



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Las anhidrasas carbónicas y su papel en la fisiología de los
espermatozoides de mamífero**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Omar José Ramírez

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Claudia Treviño Santa Cruz

Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Mayel Chirinos Espín

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán

Dra. Liliana Pardo López

Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos

Junio, 2016



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio dieciséis del Departamento de Biología del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México), bajo la supervisión de la Dra. Claudia L. Treviño Santa Cruz, y con la colaboración de los Dres. Joachim W. Deitmer de la Universidad de Kaiserslautern (Kaiserslautern, Alemania) y Claudiu T. Supuran de la Universidad de Florencia (Florencia, Italia).

Se recibió financiamiento de la fundación Alexander von Humboldt (Research Linkage Programme para CT), CONACyT-México 128566 para AD, CB y CT y DGAPA/UNAM (IN202212-3 para CT).

Omar José Ramírez fue estudiante del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas UNAM, contó con una beca doctoral CONACyT durante el periodo 2011-2014 y recibió apoyo financiero del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir a congresos nacionales e internacionales.

A Efraín, Romelia y Jérica; gracias por coincidir conmigo en esta vida.

No te rindas

Mario Benedetti

No te rindas, aún estás a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,
liberar el lastre, retomar el vuelo.

No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros y destapar el cielo.

No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frío queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se esconda y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque la vida es tuya y tuyo también el deseo,
porque lo has querido y porque te quiero.

Porque existe el vino y el amor, es cierto,
porque no hay heridas que no cure el tiempo,
abrir las puertas, quitar los cerrojos,
abandonar las murallas que te protegieron.

Vivir la vida y aceptar el reto,
recuperar la risa, ensayar un canto,
bajar la guardia y extender las manos,
desplegar las alas e intentar de nuevo,
celebrar la vida y retomar los cielos.

No te rindas por favor no cedas,
aunque el frío queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque cada día es un comienzo,
porque esta es la hora y el mejor momento,
porque no estás solo, porque yo te quiero.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, Efraín y Romelia, por el apoyo incondicional que me han dado durante toda mi vida. Los amo.

A Jéssica, por ser mi cómplice en todo desde hace tres décadas. Te quiero mucho hermanita.

A la Dra. Claudia Treviño, por compartir conmigo este largo viaje y por apoyarme en todo momento. Eres una gran persona, una excelente investigadora y una invaluable amiga. Siempre recordaré con mucho cariño todo lo que aprendí de tí, y prometo darle a las futuras generaciones el fuego de los Dioses de la misma forma en que me lo diste. Gracias por ser mi Prometeo.

A los Dres. Alberto Darszon, Takuya Nishigaki, Ignacio López y Carmen Beltrán. Muchas gracias por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio y por mostrarme desde diferentes ángulos todas las cualidades que un buen científico debe tener para ser exitoso.

A los miembros de mi comité tutorial, las Dras. Mayel Chirinos Espín y Liliana Pardo López por darle seguimiento a mi trabajo de investigación durante todos estos años y por todos los comentarios que me hicieron para enriquecerlo.

A los miembros de mi jurado de examen profesional, las Dras. Leonor Pérez, Denhi Schnabel, Elizabeth Lorraine Jaimes, Claudia Díaz y Esmeralda Rodríguez. Muchas gracias por todas las observaciones que me hicieron para que tanto el escrito como la presentación de este trabajo mejoraran.

Al Dr. Joachim W. Deitmer, por todo el apoyo que me brindó durante mi estancia en su laboratorio.

A Paulina Torres, por tu invaluable amistad y por todo el apoyo que me diste para sacar adelante parte de este trabajo. Te súper amito bebé.

A mis personas favoritas del laboratorio: Francisco, Alberto Vicens, Fabio, Yoloxóchitl, Carmen Santana, Paulina, Ana Laura, Julio e Ignacio. Muchas gracias por su amistad, las charlas amenas y los incontables momentos divertidos que vivimos juntos.

También hay personas que fueron parte del laboratorio y a las cuales recuerdo con un gran cariño. Muchas gracias por todo a: Yuri, Penélope, Florencia, Gerardo de Blas, Lolis, Arlet, Ana Alicia, Claudia Sánchez, Rocío, Alejandra y Dulce. Les deseo lo mejor del mundo en donde están ahora.

De entre las personas que fueron miembros del laboratorio, agradezco especialmente a Esteban Monroy, Tatiana Luna y Oscar Sánchez, por su amistad, por todos los momentos divertidos que tuvimos, por los que seguimos compartiendo y por los que vienen.

A Linda Forero, Somayeh Jamali, Jan Peetz e Iván Ruminot, por su amistad y por la invaluable ayuda que me brindaron durante mi estancia en Kaiserslautern.

A mis hermanos: Natalia, Sandra, Julián, Citlalli, Lizbeth, Laura, Norma, Jazmín, Carmen y Juan Pablo. Son la mejor familia que pude haber encontrado.

A las personas increíbles que tuve la fortuna de conocer en el IBT durante mi doctorado: Josué Océlotl, Violeta Matus, Gustavo Caballero, Gladys Jiménez y Emiliano Cantón. Muchas gracias por su amistad y por todos los momentos divertidos que hemos compartido.

Al Lic. José Antonio Bolaños y a Gloria Villa de la unidad de docencia del IBT. Mi más sincero reconocimiento por la labor tan eficiente que desempeñan para ayudar a los estudiantes del posgrado a realizar trámites académicos.

A la misa y a los fieles devotos que me acompañaron más de una vez en mis plegarias. En estos agradecimientos vuelvo a mencionar a: Francisco, Fabio, Alberto, Edilberto y Tatiana. Gracias por rezar conmigo con tanto ahínco para que se termine la pobreza en el mundo.

A la UNAM, mi *alma mater* desde hace quince años. No tengo palabras para agradecerle la educación de excelencia que me has brindado durante este tiempo. Viviendo en un país con tantas carencias económicas, es un verdadero privilegio llegar hasta donde estoy gracias a ti.

Agradezco el apoyo técnico que me brindaron las siguientes personas durante el desarrollo de este trabajo: la M. en C. Paulina Torres Rodríguez, la Q. F. B. Xochitl Alvarado Affantranger, las M. V. Z. Graciela Cabeza Pérez y Elizabeth Mata Moreno, el Dr. Holger M. Becker, el M. T. L. A. Hans-Peter Schneider, la B. A. Dip. Lib. A. L. A. Shirley Ainsworth, el Ing. Arturo Ocádiz Ramírez, el M. E. M. David Santiago Castañeda Carreón, el M. en T. I. Juan Manuel Hurtado Ramírez y el Ing. Roberto Rodríguez Bahena.

