa), NH₄Cl 20 mM (azul), valinomicina 2 μ M (naranja) o progesterona 4 μ M (morado). De todas las células adquiridas se analizó la población DiSC₃++ (véase 7.3.1) y que estaban vivas (negativas para yoduro de propidio). a) Gráficos de distribución de las células representativos de las respuestas ante las adiciones. b) Grafica de barras que muestra el promedio del V_m de cada una de las condiciones experimentales \pm error estándar. N=8 diferentes donadores. *($P \leq 0.05$), ****($P \leq 0.0001$).

espermatozoides (≈ -100 mV), sin embargo, el resto de los compuestos probados no lo hicieron. La progesterona no indujo una hiperpolarización de la membrana significativa, esto se puede deber a que la progesterona aumenta la concentración intracelular de calcio (Lishko et al. 2011), y la entrada de calcio provoca que el interior de la membrana se vuelva menos negativo.

Lo anterior también se realizó en espermatozoides capacitados. Notamos en la **Figura 16** que tanto la hiperpolarización de membrana inducida por valinomicina ($V_m \approx -100$ mV) como por Pg ($V_m \approx -60$ mV) fueron significativas.

Se puede observar en las **Figuras 16 y 17** que los controles correspondientes a progesterona de no capacitados, y a valinomicina y progesterona de capacitados son significativamente diferentes a los controles anteriores. Ésta diferencia fue evidente hasta que se analizaron y graficaron todos los experimentos. La explicación a dicha diferencia reside en que durante el proceso experimental no se realizaron lavados al CMF después de pasar una muestra que contenía valinomicina, por lo que el remanente de valinomicina que queda en la tubería del citómetro fue suficiente para hiperpolarizar las muestras posteriores. Este error experimental nos servirá para mejorar los protocolos siguientes. Es importante mencionar que una vez que se identificó éste problema se volvió a analizar y graficar los resultados sin tomar en cuenta los datos contaminados con valinomicina.

8.7 Variación del V_m durante su calibración

La calibración de los valores de fluorescencia a valores de V_m se realizó como se describió en el apartado **7.11 y 8.5**. En la **Figura 18** se puede observar que al adicionar valinomicina ocurre una hiperpolarización de la membrana y al adicionar diferentes concentraciones de KCl (3, 6, 12 y 24 mM sobre la concentración del potasio extracelular basal) se va despolarizando la membrana poco a poco. Tanto en espermatozoides no capacitados como capacitados el comportamiento del V_m es igual, y es predicho por la ecuación de Nernst. Por ejemplo, ante la última adición se tiene una $[K^+]_e = 49$ mM, $[K^+]_i = 120$ mM y un

voltaje de membrana experimental promedio de ≈ -20 mV. Según la ecuación de Nernst el voltaje de membrana teórico para estas condiciones está dado por la **Ecuación 1**.

Teniendo en cuenta los valores de las constantes universales R y F en la ecuación de Nernst, el factor 2,302 para el cambio de logaritmo neperiano a logaritmo decimal y teniendo una temperatura de 310 °K la ecuación se reduce a:

$$E_m = 61.5 \text{ Log}_{10} \left(\frac{48}{120} \right) = -23.9 \text{ mV} \quad (4)$$

Nuestros valores experimentales durante la calibración del V_m son muy parecidos con los teóricos. Esto es debido a que el voltaje de equilibrio del potasio es muy parecido al voltaje de membrana en reposo. En realidad, si se conoce la concentración intracelular y extracelular del potasio se puede calcular el valor aproximado del voltaje de membrana utilizando la ecuación de Nernst. Sin embargo, el V_m en reposo no es idéntico al voltaje de equilibrio del potasio, debido a que la membrana no es exclusivamente permeable al potasio, sino también a otros iones como el Na^+ y el Cl^- .

Es decir, la membrana celular separa una solución acuosa en dos compartimientos (I y E) (Levy et al. 2006). Un ion X se encuentra más concentrado en uno de los compartimientos, supongamos el caso del potasio que se encuentra más concentrado en el lado I que en lado E. Si no existiese una diferencia de voltaje entre ambos lados, el K tendería a difundir de I a E por su gradiente de concentración, igual que lo haría una molécula no cargada. Sin embargo, si el lado I es eléctricamente negativo con respecto al lado E, el potasio ya no difundiría solamente por su gradiente de concentración, sino que ahora el K también fluye en el sentido contrario (de E hacia I) por la diferencia de voltaje a través de la membrana (**Figura 19**).

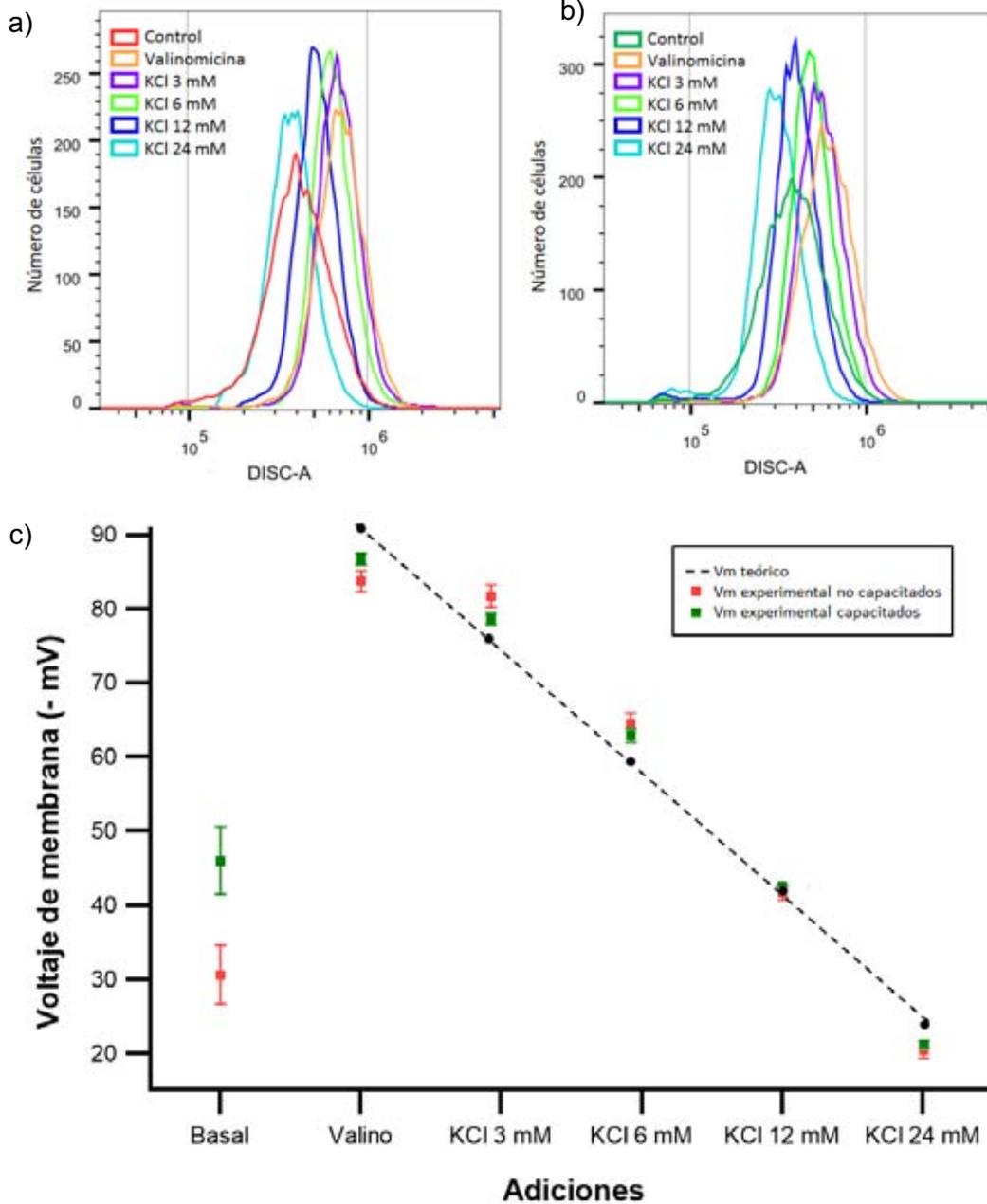


Figura 18. Curva de calibración de la fluorescencia a valores de voltaje de membrana en espermatozoides de humano no capacitados y capacitados. Se adquirieron un total de 10 000 células por cada condición experimental cargadas con BCECF 100 nM, DiSC₃ (5) 25 nM, y IP 100 nM, posteriormente se le adiciono valinomicina seguido de adiciones consecutivas de KCl (3, 6, 12, 24 mM). a) Gráfico de distribución de las células representativo del cambio en las UAF ante las adiciones en espermatozoides no capacitados y b) capacitados. c) Grafica de dispersión que muestra el V_m teórico (línea punteada) y el promedio del V_m experimental de espermatozoides no capacitados (en rojo) y capacitados (en verde) \pm error estándar. N=8 diferentes donadores.