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	i
Resumen	ii
Summary	iii
1. Introducción	1
1.1 El espermatozoide	1
1.2 Los eventos fisiológicos en el espermatozoide previos a la fecundación	2
1.2.1 Los cambios en la movilidad	2
1.2.2 La capacitación	3
1.2.3 La reacción acrosomal	3
1.3 La regulación del pH_i en las células eucariontes	5
1.4 Las anhidrasas carbónicas y su papel en la regulación del pH_i	6
1.5 Los cambios de pH_i en los espermatozoides de mamífero y los factores que los modulan	8
2. Antecedentes	10
3. Hipótesis	13
4. Objetivo general	13
5. Objetivos específicos	13
6. Materiales y Métodos	14
6.1 Separación de espermatozoides móviles de humano y de ratón	14
6.2 SDS-PAGE y <i>western-blot</i>	16
6.3 Inmunocitoquímica	18
6.4 Determinación de la actividad catalítica de las CAs en espermatozoides de ratón	18
6.5 Ensayos de movilidad	19
6.6 Evaluación de la reacción acrosomal	20
6.6.1 Evaluación de la RA con FITC-PSA	20
6.6.2 Evaluación de la RA con Azul de Coomassie	21
6.6.3 Evaluación de la RA con citometría de flujo	22
6.7 Evaluación de los cambios intracelulares de pH	22
6.8 Análisis estadístico	23

7. Resultados	24
8. Discusión	49
9. Conclusiones	56
10. Perspectivas	57
11. Material suplementario	58
12. Bibliografía	76
Apéndice A	82
Apéndice B	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La estructura general del espermatozoide de mamífero	1
Figura 2. Los cambios de la movilidad en el espermatozoide de mamífero	3
Figura 3. Secuencia de eventos durante la reacción acrosomal	5
Figura 4. La reacción catalizada por las anhidrasas carbónicas	6
Figura 5. Localización subcelular de las CAs de la familia α	7
Figura 6. Distribución de los transportadores ácido/base y los canales iónicos sensibles a pH en el espermatozoide de mamífero	9
Figura 7. Obtención de espermatozoides móviles de humano mediante la técnica de <i>swim-up</i>	15
Figura 8. Evaluación de la RA en espermatozoides de humano con FITC-PSA	21
Figura 9. Evaluación de la RA en espermatozoides de ratón con Azul de Coomassie.....	22
Figura 10. Identificación de CAII, CAIV y/o CAXIII en proteínas solubles de espermatozoides de humano y/o ratón	25
Figura 11. Inmunolocalización de CAI, CAII y/o CAXIII en espermatozoides de humano y/o ratón ..	27
Figura 12. Registro de la actividad catalítica de las CAs	28
Figura 13. Los espermatozoides capacitados de ratón presentan actividad catalítica de las CAs	29
Figura 14. Estructura química de la Etoxizolamida	29
Figura 15. El mecanismo de acción de las CAs	30
Figura 16. El mecanismo de acción de las Sulfonamidas	30
Figura 17. La EZA inhibe de forma dosis dependiente la actividad de las CAs en espermatozoides capacitados de ratón	31
Figura 18. La CAII es responsable de la mitad de la actividad global de las CAs en espermatozoides capacitados de ratón	32
Figura 19. Los compuestos derivados de la sulfonamida inhiben de forma dosis dependiente la actividad de las CAs en espermatozoides capacitados de ratón	36
Figura 20. Determinación de los valores cinemáticos de un espermatozoide	38
Figura 21. La EZA disminuye los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de humano con mayor potencia que en los espermatozoides capacitados de ratón	39
Figura 22. El FC5-207A disminuye a bajas concentraciones los parámetros de movilidad de los espermatozoides capacitados de ratón, mientras que en espermatozoides capacitados de humano disminuye e incrementa los parámetros de movilidad	40
Figura 23. El FC12-506A disminuye e incrementa a distintas concentraciones los parámetros de movilidad de los espermatozoides capacitados de humano y de ratón	41

Figura 24. La EZA potencia la RA inducida por Pg en espermatozoides capacitados de humano	45
Figura 25. La EZA no tiene efecto en la RA inducida por ZP en espermatozoides capacitados de ratón	46
Figura 26. Modelo de la regulación del pH_i en espermatozoides de mamífero durante la capacitación/hiperactivación	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. La distribución de las CAs en los grupos de seres vivos	6
Tabla 2. Identificación de las CAs en espermatozoides de humano y ratón mediante distintos métodos	10
Tabla 3. Medio Whitten's para espermatozoides de ratón	14
Tabla 4. Límites inferiores de referencia de la OMS para las características del semen humano	14
Tabla 5. Solución fisiológica para espermatozoides de humano	16
Tabla 6. Amortiguador salino de fosfatos (PBS)	17
Tabla 7. Amortiguador de solubilización	17
Tabla 8. Amortiguador de carga 5X	17
Tabla 9. Amortiguador salino de Tris con Tween 20 (TBS-T)	18
Tabla 10. Inhibidores específicos para las CAs sintetizados recientemente	33
Tabla 11. Valores de la K_I (nM) para las isoformas de CA α de humano (h) o ratón (m)	34
Tabla 12. Valores de actividad de las CAs (U/mL) en espermatozoides capacitados de ratón en presencia de los inhibidores de CAs recientemente sintetizados	35
Tabla 13. Valores de RA inducida por Pg o Iono en espermatozoides capacitados de humano preincubados con EZA	46
Tabla 14. Valores de RA inducida por ZP o Iono en espermatozoides capacitados de ratón preincubados con EZA	47

ÍNDICE DE MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figura suplementaria 1. Selección de espermatozoides de humano mediante citometría de flujo	64
Figura suplementaria 2. Coinmunoprecipitación y <i>western-blot</i> con el anticuerpo primario anti-CAII	65
Figura suplementaria 3. Determinación de la concentración óptima de yoduro de propidio para medir la viabilidad de los espermatozoides capacitados de humano	66
Figura suplementaria 4. Determinación de la concentración óptima de FITC-PSA para medir la RA en los espermatozoides capacitados de humano	66
Figura suplementaria 5. Experimento representativo de detección de la RA mediante citometría de flujo en espermatozoides capacitados de humano	67
Figura suplementaria 6. Dinámica de la RA inducida por Pg en espermatozoides capacitados de humano	68
Figura suplementaria 7. Dinámica de la RA inducida por Iono en espermatozoides capacitados de humano	70
Figura suplementaria 8. Determinación de la concentración óptima de Hoechst para medir la viabilidad de los espermatozoides capacitados de humano	72
Figura suplementaria 9. Determinación de la concentración y el tiempo óptimos de cargado de SNARF-5F AM para detectar la señal de mayor magnitud en los espermatozoides capacitados de humano	72
Figura suplementaria 10. Determinación de la concentración óptima de NaHCO ₃ para inducir un cambio significativo de pH _i en espermatozoides no capacitados y capacitados de humano	73
Figura suplementaria 11. Determinación de la concentración óptima de NH ₄ Cl para inducir un cambio significativo de pH _i en espermatozoides no capacitados y capacitados de humano	74
Tabla suplementaria 1. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de humano incubados con distintas concentraciones de EZA	58
Tabla suplementaria 2. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de ratón incubados con distintas concentraciones de EZA	59
Tabla suplementaria 3. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de humano incubados con distintas concentraciones de FC5-207A	60
Tabla suplementaria 4. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de ratón incubados con distintas concentraciones de FC5-207A	61
Tabla suplementaria 5. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de humano incubados con distintas concentraciones de FC12-506A	62
Tabla suplementaria 6. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de ratón incubados con distintas concentraciones de FC12-506A	63
Tabla suplementaria 7. Valores de RA inducida por Pg en espermatozoides capacitados de humano preincubados con EZA	69

Tabla suplementaria 8. Valores de RA inducida por Iono en espermatozoides capacitados de humano preincubados con EZA	71
Tabla suplementaria 9. Cambios de pH_i ocasionados por $NaHCO_3$ o NH_4Cl en espermatozoides no capacitados y capacitados de humano	75

Abreviaturas

ACs: Adenilato ciclasa soluble

AE: Intercambiador aniónico

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

CA: Anhidrasa carbónica

Ca²⁺: Calcio

Cd²⁺: Cadmio

Cl: Cloro

CO₂: Dióxido de carbono

Cu²⁺: Cobre

DMSO: Sulfóxido de dimetilo

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

EZA: Etoxizolamida

Fe²⁺: Hierro

FITC-PSA: Isotiocianato de fluoresceína acoplado a aglutinina de *Pisum sativum*

H⁺: Protón

HCO₃⁻: Bicarbonato

MCT: Transportador de monocarboxilato

Na⁺: Sodio

NBC: Cotransportador sodio/bicarbonato

NH₄Cl: Cloruro de amonio

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PKA: Proteína cinasa A

RA: Reacción acrosomal

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SLC: Transportador acarreador de solutos

Zn²⁺: Zinc

ZP: Zona pelúcida

Resumen

El espermatozoide es una célula altamente especializada cuyo objetivo primordial es transferir al óvulo el material genético que contiene su núcleo, y de esta forma iniciar una serie de procesos que dan lugar a la formación de un nuevo individuo con características genéticas únicas. Entender los mecanismos moleculares que regulan la fisiología del espermatozoide es fundamental no sólo para el campo de la ciencia básica, sino también para el de la ciencia aplicada, ya que de esta forma se pueden mejorar los protocolos de reproducción asistida y se pueden diseñar nuevos anticonceptivos masculinos, sólo por citar dos ejemplos. De entre los elementos moleculares presentes en los espermatozoides de mamífero, en este trabajo investigamos el papel que cumplen las anhidrasas carbónicas (CAs) en la fisiología de dichas células. Las CAs pertenecen al grupo de enzimas más rápidas que existen y catalizan la reacción: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Dicha reacción es fundamental en procesos fisiológicos y patológicos de gran importancia, como la respiración y el cáncer, respectivamente. A pesar de que la actividad de las CAs y su interacción con otros elementos moleculares se ha investigado detalladamente en otros sistemas celulares, hasta ahora se sabe muy poco acerca del papel que las CAs cumplen en los espermatozoides de mamífero. Por estos motivos, el principal objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia de las CAs en los espermatozoides capacitados de humano y de ratón, e investigar el papel que cumplen en la movilidad y la reacción acrosomal de estas células. Mediante ensayos tipo *western-blot*, concluimos que las CAs II y XIII están presentes en los espermatozoides de ambas especies. Por otro lado, la expresión de la CAIV es diferencial; está presente en los espermatozoides de ratón, mientras que está ausente en los de humano. Con inmunocitoquímicas demostramos que la CAXIII se encuentra exclusivamente a lo largo del flagelo de los espermatozoides de humano. Por otro lado, la CAII se encuentra en la cabeza y a lo largo del flagelo en los espermatozoides de ambas especies. Mediante espectrometría de masas demostramos que los espermatozoides capacitados de ratón presentan actividad catalítica de las CAs. Además, la CAII es responsable de la mitad de la actividad catalítica global de las CAs en los espermatozoides capacitados de ratón. Concluimos que la actividad de las CAs cumple un papel fundamental en el mantenimiento de la movilidad en los espermatozoides capacitados de humano, pero no en la movilidad de los espermatozoides capacitados de ratón. Finalmente, demostramos que las CAs participan en la regulación de la reacción acrosomal inducida por progesterona en los espermatozoides capacitados de humano, sin embargo no participan en la regulación de la reacción acrosomal inducida por zona pelúcida en los espermatozoides capacitados de ratón.

Summary

The sperm is a highly specialized cell whose primary goal is to transfer into the egg the genetic material contained inside its nucleus, and thus initiate a series of processes that lead to the formation of a new individual with unique genetic characteristics. Understanding the molecular mechanisms that regulate the physiology of sperm is essential not only for the field of basic science, but also for applied science, because in this way the protocols for assisted reproduction can be improved and new male contraceptives can be designed, for example. Among the molecular elements present in mammalian sperm, in this work we investigate the role of carbonic anhydrases (CAs) in the physiology of these cells. CAs belong to the fastest existing enzymes, are found in the cells of all living organisms and catalyze the reaction: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$. This reaction is fundamental in crucial physiological and pathological processes, such as breathing and cancer, respectively. Although the activity of CAs and their interaction with other molecular elements has been investigated in detail in other cellular systems, so far very little is known about the role that CAs have in mammalian sperm. For these reasons, the main objective of this work was to study the presence of CAs in human and mouse sperm, and to investigate their role in the motility and acrosome reaction of these cells. By western blot, we concluded that CAs II and XIII are present in sperm from both species. Furthermore, the expression of CAIV is differential; it is present in the mouse sperm, whereas it is absent in human cells. With immunocytochemistry assays we demonstrated that CAXIII is exclusively along the flagellum of human sperm. On the other hand, the CAII is in the head as well as throughout the flagellum in sperm from both species. By mass spectrometry we demonstrated that mouse sperm have catalytic activity of CAs. Furthermore, CAII is responsible for half of the overall catalytic activity of CAs in mouse capacitated spermatozoa. We concluded that the activity of CAs plays a fundamental role in maintaining the motility in capacitated human sperm, but not in the motility of capacitated mouse sperm. Finally, we showed that CAs are involved in the regulation of progesterone-induced acrosome reaction in capacitated human sperm, however they are not involved in the regulation of the acrosome reaction induced by zona pellucida in capacitated mouse spermatozoa.