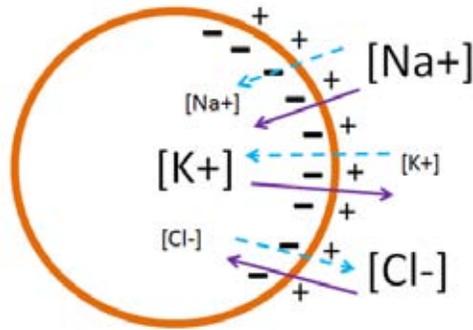


Figura 19. Gradiente electroquímico de los principales iones que influyen en el V_m . Se muestra el gradiente por concentración (línea continua morada) y el gradiente eléctrico (línea discontinua en azul) del potasio, sodio y cloruro.

El valor cuantitativo que permite comparar las contribuciones relativas de las diferencias de concentración iónica y de potencial eléctrico se denomina diferencia de potencial electroquímico ($\Delta\mu$) de un ion, y se define como:

$$\Delta\mu (X) = \mu_I(X) - \mu_E = RT \ln \frac{[X]_I}{[X]_E} + zF(E_I - E_E) \quad (5)$$

Donde $\Delta\mu (X)$ es la diferencia de potencial electroquímico del ion entre los lados I y E de la membrana, R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura absoluta, $\ln \frac{[X]_I}{[X]_E}$ es el logaritmo neperiano de la relación de concentración del ion a ambos lados de la membrana, z es el número de la carga del ion en cuestión, F es la constante de Faraday y $(E_I - E_E)$ es la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana (Levy et al. 2006).

Por lo tanto el sentido del desplazamiento neto de un ion X depende tanto de la diferencia de concentración como de la diferencia de voltaje. Comparando ambas tendencias (de concentración y eléctrica) se puede predecir el movimiento neto del ion X (Levy et al. 2006). De esta manera, si se modifica el voltaje de membrana y la concentración de iones, también se modificara el sentido del desplazamiento neto de los iones en cuestión.

Los cationes tienden a desplazarse espontáneamente del voltaje menos negativo al más negativo (Levy et al. 2006) y los aniones del voltaje más negativo al menos negativo. El término $\Delta\mu$ se define como el potencial electroquímico del ion en el lado I menos el del lado E. Si $\Delta\mu$ es positivo, entonces los cationes se desplazarán de I hacia E y los aniones de E hacia I. Si $\Delta\mu$ es cero, entonces los iones no tendrán una tendencia neta a moverse. Si $\Delta\mu$ es negativo, entonces los cationes se desplazarán de E hacia I y los aniones de I hacia E.

En la ecuación 4 $\Delta\mu$ se puede interpretar como la fuerza neta sobre el ion, mientras que el logaritmo es la fuerza provocada por la diferencia de concentración, y $zF(E_I - E_E)$ es la fuerza originada por la diferencia de potencial eléctrico. Cuando las dos fuerzas son iguales y opuestas no hay una fuerza neta sobre el ion y por lo tanto no habrá desplazamiento del mismo, y se dice que el ion está en equilibrio electroquímico a través de la membrana. En equilibrio $\Delta\mu$ es igual a cero. Por lo tanto de la **Ecuación 5** se tiene:

$$\Delta\mu = RT \ln \frac{[X]_I}{[X]_E} + zF(E_I - E_E) = 0 \quad (6)$$

Despejando $zF(E_I - E_E)$ se obtiene la ecuación de Nernst (**Ecuación 1**) (Levy et al. 2006).

Hasta aquí podemos observar que son cosas diferentes el voltaje de equilibrio de los iones ($E_{(X)}$) y el voltaje de membrana en reposo (V_m). En la práctica, el voltaje de membrana en reposo está mayormente influenciado por el gradiente electroquímico de potasio a través de la membrana (Pocock & Richards 2005), sin embargo, la membrana celular no es exclusivamente permeable al potasio, por lo que el voltaje de membrana está determinado también por el gradiente electroquímico de otros iones, principalmente sodio y cloruro. Por lo que si se modifica el voltaje de equilibrio de alguno de estos iones (sodio, potasio y cloruro), también se modificará el voltaje de membrana.

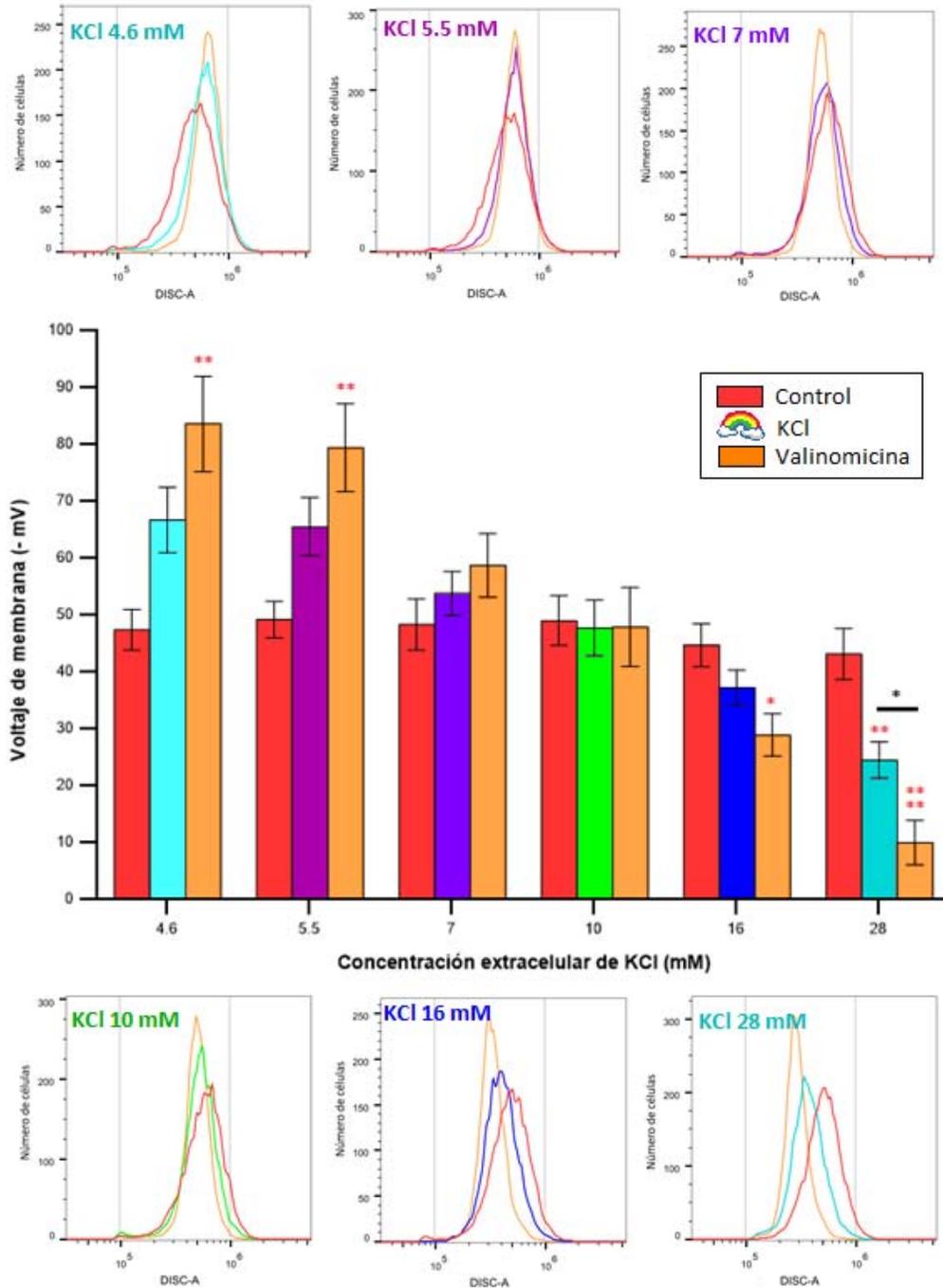


Figura 20. Inhibición de la hiperpolarización de la membrana inducida por valinomicina modificando el K⁺ extracelular en espermatozoides no capacitados. Se adquirieron un total de 10 000 células por cada condición experimental cargadas con BCECF 100 nM, DiSC₃ (5) 25 nM, y IP 100 nM para cada condición experimental, posteriormente se le adiciono KCl (0.6, 1.5, 3, 6, 12, 24 mM), siendo cada concentración una condición experimental diferente, después de agregar KCl se le adiciono valinomicina. Se muestran los gráficos de distribución de las células representativos del cambio en las UAF ante las adiciones y una gráfica de barras que muestra el promedio del V_m experimental ante las adiciones ± error estándar. N=8 diferentes donadores.

Para evaluar la contribución del canal de protones H_v1 a la alcalinización citosólica se indujeron despolarizaciones de la membrana, esto mediante la adición de KCl. Hay reportes en los que se logra una despolarización de la membrana con una adición de KCl 30 mM (Linares-Hernández et al. 1998; Fraire-Zamora & González-Martínez 2004). Nosotros hicimos el experimento iniciando con una concentración de 0.6 mM de KCl. En las **Figuras 20 y 22** se observa que las primeras adiciones de KCl (0.6, 1.5 y 3 mM) provocan una hiperpolarización de la membrana, y las concentraciones de 6, 12 y 24 mM inducen una despolarización de la membrana.

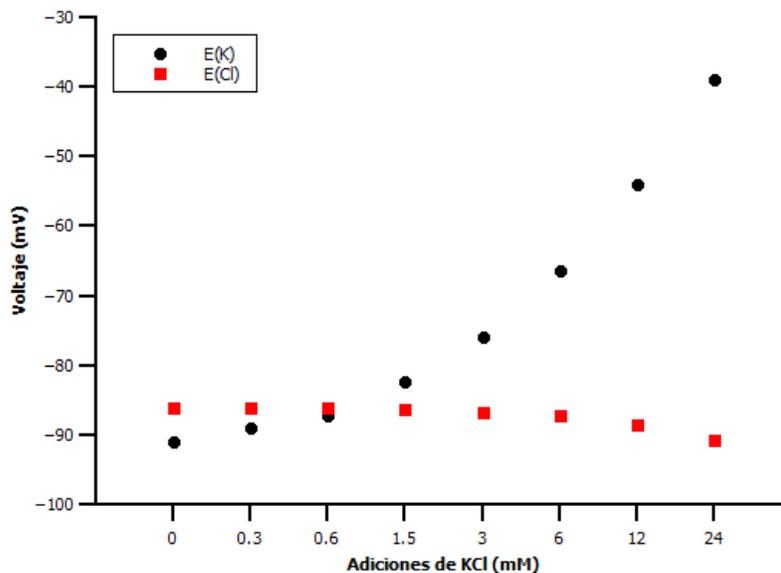


Figura 21. Modificación del voltaje de equilibrio del K y del Cl al modificar la concentración extracelular de KCl. Cuando la fuerza eléctrica y química son iguales y opuestas no hay una fuerza neta sobre el ion y por lo tanto no habrá desplazamiento del mismo, y se dice que el ion está en equilibrio electroquímico a través de la membrana. Este es calculado con la ecuación de Nernst. $[K^+]_e=4$, $[K^+]_i=120$ y $[Cl^-]_e=125$, $[Cl^-]_i=5$.

Una posible explicación a las hiperpolarizaciones observadas al agregar KCl (0.6, 1.5 y 3 mM) es que al modificar la concentración extracelular de K y Cl también cambian el E_K y el E_{Cl} (**Figura 21**), y por lo tanto el de la membrana. Es decir, aunque el E_K se haga menos negativo, el E_{Cl} se vuelve más negativo y es

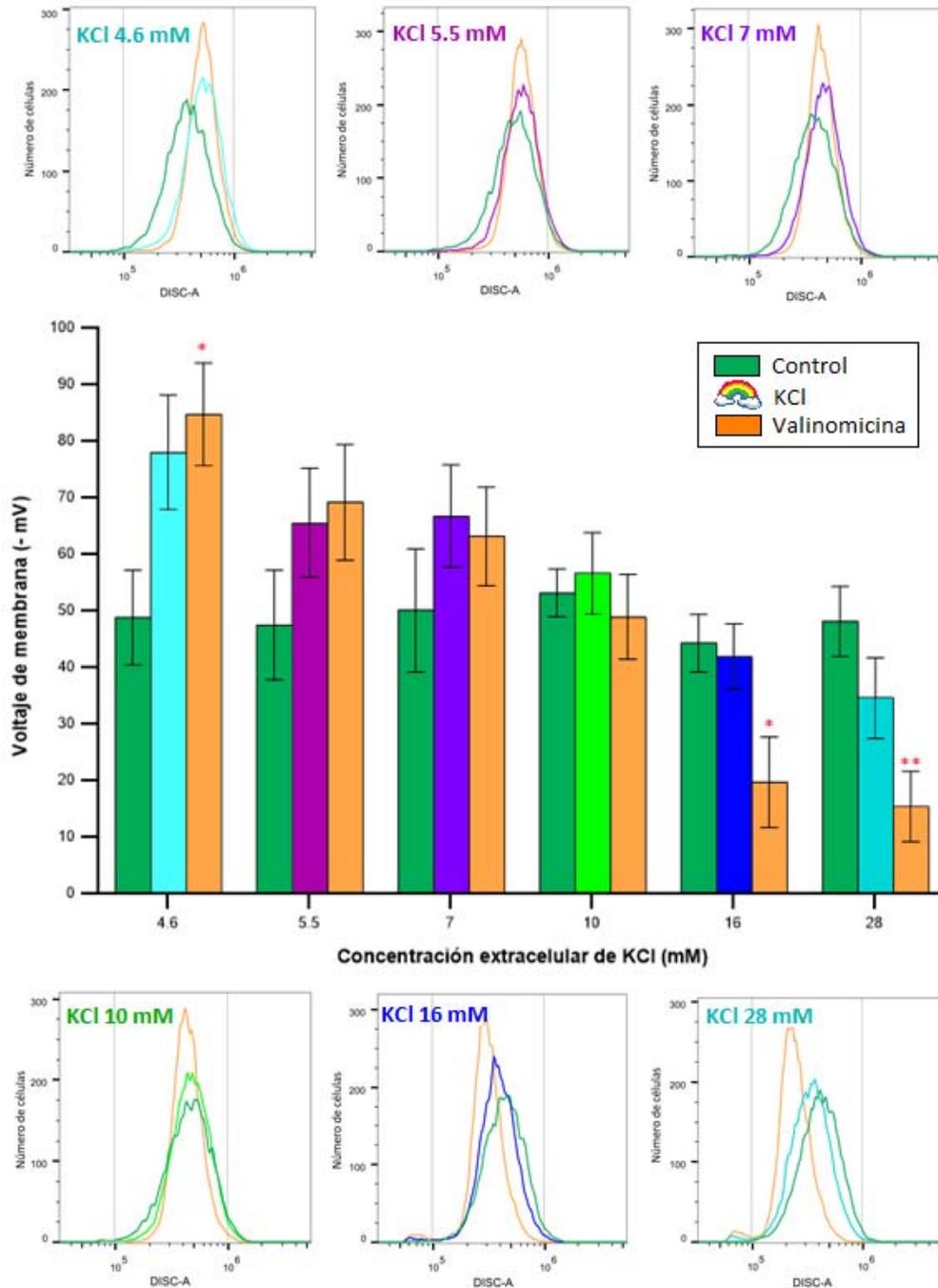


Figura 22. Inhibición de la hiperpolarización de la membrana inducida por valinomicina modificando el K^+ extracelular en espermatozoides capacitados. Se adquirieron un total de 10 000 células por cada condición experimental cargadas con BCECF 100 nM, DiSC₃ (5) 25 nM, y IP 100 nM para cada condición experimental, posteriormente se le adiciono KCl (0.6, 1.5, 3, 6, 12, 24 mM), siendo cada concentración una condición experimental diferente, después de agregar KCl se le adiciono valinomicina. Se muestran los gráficos de distribución de las células representativos del cambio en las UAF ante las adiciones y una gráfica de barras que muestra el promedio del V_m experimental ante las adiciones \pm error estándar. N=8 diferentes donadores.

por esto que en las primeras adiciones el V_m se hiperpolariza debido a que el E_{Cl} se vuelve más negativo.

Por otro lado se puede observar en la **Figura 21** que el E_K y el E_{Cl} se comienzan a separar a partir de la adición de KCl 3-6 mM, es en éste punto en el que ya no se observa una hiperpolarización de la membrana y comienza a despolarizarse debido a que el E_K se hace cada vez menos negativo y el E_{Cl} ya no disminuye demasiado, por lo que el V_m ahora se determina mayormente por el E_K y el E_{Na} .

Al adicionar valinomicina lo que se hace es favorecer el flujo electroquímico del potasio, es por esto que la hiperpolarización de la membrana se hace más evidente al adicionar valinomicina pues acelera y aumenta la despolarización inicial provocada por la adición de KCl 24 mM.

8.8 Controles experimentales para la variación en el pH_i .

La progesterona (Pg) es una hormona esteroide liberada por las células del cúmulo que rodean el óvulo. Es un potente estimulador de los espermatozoides humanos. Atrae a los espermatozoides hacia el óvulo y les ayuda a penetrarlo (Publicover et al. 2007). La progesterona provoca múltiples respuestas fisiológicas dependientes de Ca^{2+} esenciales para la fecundación (Eisenbach & Giojalas 2006). Ya se ha demostrado que la Pg aumenta rápidamente la concentración libre de calcio intracelular y posteriormente inicia la RA en el espermatozoide humano capacitado (Garcia & Meizel 1996).

Para evaluar el efecto de los vehículos sobre el pH_i de las células, se adquirieron 10 000 células control (sólo cargadas con los fluoróforos) y después se le adicionó DMSO que fue el vehículo para la valinomicina y la progesterona. A otro tubo se le adicionó MRH que fue el medio en el que se diluyeron los espermatozoides. El control positivo para alcalinización citosólica fue la adición de NH_4Cl (Arnoult et al. 1996) y progesterona como control fisiológico (**Figura 22**).