1. Introducción

La fecundación es un evento fundamental en el que se unen el espermatozoide y el óvulo para generar un nuevo individuo con características genéticas únicas. Entender la fisiología del espermatozoide con mayor profundidad es la labor a la que se dedican grupos de investigación como el nuestro, y a pesar de que algunos procesos aún no se conocen por completo, sin duda alguna en las últimas décadas se ha avanzado mucho al respecto. Mejorar nuestro conocimiento sobre la fisiología del espermatozoide y la fecundación es esencial para enfrentar distintos retos, como el incremento de casos de infertilidad masculina en los países industrializados (Skakkebaek *et al.*, 2015), crear anticonceptivos masculinos más seguros, mejorar la reproducción de los animales y preservar la biodiversidad (Darszon *et al.*, 2011). A continuación se describen brevemente las principales características morfológicas del espermatozoide de mamíferos y los eventos fisiológicos que ocurren en él antes de la fecundación.

1.1 El espermatozoide.

Es una célula altamente especializada cuyo objetivo primordial es transferir al óvulo el material genético que contiene su núcleo, y de esta forma iniciar una serie de procesos que dan lugar a la formación de un nuevo individuo. El espermatozoide está constituido por dos secciones principales: 1) la cabeza (2-5 μm de largo en el espermatozoide de humano) que contiene el material genético en el núcleo, dos centriolos en su base y un organelo especializado llamado acrosoma (i. e., una vesícula que contiene proteasas y recubre al núcleo en la parte anterior de la cabeza) y 2) el flagelo, que le confiere movimiento a la célula y mide aproximadamente 45 μm (**Figura 1**).

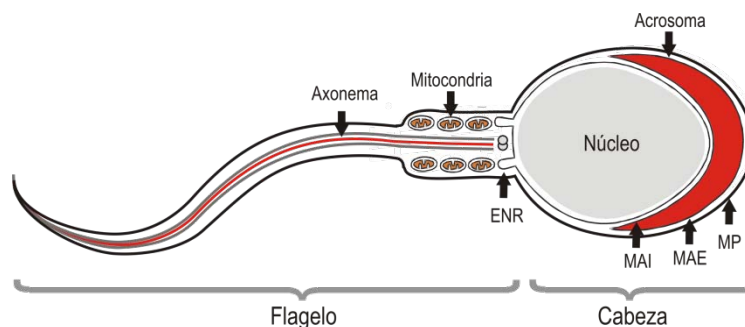


Figura 1. La estructura general del espermatozoide de mamífero. La cabeza y el flagelo del espermatozoide están integrados por varios segmentos. ENR, Envoltura Nuclear Redundante; MAI, Membrana Acrosomal Interna; MAE, Membrana Acrosomal Externa; MP, Membrana Plasmática. Modificado de Darszon *et al.*, 2005.

En la base del flagelo o pieza media se localizan las mitocondrias que contribuyen en el espermatozoide a la generación de energía, la cual es muy importante en estas células para el

mantenimiento de procesos fisiológicos como los que se describen más adelante. Por otro lado, dentro del flagelo se encuentra el axonema, que tiene una estructura conformada por nueve pares de microtúbulos que rodean y están conectados a un par central. Los pares externos de microtúbulos son unidades que contienen espigas radiales, complejos reguladores y dineinas, siendo estas últimas ATPasas las que producen la fuerza motriz necesaria para que el espermatozoide se desplace (Lishko *et al.*, 2012).

1.2 Los eventos fisiológicos en el espermatozoide previos a la fecundación.

Durante su estancia en el tracto genital femenino y antes de la fecundación, se llevan a cabo tres eventos fisiológicos indispensables en los espermatozoides de mamíferos: **a) los cambios en la movilidad**, ocasionados por modificaciones en la simetría y la fuerza del batido flagelar, **b) la capacitación**, que involucra una serie de cambios bioquímicos que vuelven competente al espermatozoide para fecundar al óvulo, y **c) la reacción acrosomal**, o proceso de liberación de las proteasas que contiene el acrosoma. Si alguno de estos tres procesos no sucede en el espermatozoide, la fecundación no se lleva a cabo (Darszon *et al.*, 2011).

1.2.1 Los cambios en la movilidad. Después de depositarse en la vagina, los espermatozoides de varias especies de mamíferos inician su movilidad con un batido flagelar simétrico y de corta amplitud conocido como *movilidad activada* (Suarez and Pacey 2006). En contraste, los espermatozoides aislados de zonas superiores del tracto presentan una *movilidad hiperactivada* (Suarez and Pacey 2006) (**Figura 2**). Este último tipo de movilidad se caracteriza por presentar un batido flagelar asimétrico y de mayor amplitud cuando los espermatozoides se encuentran en un medio de baja viscosidad, sin embargo la adquisición de este tipo de nado más vigoroso le permite a las células llevar a cabo un desplazamiento progresivo a través del moco cervical (i. e., un medio de alta viscosidad), desprenderse del istmo, avanzar hacia el útero y atravesar con mayor facilidad las capas externas del óvulo. La hiperactivación es un evento esencial para que el espermatozoide fecunde al óvulo y aunque aún no se sabe con certeza cuál(es) factor(es) la inicia(n) en condiciones fisiológicas, está plenamente demostrado que el calcio proveniente del medio extracelular y de pozas intracelulares es esencial para regular este proceso (Suarez 2008). Por otro lado la hiperactivación también requiere un incremento del pH intracelular, posiblemente para regular la activación de un canal de Ca^{2+} que depende de alcalinización intracelular, lo que como consecuencia modula el batido flagelar (Suarez 2008).

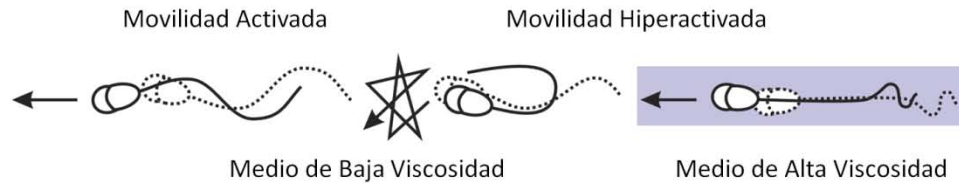


Figura 2. Los cambios de la movilidad en el espermatozoide de mamífero. Se muestra la forma del batido flagelar y la dirección del movimiento (flechas) en espermatozoides activados e hiperactivados colocados en un medio de baja o alta viscosidad. En un medio de baja viscosidad los espermatozoides activados se desplazan con un batido flagelar simétrico, mientras que los hiperactivados no avanzan eficientemente debido a su batido flagelar asimétrico. En un medio de alta viscosidad, la hiperactivación de los espermatozoides ocasiona un desplazamiento progresivo más eficiente que el de los activados. Modificado de Darszon *et al.*, 2011.