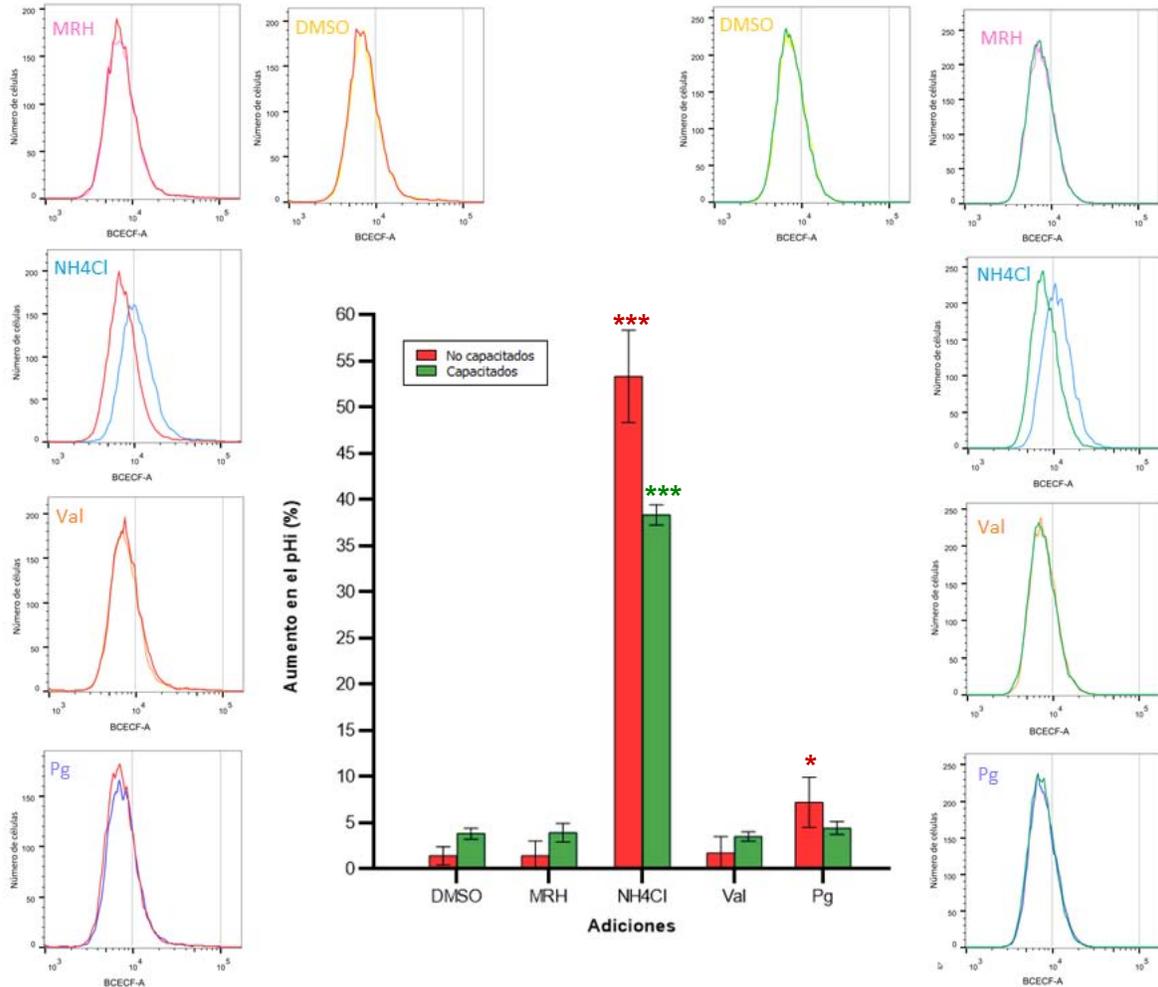


Figura 23. Cambios en el pH intracelular (pHi) ante la adición de vehículos y controles positivos en espermatozoides de humano no capacitados y capacitados. Se adquirieron un total de 10 000 células por cada condición experimental cargadas con BCECF 100 nM, DiSC₃ (5) 25 nM, y IP 100 nM en ausencia o presencia (adición) de DMSO (amarillo), MRH (rosa), NH₄Cl 20 mM (azul), valinomicina 2 μM (naranja) o progesterona 4 μM (morado). De todas las células adquiridas se analizó la muestra que incorporó el BCECF y estaban vivas (negativas para yoduro de propidio). Se muestran gráficos representativos de la distribución de las células de las respuestas ante las adiciones en espermatozoides no capacitados (de lado izquierdo) y capacitados (de lado derecho) y grafica de barras que muestra el promedio del porcentaje de cambio de la intensidad de fluorescencia normalizado con respecto al control de cada una de las condiciones de espermatozoides no capacitados (en rojo) y capacitados (en verde) ± error estándar. N=8 diferentes donadores. *(P≤0.05), **(P≤0.01),***(P≤0.0001).

En la **Figura 22** se observan los cambios en el pHi en espermatozoides de humano capacitados y no capacitados al adicionar vehículos y controles. Se

puede observar que la alcalinización por NH_4Cl fue en promedio de $\approx 55\%$ en espermatozoides no capacitados. La progesterona también aparentemente induce una alcalinización significativa $\approx 10\%$, que pudiera ser resultado de alguna de las múltiples respuestas fisiológicas que induce en el espermatozoide como la RA.

El protocolo anterior también se realizó en espermatozoides capacitados. Notamos que tanto la alcalinización inducida por NH_4Cl ($\approx 38\%$) como por Pg ($\approx 5\%$) fueron de menor magnitud que la producida en espermatozoides no capacitados. Esto se puede atribuir a que durante la capacitación hay un aumento en el pH intracelular (Nixon & Aitken 2009; Fraser 2010). Por lo tanto, los espermatozoides capacitados tienen un pH_i más alcalino que los no capacitados y el máximo de alcalinización posible disminuye en los espermatozoides capacitados.

En la **Figura 23** se observan los cambios en el pH_i de los espermatozoides capacitados al adicionar vehículos y controles. A diferencia de los espermatozoides no capacitados, en los espermatozoides capacitados la progesterona no indujo una alcalinización intracelular, pues los espermatozoides capacitados ya tienen un pH_i más alcalino que los no capacitados.

8.9 Variación del pH_i al cambiar el V_m

La calibración de la medición del V_m se realizó como se mencionó en el apartado **8.5**, al mismo tiempo se evaluó el cambio del pH_i durante ésta calibración. En la **Figura 24** podemos observar que al adicionar valinomicina ocurre una alcalinización citosólica, es decir, la hiperpolarización indujo una alcalinización, lo que nos sugiere la actividad del intercambiador Na^+/H^+ , sin embargo, no fue significativa. Al hacer las adiciones consecutivas de KCl, se observa que va aumentando el pH_i , que aunque la membrana se comienza a despolarizar, aún sigue hiperpolarizada (con respecto al V_m en reposo) (**Figura 24**), pero de igual manera ninguna de éstas fue significativa. Sólo fue significativa

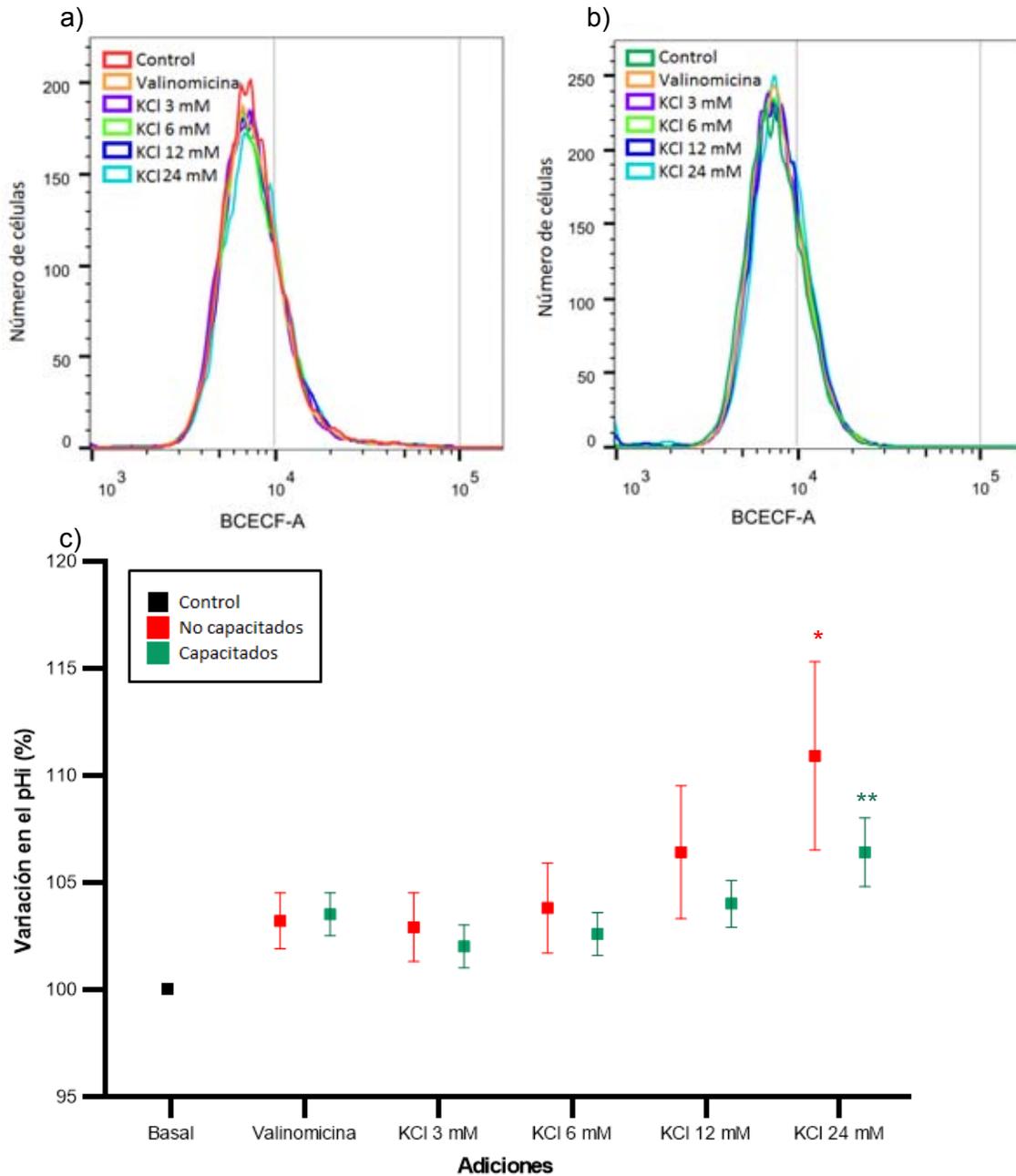


Figura 24. Variación del pH_i al cambiar el voltaje de membrana en espermatozoides de humano no capacitados y capacitados. Se adquirieron un total de 10 000 células por cada condición experimental cargadas con BCECF 100 nM, DiSC₃ (5) 25 nM, y IP 100 nM, posteriormente se le agregó valinomicina seguido de adiciones consecutivas de KCl (3, 6, 12, 24 mM). a) Gráfico de distribución de las células representativo de la variación del pH_i ante las adiciones en espermatozoides no capacitados y b) capacitados. c) Gráfica de dispersión que muestra el promedio del porcentaje de cambio de la intensidad de fluorescencia normalizado con respecto al control en espermatozoides no capacitados (en rojo) y capacitados (en verde) \pm error estándar. N=8 diferentes donadores. *($P \leq 0.05$) respecto al control.

la alcalinización registrada ante la adición de KCl 24 mM (**Figura 24**), que corresponde a una despolarización de la membrana (con respecto al V_m en reposo), lo que nos sugiere la actividad del canal de protones H_v1 .

Lo anterior coincide con lo reportado previamente (Linares-Hernández et al. 1998; Fraire-Zamora & González-Martínez 2004), en donde después de la adición de valinomicina, la adición de KCl 30 mM induce una alcalinización intracelular ligera y un aumento en la ligera y un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$.

Algo similar ocurrió en los espermatozoides capacitados, al añadir valinomicina se registró una alcalinización citosólica, sin embargo, al igual que en los espermatozoides no capacitados, ésta no fue significativa. Sólo fue significativa con respecto al control la alcalinización intracelular al adicionar KCl 24 mM, que corresponde a una despolarización (**Figura 24**).

A un pH intracelular de 5.5 y un pH extracelular de 7.4, el umbral de activación de H_v1 es de aproximadamente -60 mV (Lishko et al. 2010). Sin embargo, el pH_i de los espermatozoides es más alto que 5.5, por lo que el umbral de activación de H_v1 es menos negativo (Lishko & Kirichok 2010), ésto último se corroboró en el presente estudio, como se puede observar en la **Figura 24** se observa una alcalinización intracelular significativa (adición de 24 mM) correspondiente a un $V_m \sim -25$ mV (**Figura 17**), lo que nos sugiere que ante ese cambio en el V_m H_v1 se activó.

En las **Figuras 23 y 24** se observa que la alcalinización inducida por hiperpolarización (adición de valinomicina) no es significativa estadísticamente, coincidiendo con lo reportado anteriormente (Linares-Hernández et al. 1998; Fraire-Zamora & González-Martínez 2004). Estos resultados sugieren que la participación del intercambiador Na^+/H^+ en la alcalinización citosólica es pequeña, sin embargo, es una vía de regulación del pH_i muy importante, pues es esencial para la función espermática ya que su eliminación causa infertilidad en ratones macho debido a un defecto severo en la movilidad del espermatozoide (Wang et al. 2003).

8.10 Variación del pH_i ante las adiciones de KCl

Hay reportes en los que se informa que 30 mM de KCl induce una alcalinización intracelular ligera (Linares-Hernández et al. 1998; Fraire-Zamora & González-Martínez 2004). Es por esto que para evaluar la contribución del canal de protones H_v1 a la alcalinización citosólica, se indujo la despolarización de la membrana mediante la adición de diferentes concentraciones de KCl (0.6, 1.5, 3, 6, 12 y 24 mM).

La alcalinización intracelular es de gran importancia, pues un aumento en el pH_i es esencial para que se lleve a cabo la fecundación ya que está relacionado con el aumento de la concentración del calcio intracelular, evento obligatorio para la RA.

En general podemos observar que la alcalinización inducida por despolarización es mayor que la alcalinización inducida por hiperpolarización, lo que nos sugiere que la actividad de H_v1 es mayor que la actividad del intercambiador Na^+/H^+ . Es decir, el canal de protones H_v1 es quien contribuye en mayor medida a la alcalinización celular.

Una diferencia notable entre espermatozoides capacitados y no capacitados es que en los espermatozoides no capacitados al agregar valinomicina después de agregar KCl, es decir, al inducir una hiperpolarización después de una despolarización, se observa una disminución del pH_i (**Figura 25**), lo que indica la existencia de un mecanismo de recuperación del pH_i tras la alcalinización intracelular. Mecanismo que al parecer no está presente en los espermatozoides capacitados, pues aún después de agregar valinomicina continúa la alcalinización intracelular (**Figura 26**). Como ya se mencionó, la alcalinización intracelular en los espermatozoides es esencial para que ocurra la RA (Arnoult et al. 1996). Por esta razón es posible que el mecanismo de recuperación del pH_i que se observa en los espermatozoides no capacitados no se observa en los espermatozoides capacitados, pues esto inhibiría la RA.