1.2.2 La capacitación. La capacitación es un proceso muy complejo que involucra eventos como la remoción de las glicoproteínas adquiridas en el epidídimo y las proteínas adherentes del plasma seminal, además de modificaciones en la distribución del colesterol y otros esteroides en la membrana plasmática del espermatozoide (Lishko *et al.*, 2012). La capacitación también involucra incrementos en la concentración intracelular de iones como calcio (Ca^{2+}), bicarbonato (HCO_3^-), cloro (Cl^-) y sodio (Na^+), además de la activación de una vía de señalización que culmina con la fosforilación de proteínas en tirosinas y en la cual participan segundos mensajeros como el monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (Darszon *et al.*, 2011).

La capacitación usualmente se asocia con el surgimiento de la movilidad hiperactivada y distintas evidencias indican que ambos procesos ocurren de forma paralela y comparten algunos elementos moleculares (Suarez and Ho 2003). En algunas especies como el ratón y el humano, durante la capacitación también ocurre una hiperpolarización del potencial de membrana (Escoffier *et al.*, 2015; López-González *et al.*, 2014). El papel preciso que cumple este cambio en el potencial de membrana aún no está completamente claro, pero se han planteado algunas hipótesis gracias a experimentos que se han hecho principalmente en espermatozoides de ratón. Lo que es un hecho es que dicha hiperpolarización es necesaria al menos para preparar a los espermatozoides de ratón para la reacción acrosomal (De La Vega-Beltrán *et al.*, 2012).

Esta capacitación se puede llevar a cabo *in vitro* incubando a los espermatozoides en un medio que contenga las concentraciones adecuadas de al menos tres elementos: Ca^{2+} , HCO_3^- y albúmina (Visconti *et al.*, 1995).

1.2.3 La reacción acrosomal. Este proceso es una forma de exocitosis celular necesaria para que se lleve a cabo la fecundación en mamíferos y se caracteriza por la formación de múltiples puntos de

fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa en la región anterior de la cabeza del espermatozoide (Zanetti and Mayorga 2009) (**Figura 3**). Durante la reacción acrosomal (RA) se exponen en la superficie de la cabeza del espermatozoide distintas proteínas que son indispensables para que el gameto masculino se fusione con el óvulo y también se liberan las proteasas que contiene el acrosoma, lo que le permite al espermatozoide degradar las capas externas del óvulo. El óvulo se encuentra rodeado por una matriz extracelular llamada zona pelúcida o ZP y durante varios años se pensó que entre las glicoproteínas que conforman a la ZP, ZP3 era el principal inductor de la RA en los espermatozoides de humano y ratón (Gupta and Bhandari 2011), por lo que los esfuerzos se enfocaron en identificar a las moléculas participantes en la vía de señalización que esta proteína desencadena (Bhandari *et al.*, 2010; José *et al.*, 2010). Debido a los problemas éticos que conlleva el extraer suficientes óvulos de humano para purificar a las glicoproteínas de la ZP, desde hace varios años se han explorado otras opciones para estudiar el proceso de la RA, como el uso de ZP de óvulos de ratón (De La Vega-Beltrán *et al.*, 2012), la producción de proteínas recombinantes de la ZP de humano (Caballero-Campo *et al.*, 2006) y el uso de otros inductores fisiológicos de la RA (Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2014).

Entre los otros inductores fisiológicos de la RA en los espermatozoides de humano, se encuentra la progesterona (Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2014; Tamburrino *et al.*, 2014). Esta es una hormona esteroidea que se libera en los ovarios y en las células del *cumulus oophorus* que rodean a la ZP del óvulo (Teves *et al.*, 2006). La progesterona induce un ingreso robusto de Ca^{2+} en los espermatozoides de humano y favorece la hiperactivación, la quimiotaxis y la RA (Blackmore, Beeben and Danforthn 1990; Lishko *et al.*, 2012). El ingreso de Ca^{2+} al espermatozoide inducido por la progesterona está mediado por canales catiónicos específicos del espermatozoide (CatSper) ubicados en la membrana plasmática (Lishko, Botchkina and Kirichok 2011; Strünker *et al.*, 2011).

Evidencias experimentales recientes han cuestionado tanto la identidad del principal inductor fisiológico de la RA, como el lugar en donde sucede este proceso (Baibakov *et al.*, 2007; Buffone, Hirohashi and Gerton 2014; Inoue *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2011). A pesar de esta controversia, es un hecho que la RA es indispensable antes de la fecundación y se sabe que algunas de las características principales de este proceso son, entre otros, los incrementos intracelulares de Ca^{2+} y de pH. El Ca^{2+} es un elemento fundamental en todos los procesos fisiológicos que suceden en el espermatozoide antes y durante la fecundación (Darszon *et al.*, 2011), y a pesar de que aún no se conocen por completo las vías de señalización en las cuales participa, gracias a las investigaciones realizadas durante los últimos años se

ha avanzado mucho al respecto (Darszon *et al.*, 2011). En contraste, se sabe muy poco sobre la regulación del pH durante la RA (Nishigaki *et al.*, 2014).

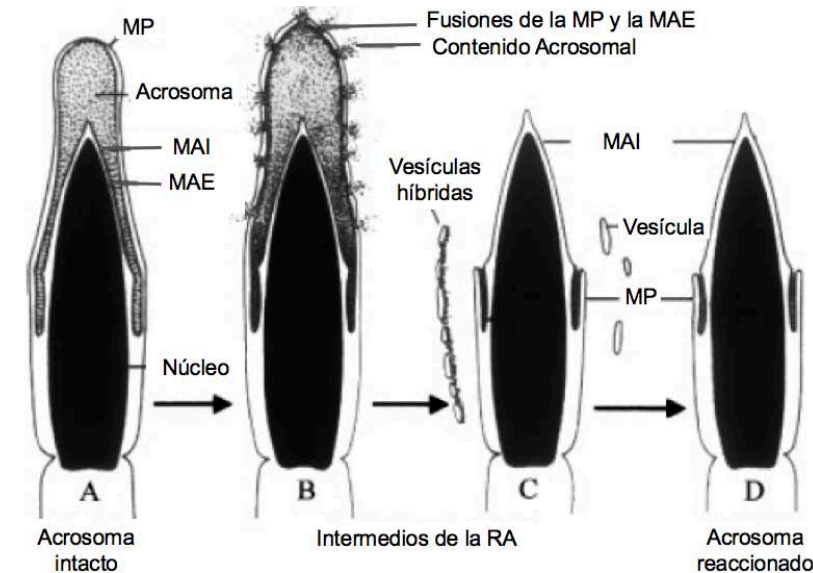


Figura 3. Secuencia de eventos durante la reacción acrosomal. En el diagrama se muestra un espermatozoide de mamífero llevando a cabo el proceso de exocitosis conocido como reacción acrosomal (RA) (A-D). MAE, membrana acrosomal externa; MAI, membrana acrosomal interna; MP, membrana plasmática. Modificado de Wassarman *et al.*, 2004.

1.3 La regulación del pH_i en las células eucariontes.

En las células eucariontes el metabolismo produce una acidificación del medio intracelular y debido a que los procesos bioquímicos que suceden dentro de las células ocurren en un intervalo de pH óptimo, el pH_i debe regularse correctamente (Paroutis, Touret and Grinstein 2004). Uno de los principales amortiguadores fisiológicos en las células es el par dióxido de carbono (CO_2) y bicarbonato (HCO_3^-), y tanto la naturaleza química como las propiedades particulares de este sistema son el motivo de su importancia biológica, pero al mismo tiempo constituyen un reto para su estudio, ya que tanto el CO_2 como el HCO_3^- son sustratos difíciles de rastrear debido a que tienen una alta tasa de movilidad (Casey, Grinstein and Orłowski 2010).

En la regulación del pH_i en células de mamífero también están involucradas dos clases de proteínas transmembranales; los acarreadores de H^+ y los transportadores de HCO_3^- . Ambas familias de proteínas están conformadas por varios miembros: los acarreadores de H^+ incluyen a los intercambiadores Na^+/H^+ de la familia SLC9 (Malo and Fliegel 2006; Orłowski and Grinstein 2004), las bombas de H^+ tipo V, P y F (Cipriano *et al.*, 2008; Kühlbrandt 2004), y los canales de H^+ (Kirichok and Lishko 2011; Lishko *et al.*, 2010). Por otro lado, los transportadores de HCO_3^- incluyen a los transportadores de las familias

SLC4 (Alper 2009; Boron, Chen and Parker 2009), SLC26 (Sindić *et al.*, 2007) y a los canales CFTR (Ishiguro *et al.*, 2009; Steward and Ishiguro 2009). Algunas de estas proteínas se han encontrado en distintas zonas de los espermatozoides de mamífero y se ha demostrado que ayudan a regular los procesos fisiológicos previos a la fecundación (Liu, Wang and Chen 2012).

1.4 Las anhidrasas carbónicas y su papel en la regulación del pH_i.

Además de los acarreadores de H⁺ y los transportadores de HCO₃⁻, las células también dependen de la actividad de las anhidrasas carbónicas (CAs) para regular el pH_i. Las CAs son metaloproteínas presentes en arqueas, procariontes y eucariontes, que catalizan en ambas direcciones la reacción mostrada en la **Figura 4**, aunque también poseen otras actividades catalíticas (Supuran and Scozzafava 2007).

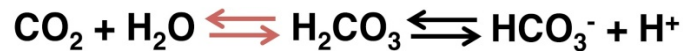


Figura 4. La reacción catalizada por las anhidrasas carbónicas. El dióxido de carbono (CO₂) se une a una molécula de agua (H₂O) por la acción de una anhidrasa carbónica (CA). De esta forma se produce una molécula de ácido carbónico (H₂CO₃), el cual a su vez se disocia en un ion bicarbonato (HCO₃⁻) y un protón (H⁺). Las CAs catalizan esta reacción en ambas direcciones dependiendo de las condiciones celulares.

Las CAs están codificadas por seis familias de genes que surgieron por convergencia evolutiva: α, β, γ, δ, ζ y η (Supuran 2008a). Además, como se muestra en la **Tabla I**, isoformas de las cinco familias se encuentran en los tres dominios y los cinco reinos de los seres vivos. Dependiendo de la isoforma requieren: zinc (Zn²⁺), hierro (Fe²⁺), cobre (Cu²⁺) o cadmio (Cd²⁺) como cofactor para llevar a cabo su actividad catalítica (Supuran and Scozzafava 2007).

	Archaea	Bacteria		Eukarya		
		Bacterias	Protoctistas	Hongos	Plantas	Animales
α		✓	✓		✓	✓
β	✓	✓	✓	✓	✓	
γ	✓	✓				
δ			✓			
ζ			✓			
η			✓			

Tabla 1. La distribución de las CAs en los grupos de seres vivos.

Varios miembros de las familias de CAs se han cristalizado para conocer su estructura tridimensional; las CAs α normalmente se encuentran como monómeros y rara vez forman dímeros (e. g., CAIX y CAXII); las CAs β forman dímeros, tetrámeros u octámeros; las CAs γ forman trímeros, mientras que las CAs δ, ζ y η probablemente existen como monómeros (Supuran 2011). De todas las

CAs, las dieciséis isoformas de la familia α (i. e., CAI-CAXV) son las únicas CAs presentes en mamíferos, y de estas, sólo quince isoformas (i. e., CAI-CAXIV, excepto CAXV) se encuentran en primates. Además, todas tienen una amplia distribución tanto celular (**Figura 5**) como tisular (Truppo *et al.*, 2012).

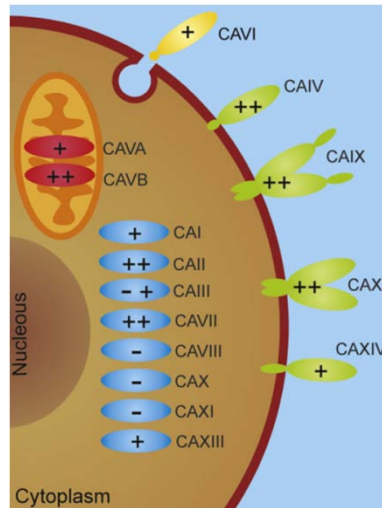


Figura 5. Localización subcelular de las CAs de la familia α . Se indica el nivel de actividad de cada isoforma: actividad alta (++) , media (+) , baja (-) y nula (-). Tomado de Truppo *et al.*, 2012.

Las CAs contribuyen a regular distintos procesos fisiológicos en el cuerpo humano. Por ejemplo, durante la respiración, el oxígeno contenido en los pulmones se difunde hacia el interior de los eritrocitos, se une a la hemoglobina y de esta forma se transporta a todas las células de nuestro cuerpo (Cummins *et al.*, 2014). Por otro lado, el CO_2 producto de la catálisis de azúcares y lípidos en las células, necesita removerse de nuestro cuerpo; en este caso los eritrocitos también funcionan como medio de transporte. El CO_2 difunde hacia afuera de las células y se transporta en la sangre de distintas maneras: menos del 10% se disuelve en el plasma sanguíneo y cerca del 20% se une a la hemoglobina, mientras que la mayor parte (70%) se convierte en H_2CO_3 para ser transportado a los pulmones (Cummins *et al.*, 2014) . Las CAs (principalmente la isoforma CAII) presentes en los eritrocitos, se encargan de convertir el CO_2 en H_2CO_3 y posteriormente en HCO_3^- y H^+ (Frost and Mckenna 2014) (**ver Figura 4**). Cuando los eritrocitos llegan a los pulmones, las CAs llevan a cabo la reacción inversa, convirtiendo el HCO_3^- en CO_2 , el cual exhalamos. A pesar de que estas reacciones se pueden llevar a cabo sin la participación de las CAs, estas enzimas aceleran la tasa de conversión millones de veces (Cummins *et al.*, 2014).