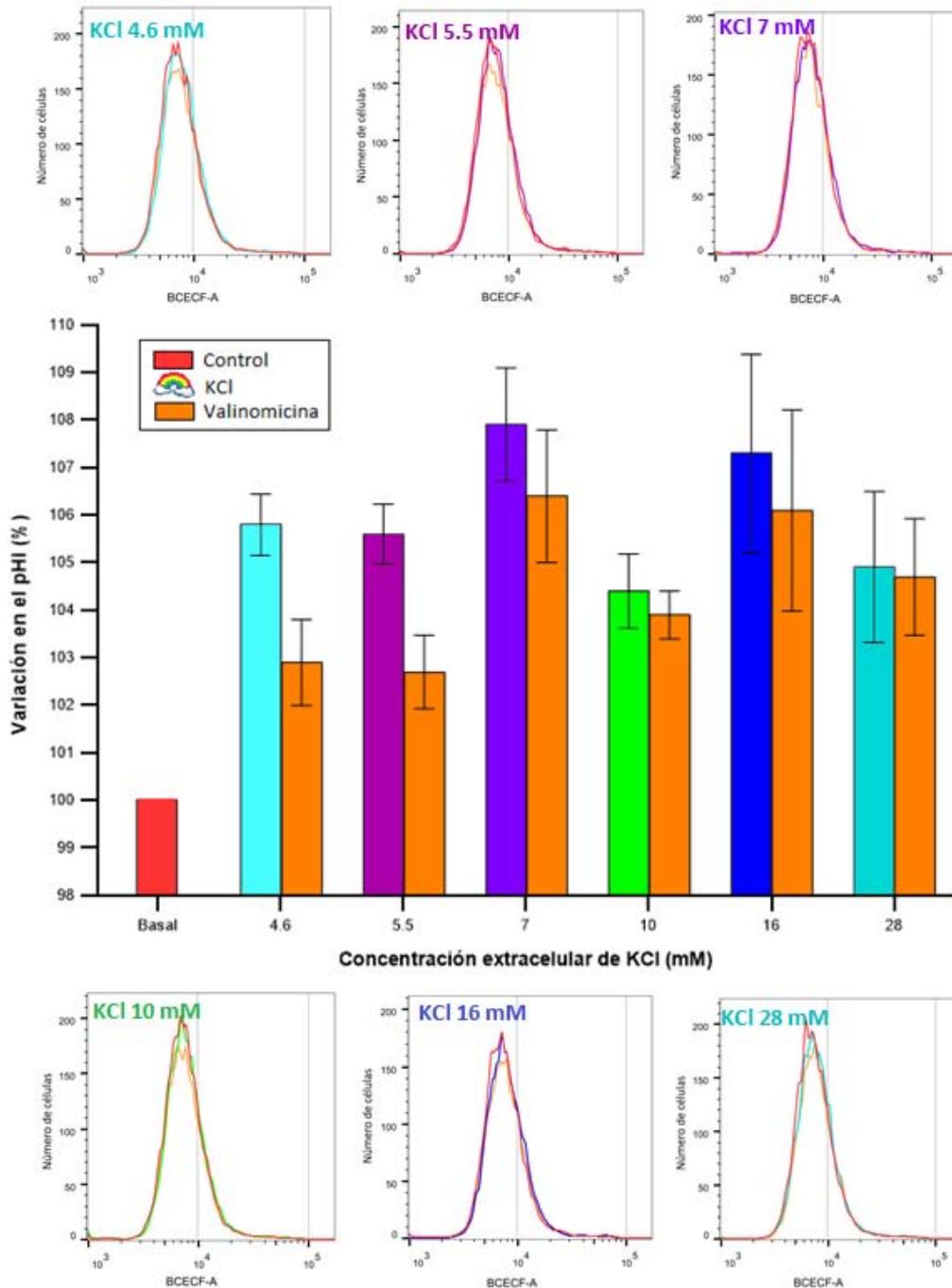


Figura 25. Variación del pH_i al cambiar el voltaje de membrana en espermatozoides no capacitados. Se adquirieron un total de 10 000 células por cada condición experimental cargadas con BCECF 100 nM, DiSC₃ (5) 25 nM, y IP 100 nM para cada condición experimental, posteriormente se le adicionó KCl (0.6, 1.5, 3, 6, 12, 24 mM), siendo cada concentración una condición experimental diferente, después de agregar KCl se le agregó valinomicina. Se muestran los gráficos de distribución de las células representativos del cambio en las UAF ante las adiciones y una gráfica de barras que muestra el promedio del porcentaje de cambio de la intensidad de fluorescencia normalizado con respecto al control ante las adiciones \pm error estándar. N=8 diferentes donadores.

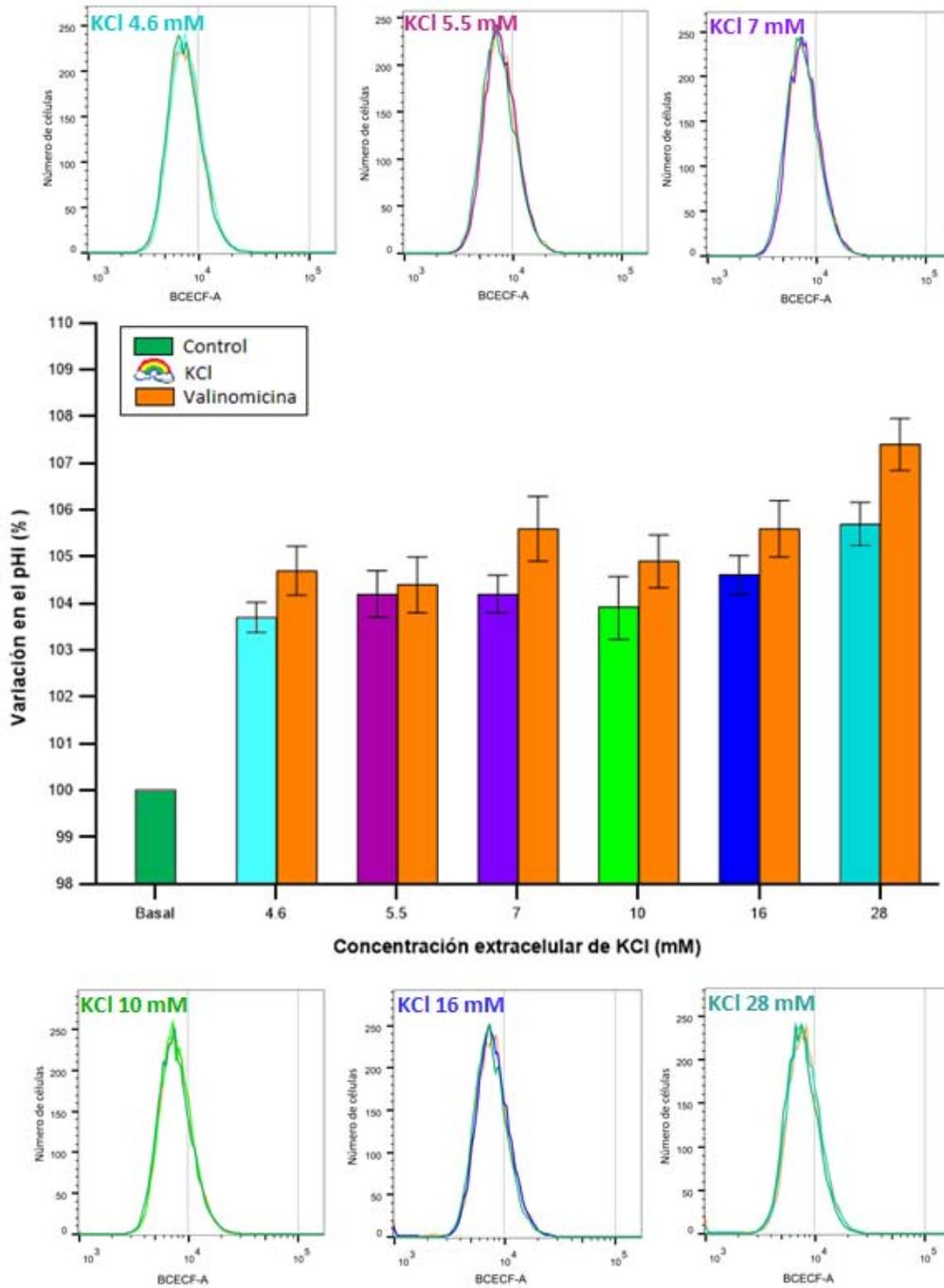


Figura 26. Variación del pH_i al cambiar el voltaje de membrana en espermatozoides capacitados. Se adquirieron un total de 10 000 células por cada condición experimental cargadas con BCECF 100 nM, DiSC₃ (5) 25 nM, y IP 100 nM para cada condición experimental, posteriormente se le adicionó KCl (0.6, 1.5, 3, 6, 12, 24 mM), siendo cada concentración una condición experimental diferente, después de agregar KCl se le agregó valinomicina. Se muestran los gráficos de distribución de las células representativos del cambio en las UAF ante las adiciones y una gráfica de barras que muestra el promedio del porcentaje de cambio de la intensidad de fluorescencia normalizado con respecto al control ante las adiciones ± error estándar. N=8 diferentes donadores.

8.11 Alcalinización inducida por hiperpolarización vs alcalinización inducida por despolarización

Se comparó la alcalinización intracelular inducida por el intercambiador Na^+/H^+ (hiperpolarización) con la inducida por el canal de protones $\text{H}_\text{v}1$ (despolarización) (Figura 26). Tanto en espermatozoides no capacitados como en capacitados se observó que la alcalinización inducida por el canal de protones $\text{H}_\text{v}1$ fue mayor que la inducida por el intercambiador Na^+/H^+ . Sin embargo, ésta diferencia sólo fue significativa en los espermatozoides capacitados.

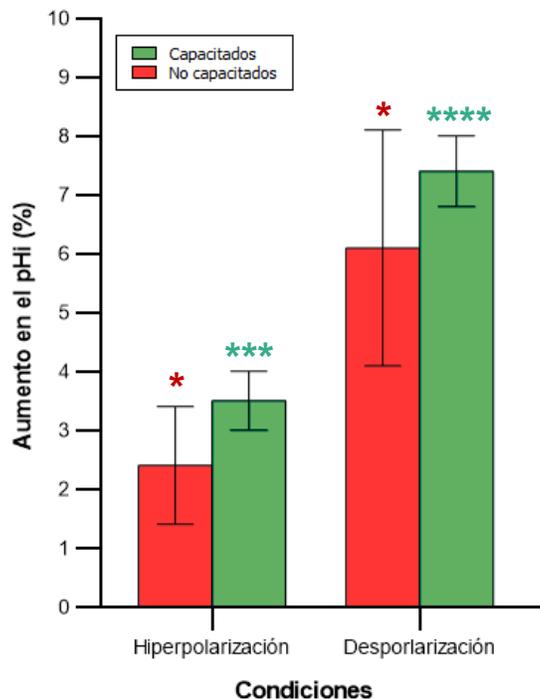


Figura 27. Alcalinización citosólica inducida por hiperpolarización vs alcalinización inducida por despolarización de la membrana en espermatozoides de humano. Comparación del promedio en porcentaje de la alcalinización intracelular inducida por hiperpolarización (a cargo del intercambiador Na^+/H^+) y la inducida por despolarización (a cargo del canal $\text{H}_\text{v}1$) en espermatozoides no capacitados (en rojo) y capacitados (en verde). *($P \leq 0.05$), ***($P \leq 0.001$).

Nuestros resultados coinciden con lo previamente reportado (Lishko & Kirichok 2010). En los espermatozoides de humano, el canal de protones $\text{H}_\text{v}1$ es la principal vía de extrusión de H^+ que controla el pH_i del espermatozoide. Y ésta actividad es mayor en los espermatozoides capacitados (Lishko et al. 2010).