Además de ayudar a regular el pH_i en procesos fisiológicos, las CAs también participan en distintos procesos patológicos como cáncer, obesidad, glaucoma, epilepsia y osteoporosis, y se ha demostrado que

la actividad de distintas isoformas es crucial para mantener la virulencia, el crecimiento y/o la aclimatación de distintos parásitos (i. e., protozoarios, hongos y bacterias) en sus hospederos (Supuran 2008a). Por estos motivos, durante los últimos años distintos grupos de investigación se han dedicado a diseñar fármacos que inhiben la actividad de las CAs. Se ha reportado que al menos veinticinco fármacos usados clínicamente inhiben significativamente a las CAs, además de muchos otros derivados que pertenecen a las familias de sulfonamidas, sulfamidas y sulfamatos (Supuran 2008b). Por otro lado, también se han hecho importantes avances en el entendimiento de la activación de las CAs por distintas clases de compuestos, lo que podría ser de suma utilidad en el desarrollo de fármacos que ayuden a tratar enfermedades como el Alzheimer, el envejecimiento y otras condiciones que involucran una deficiencia de la memoria (Supuran 2008b).

1.5 Los cambios de pH_i en los espermatozoides de mamífero y los factores que los modulan.

Los cambios de pH_i en los espermatozoides de mamífero regulan distintos procesos fisiológicos. En el epidídimo el fluido extracelular es muy ácido, ya que tiene un pH de entre 5.5 y 6.8, lo que equivale a una concentración de H^+ ($[\text{H}^+]$) de 3160 y 160 nM, respectivamente. El pH_i de los espermatozoides en el epidídimo es de menos de 6.0 debido a la actividad de distintos intercambiadores, incluyendo el de los Na^+/H^+ e intercambiadores de HCO_3^- , por lo tanto, siempre hay un gradiente de concentración de H^+ entre el citoplasma y el fluido extracelular. El pH bajo en el epidídimo (y por lo tanto también el bajo pH_i) parece ser el principal factor que mantiene inmóviles a los espermatozoides antes de la eyaculación, inhibiendo así la actividad de las dineinas del axonema, las cuales dependen en gran medida del pH_i . Por otro lado, también la alta viscosidad del fluido de la cauda del epidídimo y proteínas como la seminogelina inhiben la movilidad de los espermatozoides (Lishko *et al.*, 2012). Durante la eyaculación los espermatozoides se mezclan con el plasma seminal, cuyo pH es alto (~ 7.4 ; $[\text{H}^+] = 40$ nM) y entonces el pH_i en el espermatozoide sube a ~ 6.5 ($[\text{H}^+] = 316$ nM), lo que inicia la movilidad de los gametos masculinos. La flora vaginal, entre ellos los lactobacilos, acidifican la vagina (pH ~ 4 ; $[\text{H}^+] = 100$ μM), y durante el coito el plasma seminal incrementa transitoriamente el pH vaginal de 4.3 a 7.2, lo que alcaliniza el ambiente del tracto femenino y por lo tanto permite que los espermatozoides comiencen a nadar. Durante el subsecuente tránsito a través del tracto femenino, el pH_i de los espermatozoides se eleva aún más, pero su valor continúa debajo del pH_e . Interesantemente, en la mitad del ciclo menstrual el moco cervical se vuelve menos viscoso y su pH puede alcanzar valores de 9.0, lo que facilita el tránsito de los espermatozoides. El pH del fluido folicular varía entre 7 y 8, dependiendo de la especie y la fase del ciclo menstrual (Lishko *et al.*, 2012).

Después de la eyaculación también se eleva el AMPc en el interior del espermatozoide, debido a la activación de las adenilato ciclasas solubles (ACs) por el HCO_3^- . La concentración de HCO_3^- es más alta en el plasma seminal y el tracto reproductor femenino que en el fluido del epidídimo, y los transportadores de HCO_3^- (**Figura 6**) se encargan de llevar este anión al interior de los espermatozoides después de la eyaculación. Además, el oviducto es rico en CO_2 , el cual se convierte en HCO_3^- por acción de por lo menos la CAIV (Lishko *et al.*, 2012). El AMPc induce la fosforilación de las dineinas del axonema por PKA para incrementar el batido flagelar y por lo tanto la movilidad del espermatozoide. La ACs también se activa por Ca^{2+} , y el Ca^{2+} extracelular se requiere para el incremento de la frecuencia del batido flagelar dependiente de la ACs e iniciado por HCO_3^- .

La regulación de los procesos fisiológicos que suceden en los espermatozoides de mamífero está estrechamente relacionada con los niveles de HCO_3^- y los valores de pH_i (Nishigaki *et al.*, 2014). La regulación del HCO_3^- y el pH_i son importantes no sólo para iniciar y mantener la movilidad de los espermatozoides, sino también para la alcalinización del medio intracelular que ocurre durante la capacitación en espermatozoides de distintas especies, incluyendo a la humana, y para el incremento de pH_i detectado durante la RA inducida por ZP. A pesar de que ahora es claro que el HCO_3^- es esencial para la capacitación y otros cambios fisiológicos que suceden durante la fecundación, incluyendo la regulación del pH y la activación de las ACs, las entidades moleculares involucradas y la forma en que éstas interactúan aún no se conocen con detalle (Nishigaki *et al.*, 2014).

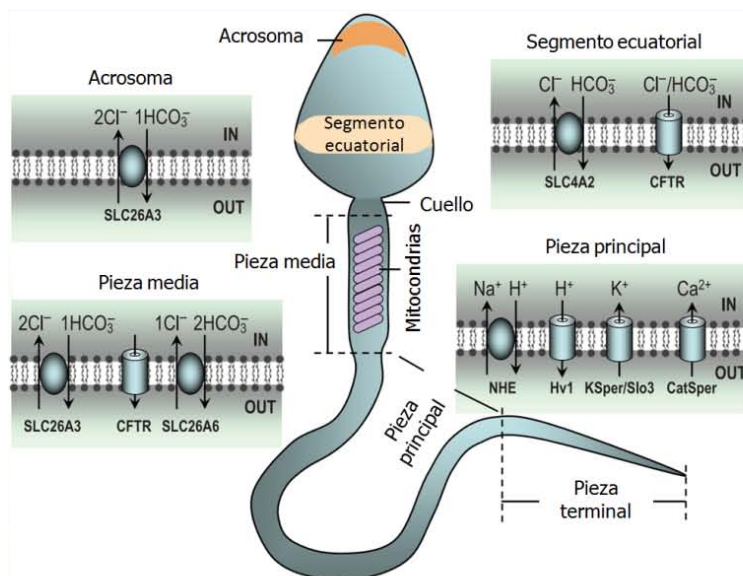


Figura 6. Distribución de los transportadores ácido/base y los canales iónicos sensibles a pH en el espermatozoide de mamífero. Modificado de Liu *et al.*, 2012.