La hipótesis inicial fue que “Los cambios en el potencial de membrana son inversamente proporcionales a los de pH_i en los espermatozoides de humano. Una hiperpolarización de la membrana plasmática de los espermatozoides induce una alcalinización intracelular tanto en los espermatozoides no capacitados como en los capacitados”. Debido a que se partió de la existencia del intercambiador Na^+/H^+ . Lo que sugiere que una despolarización de la membrana provocaría una acidificación intracelular. Sin embargo, durante la exploración bibliográfica y durante el análisis de los resultados se encontró la existencia del canal H_v1 que provoca una alcalinización intracelular inducida por una despolarización de la membrana.

9 CONCLUSIONES Y EXPECTATIVAS

Las observaciones de este trabajo de tesis nos permitieron corroborar algunos resultados reportados previamente, en los que se utilizaron técnicas diferentes a las ocupadas en éste trabajo. Por ésta razón podemos concluir que la citometría de flujo representa una alternativa al estudio de la fisiología espermática que nos brinda algunas ventajas sobre la electrofisiología y la espectrofluorometría, entre ellas, nos permite analizar simultáneamente múltiples propiedades de las células de manera rápida célula por célula y nos ofrece propiedades inigualables de precisión, sensibilidad, rapidez y el análisis multiparamétrico en un número estadísticamente relevante de células. Sin embargo, debido a que la citometría de flujo también tiene desventajas ante la electrofisiología (principalmente que es una manera indirecta de medición), se plantea que un estudio inicial con citometría de flujo nos servirá como panorama de algún fenómeno en especial, que después se puede complementar con otras técnicas.

Dicho lo anterior se tienen las siguientes conclusiones y expectativas:

- La citometría de flujo representa una alternativa viable para el estudio de la fisiología espermática, pues nos permite analizar una cantidad sorprendente de células en un tiempo muy corto, además, con la posibilidad de medir varios parámetros simultáneamente. Esta estrategia descarta a las células muertas y aquellas que se marcan de manera significativamente anormal con el fluoróforo, permitiéndonos así, seleccionar la población de espermatozoides en la que se puede analizar la respuesta al estímulo de interés sin sesgar los datos.
- La citometría de flujo posibilita la calibración de la medición del V_m , permitiendo reportar el voltaje de membrana en mV y no en UAF.
- Existe una hiperpolarización de la membrana plasmática en los espermatozoides de humano durante la capacitación, sin embargo, nuestros resultados indican que no es significativa.

- Una hiperpolarización de la membrana induce una alcalinización intracelular posiblemente debida al intercambiador Na^+/H^+ .
- Una despolarización de la membrana induce una alcalinización intracelular posiblemente causada al canal de protones H_v1 , siendo mayor su actividad en espermatozoides capacitados.
- Nuestros resultados son consistentes con las observaciones previas que sugieren que el canal de protones H_v1 contribuye en mayor medida que el intercambiador Na^+/H^+ a la alcalinización citosólica de los espermatozoides.

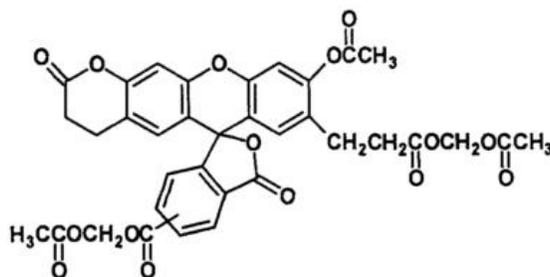
Expectativas

- Aumentar el número de donadores.
- Para un estudio más elaborado es necesaria la calibración de la medición del pH intracelular, para así poder reportar el pH_i en unidades de pH.
- Estudiar más a fondo la función del canal de protones H_v1 y el intercambiador Na^+/H^+ mediante farmacología.

10 ANEXO

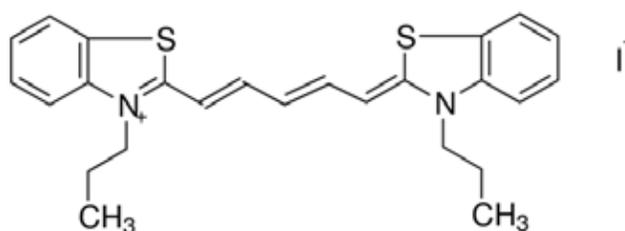
10.1 BCECF, AM

El biscalboxi etilcarboxi fluoresceína, AM (BCECF AM) es un derivado de la carboxifluoresceína. Este colorante es empleado para medir los cambios en el pH citosólico de una variedad de células gracias a que es permeable a la membrana celular debido a que tiene un éster de acetoximetilo (AM). El éster de acetoximetilo del BCECF es una molécula no fluorescente que entra en las células fácilmente. Una vez dentro del citoplasma los grupos AM se escinden por la acción de esterasas no específicas, produciendo la molécula BCECF altamente fluorescente. Es un indicador de pH de doble excitación radiométrica con un pKa de 6.98. Las mediciones de pH intracelular con BCECF se realizan mediante la determinación de la relación dependiente del pH con la intensidad de emisión (detectado a 525-535 nm) cuando el colorante se excita a ≈ 490 nm frente a la intensidad de emisión independiente del pH (por ejemplo, 640 nm) cuando se excita en su punto isobéptico de ≈ 440 nm (Boyer & Hedley 1994).



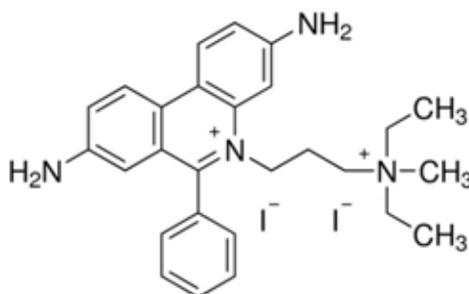
10.2 DiSC₃ (5)

La sonda potenciométrica, DiSC3 (5) es una carbocianina con una cola corta de alquilo (C3). Este colorante catiónico se acumula en las membranas hiperpolarizadas y se se particiona en la bicapa lipídica dependiendo de las cargas negativas a cada lado intracelular y extracelular (ThermoFisher n.d.). Se utiliza como una sonda fluorogénica para detectar y medir los cambios en el potencial eléctrico transmembrana o configuraciones inducidas por agentes que alteran la permeabilidad iónica de la membrana. Tiene una λ_{ex} 620 nm; y una λ_{em} 675 nm (Sigma-Aldrich n.d.).



10.3 IP

El yoduro de propidio (IP) no es permeable a las células vivas, por lo que se utiliza comúnmente para detectar las células muertas en una población. IP es ampliamente utilizado en microscopía de fluorescencia, microscopía confocal de barrido láser, citometría de flujo, y fluorimetría. Este compuesto es un producto destacado para la investigación de la apoptosis. Tiene una λ_{ex} 482 nm; y una λ_{em} 608 nm (pH 7.2) (Sigma-Aldrich n.d.)



11 BIBLIOGRAFÍA

- A. P. Harrison, R. & Gadella, B.M., 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*, 63(2 SPEC. ISS.), pp.342–351.
- Adler, S. & Fraley, D.S., 1977. Potassium and intracellular pH. *Kidney international*, 11(6), pp.433–442.
- Anon, 2014. *BD Accuri C6 Flow Cytometer Instrument Manual*,
- Arnoult, C., Zeng, Y. & Florman, H.M., 1996. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *Journal of Cell Biology*, 134(3), pp.637–645.
- Baldi, E. et al., 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, pp.d189–d205.
- Beaufort, L. et al., 2011. Sensitivity of coccolithophores to carbonate chemistry and ocean acidification. *Nature*, 476(7358), pp.80–83.
- Bezanilla, F., 2005. Voltage-gated ion channels. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 4(1), pp.34–48.
- Bibring, T., Baxandall, J. & Harter, C.C., 1984. Sodium-dependent pH regulation in active sea urchin sperm. *Developmental biology*, 101(2), pp.425–435.
- Boron, W.F., 2004. Regulation of intracellular pH. *Advances in physiology education*, 28(1-4), pp.160–179.
- Boron, W.F., Chen, L. & Parker, M.D., 2009. Modular structure of sodium-coupled bicarbonate transporters. *The Journal of experimental biology*, 212(Pt 11), pp.1697–1706.
- Boyer, M.J. & Hedley, D.W., 1994. Measurement of intracellular pH. *Methods in cell biology*, 41, pp.135–148.
- Carr, D.W., Usselman, M.C. & Acott, T.S., 1985. Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biology of reproduction*, 33(3), pp.588–595.
- Casey, J.R., Grinstein, S. & Orlowski, J., 2010. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(1), pp.50–61.

- Castillo, K. et al., 2015. Voltage-gated proton (H^{v1}) channels, a singular voltage sensing domain. *Febs Letters*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.003>.
- Chang, M.C., 1951. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature*, 168, pp.400–402.
- Charney, E., 2013. Cytoplasmic Inheritance Redux. *Advances in Child Development and Behavior*, 44, pp.225–255.
- El Chemaly, A. et al., 2006. A voltage-activated proton current in human cardiac fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(2), pp.512–516.
- Christen, R., Schackmann, R.W. & Shapiro, B.M., 1983. Metabolism of sea urchin sperm. Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity, and mitochondrial respiration. *Journal of Biological Chemistry*, 258(9), pp.5392–5399.
- Cohen, L., 1969. Influence of pH on vaginal discharges. *British Journal of Venereal Diseases*, 45(3), pp.241–247.
- Cordelli, E. et al., 2005. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: Semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*, 72(4), pp.273–279.
- Cross, N.L. & Razy-Faulkner, P., 1997. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biology of reproduction*, 56(5), pp.1169–1174.
- Cummins, J.M., 2001. Cytoplasmic inheritance and its implications for animal biotechnology. *Theriogenology*, 55(6), pp.1381–1399.
- Darszon, A. et al., 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiological reviews*, 79(2), pp.481–510.
- DeCoursey, T.E., 2008. Voltage-gated proton channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(16), pp.2554–2573.
- Deitmer, B.Y.J.W. & Schlue, W., 1989. Leech glial, , pp.179–194.
- Donowitz, M. et al., 2005. NHERF family and NHE3 regulation. In *The Journal of physiology*. pp. 3–11.
- Eisenbach, M. & Giojalas, L.C., 2006. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(4), pp.276–285.

- Florman, H.M. et al., 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), pp.12–16.
- Florman, H.M. et al., 1992. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Developmental Biology*, 152(2), pp.304–314.
- Florman, H.M. et al., 1989. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Developmental biology*, 135(1), pp.133–146.
- Fraire-Zamora, J.J. & González-Martínez, M.T., 2004. Effect of intracellular pH on depolarization-evoked calcium influx in human sperm. *American journal of physiology. Cell physiology*, 287(6), pp.C1688–C1696.
- Fraser, L.R., 2010. The “switching on” of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Molecular Reproduction and Development*, 77(3), pp.197–208.
- Gadella, B.M. & Van Gestel, R.A., 2004. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. In *Animal Reproduction Science*. pp. 307–319.
- Garcia, M.A. & Meizel, S., 1996. Importance of sodium ion to the progesterone-initiated acrosome reaction in human sperm. *Molecular reproduction and development*, 45(4), pp.513–520.
- Garcia, M.A. & Meizel, S., 1999. Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na⁺/H⁺ exchanger. *Molecular reproduction and development*, 52(2), pp.189–195.
- Gilbert, S.F., 2000. Developmental Biology -- NCBI Bookshelf. *Developmental Biology*.
- Giroux-Widemann, V. et al., 1991. Effects of pH on the reactivation of human spermatozoa demembrated with Triton X-100. *Molecular reproduction and development*, 29(2), pp.157–162.
- Halliday, D., Resnick, R. & Walker, J., 2008. *Principles of Physics*,
- Jones, R.E. & Lopez, K.H., 2006. *Human Reproductive Biology*,
- Kleinhans, F.W. et al., 1992. Measurement of human sperm intracellular water volume by electron spin resonance. *Journal of andrology*, 13(6), pp.498–506.

- Koch, H.P. et al., 2008. Multimeric nature of voltage-gated proton channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26), pp.9111–9116.
- De Lamirande, E. & Gagnon, C., 1993. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(2), pp.157–166.
- Leclerc, P., de Lamirande, E. & Gagnon, C., 1996. Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biology of reproduction*, 55(3), pp.684–92.
- Lee, H.C. & Garbers, D.L., 1986. Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *Journal of Biological Chemistry*, 261(34), pp.16026–16032.
- Levy, M.N., Koeppen, B.M. & Stanton, B.A., 2006. *Berne Y Levy Fisiologia*, Elsevier España.
- Linares-Hernández, L. et al., 1998. Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1372(1), pp.1–12.
- Lishko, P. V, Botchkina, I.L. & Kirichok, Y., 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), pp.387–391.
- Lishko, P. V & Kirichok, Y., 2010. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *The Journal of physiology*, 588(Pt 23), pp.4667–4672.
- Lishko, P. V. et al., 2010. Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. *Cell*, 140(3), pp.327–337.
- Liu, T. et al., 2010. A novel testis-specific Na⁺/H⁺ exchanger is involved in sperm motility and fertility. *Frontiers in bioscience (elite edition)*, 2, pp.566–581.
- Liu, Y., Wang, D.-K. & Chen, L.-M., 2012. The Physiology of Bicarbonate Transporters in Mammalian Reproduction. *Biology of Reproduction*, 86(4), pp.99–99.
- Loiselle, F.B. & Casey, J.R., 2010. Measurement of Intracellular pH. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 637, pp.311–331.

- López-González, I. et al., 2014. Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction*, 20(7), pp.619–629.
- Masuda, A. et al., 1998. Regulation of cytosol-nucleus pH gradients by K⁺/H⁺ exchange mechanism in the nuclear envelope of neonatal rat astrocytes. *Brain Research*, 807(1-2), pp.70–77.
- Murer, H., Hopfer, U. & Kinne, R., 1976. Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *The Biochemical journal*, 154(3), pp.597–604.
- Nishigaki, T. et al., 2014. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(3), pp.1149–1158.
- Nixon, B. & Aitken, R.J., 2009. The biological significance of detergent-resistant membranes in spermatozoa. *Journal of Reproductive Immunology*, 83(1-2), pp.8–13.
- Ohshima, H. & Kondo, T., 1988. Membrane potential and Donnan potential. *Biophysical chemistry*, 29(3), pp.277–281.
- Oliphant, G., Reynolds, a B. & Thomas, T.S., 1985. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *The American journal of anatomy*, 174(3), pp.269–283.
- Olmsted, S.S. et al., 2000. The rate at which human sperm are immobilized and killed by mild acidity. *Fertility and Sterility*, 73(4), pp.687–693.
- Orlowski, J. & Grinstein, S., 2011. Na⁺/H⁺ exchangers. *Comprehensive Physiology*, 1(4), pp.2083–2100.
- Perez-Sala, D., Collado-Escobar, D. & Mollinedo, F., 1995. Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 270(11), pp.6235–6242.
- Pocock, G. & Richards, C.D., 2005. *Fisiología humana: la base de la medicina*, Elsevier España.
- Publicover, S., Harper, C. V & Barratt, C., 2007. [Ca²⁺]_i signalling in sperm-- making the most of what you've got. *Nature cell biology*, 9(3), pp.235–242.
- Ramsey, I.S. et al., 2006. A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature*, 440(7088), pp.1213–1216.

- Ruffin, V.A. et al., 2014. Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. *Frontiers in Physiology*, 5 FEB.
- Sánchez, J.C. et al., 2006. Electrophysiological demonstration of voltage- activated H⁺ channels in bovine articular chondrocytes. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 18(1-3), pp.85–90.
- Sasaki, M., Takagi, M. & Okamura, Y., 2006. A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5773), pp.589–592.
- Schackmann, R.W., Christen, R. & Shapiro, B.M., 1984. Measurement of plasma membrane and mitochondrial potentials in sea urchin sperm. Changes upon activation and induction of the acrosome reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 259(22), pp.13914–13922.
- Shapiro, H.M., 2004. Estimation of membrane potential by flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, Chapter 9, p.Unit 9.6.
- Sigma-Aldrich, 3,3'-Dipropylthiadicarbocyanine iodide suitable for fluorescence, ≥98.0% (TLC) | Sigma-Aldrich.
- Skinner, M.K. & Guerrero-Bosagna, C., 2009. Environmental signals and transgenerational epigenetics. *Epigenomics*, 1(1), pp.111–117. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2886501&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Smith, S.M.E. et al., 2011. Voltage-gated proton channel in a dino fl agellate.
- Suarez, S.S., 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*, 14(6), pp.647–657.
- Taylor, A.R. et al., 2011. A voltage-gated H⁺ channel underlying pH homeostasis in calcifying Coccolithophores. *PLoS Biology*, 9(6), pp.1–14.
- Tevi-Bénissan, C. et al., 1997. In vivo semen-associated pH neutralization of cervicovaginal secretions. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 4(3), pp.367–374.
- ThermoFisher, DiSC3(5) (3,3'-Dipropylthiadicarbocyanine Iodide) - Thermo Fisher Scientific.
- Visconti, P.E. et al., 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian journal of andrology*, 13(3), pp.395–405.

- Vishwakarma, P., 1962. The pH and bicarbonate-ion content of the oviduct and uterine fluids. *Fertility and Sterility*.
- Voet, D. & Voet, J.G., 2010. *Biochemistry 4e*,
- Vredenburg-Wilberg, W.L. & Parrish, J.J., 1995. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Molecular Reproduction and Development*, 40(4), pp.490–502.
- Wang, D. et al., 2003. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature cell biology*, 5(12), pp.1117–1122.
- Williams, R.B., Bernard, R. & Callcut, D., 2011. *Flow Cytometry Protocols* 3rd ed. Hawley T S; Hawley RG., ed., Washington, DC.
- 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), pp.348–356.
- Yanagimachi, R., 1998. Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13 Suppl 1, pp.87–98.
- 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), pp.510–520.
- Zeng, Y; Clark, E N; Florman, H.M., 1995. Sperm Membrane Potential: Hyperpolarization during Capacitation Regulates Zona Pellucida-Dependent Acrosomal Secretion. *Developmental Biology*, 171, pp.554–563.