2. Antecedentes

A pesar de la importancia de las CAs en la regulación del pH_i en las células de prácticamente todos los seres vivos, hasta ahora son escasos los estudios en los que se aborde la presencia, distribución y/o función de estas enzimas en los espermatozoides de mamífero (Nishigaki *et al.*, 2014) (**Tabla 2**).

CA	Especie/Localización	Técnica	Función	Referencia
CAI	H	ELISA	?	(Ali Akbar, Nicolaidis and Brown 1998)
CAII	H	ELISA	?	(Ali Akbar, Nicolaidis and Brown 1998)
	H, R	Northern Blot	?	(Mezquita, Mezquita and Mezquita 1999)
	R	Western Blot	?	(Parkkila <i>et al.</i> , 1991)
	H/SP	IC	?	(Wandernoth <i>et al.</i> , 2015)
	H R/PP	Western Blot IC	? Movilidad	
CAIV	R/A, SE, SP, PM	SEM	?	(Ekstedt, Holm and Ridderstråle 2004)
	R	RT-PCR	Movilidad	(Wandernoth <i>et al.</i> , 2010)
	R	Western Blot	“	(Wandernoth <i>et al.</i> , 2015)
	R/A, SE, SP, PM, PP R/PM, PP, PT	IC IC	“ Movilidad	
CAXII	R	PCR	?	(Halimi <i>et al.</i> , 2004)
	R/A	IC	?	
CAXIII	H, M	PCR	?	(Lehtonen <i>et al.</i> , 2004)
	H	IH	?	

Tabla 2. Identificación de las CAs en espermatozoides de humano y ratón mediante distintos métodos. H, Humano; R, ratón; A, Acrosoma; SE, Segmento Ecuatorial; SP, Segmento Postacrosomal; PM, Pieza Media; PP, Pieza Principal; IC, Inmunocitoquímica; SEM, Microscopía Electrónica de Barrido; IH, Inmunohistoquímica; ?, Función no explorada. Modificado de Nishigaki *et al.*, 2014.

La presencia de la isoforma CAII en espermatozoides de humano y rata se demostró inicialmente por Parkkila *et al.*, 1991. Utilizando las técnicas de inmunofluorescencia y *western-blot*, en este estudio demostraron que los espermatozoides de ambas especies expresan la CAII y que esta isoforma se localiza principalmente en la región postacrosomal de los espermatozoides de humano y en la región acrosomal de los espermatozoides de rata. Posteriormente, por ensayos de ELISA se confirmó también la presencia de la isoforma CAI tanto en espermatozoides de humano, como en el plasma seminal (Ali Akbar, Nicolaidis and Brown 1998). La isoforma CAXIII fue la última CA que se identificó en los gametos masculinos de humano; mediante PCR se demostró la presencia del ARNm que codifica para esta enzima, mientras que la proteína se inmunolocalizó sólo en cortes de testículo (Lehtonen *et al.*, 2004). Previamente se demostró que la isoforma CAIV se transfiere a la membrana plasmática de los espermatozoides de ratón mientras los gametos se desplazan a lo largo del epidídimo (Ekstedt, Holm and Ridderstråle 2004; Wandernoth *et al.*, 2010) y mediante distintas técnicas, en ambos casos se demostró

que la CAIV se localiza específicamente en el flagelo y cabeza de los espermatozoides. También mediante ensayos de inmunohistoquímica se demostró que la isoforma CAXII se encuentra en los espermatozoides maduros de ratón, aparentemente en la región acrosomal (Halimi *et al.*, 2004).

Respecto a los estudios funcionales de las CAs en los espermatozoides de mamífero, en un análisis de las proteínas de espermatozoides de ratón aisladas de fracciones de membranas resistentes a detergentes (i. e., balsas lipídicas) identificaron entre otras proteínas a la isoforma CAIV, la cual se une a la membrana de las células a través de una GPI (Sleight *et al.*, 2005). Se sabe que la CAIV es capaz de unirse a otros sistemas de transporte de HCO_3^- y en un estudio reciente se demostró la presencia de una interacción directa entre CAIV y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Alvarez, Vilas and Casey 2005). Esta interacción parece ser necesaria para una actividad completa del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. En espermatozoides de ratón se reportó previamente la presencia de un cotransportador electrogénico $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Demarco *et al.*, 2003), y la identificación de la CAIV en balsas lipídicas de espermatozoides de ratón sugiere que un mecanismo de acoplamiento similar podría estar presente en el movimiento transmembranal de HCO_3^- en los espermatozoides de esta especie.

Por otro lado, Wandernoth *et al.*, 2010 demostraron que tanto los espermatozoides no capacitados de ratón como los de humano responden a un aumento de CO_2 o HCO_3^- con un incremento en la frecuencia del batido flagelar. Este efecto se puede inhibir de forma dosis dependiente utilizando etoxizolamida (un inhibidor general de las CAs). En ese mismo estudio, al comparar la actividad de los espermatozoides de ratones silvestres con los *knock-out* CAIV ($\text{CAIV}^{-/-}$), se observó en estos últimos una disminución del 32% en la actividad total de las CAs y una disminución en la respuesta al CO_2 o HCO_3^- . En conjunto, los resultados de ese trabajo indican que las CAs participan en el mantenimiento de la movilidad en los espermatozoides de ratón, y que la isoforma CAIV cumple un papel importante en este proceso.

También se ha estudiado la participación de las CAs en la movilidad de los espermatozoides de organismos marinos (Tresguerres *et al.*, 2014). Particularmente, en los espermatozoides de los peces planos se encontró una isoforma de CA de 29 kDa, la cual considerando su secuencia de aminoácidos, probablemente se trata de la isoforma CAII (Inaba, Dréanno and Cosson 2003). Además, en los espermatozoides del calamar de la especie *Loligo bleekeri*, la producción de H^+ por una isoforma de CA anclada a la membrana plasmática, junto con un incremento intracelular de Ca^{2+} , es crucial en la vía de señalización quimiotáctica de estas células (Hirohashi *et al.*, 2013).

Considerando que las CAs son reguladores importantes del pH_i en las células de todos los seres vivos, y dado que se tienen antecedentes sobre la presencia de algunas isoformas de la familia α en espermatozoides de humano y ratón, este trabajo se realizó por los siguientes motivos:

1. Hasta ahora no se ha realizado un estudio en donde se investigue de manera sistemática la presencia de las CAs reportadas hasta ahora en espermatozoides de humano y ratón.

2. La capacitación es un evento fundamental en los espermatozoides de mamífero previo a la fecundación, sin embargo, hasta ahora no se ha investigado si también hay actividad de las CAs en espermatozoides capacitados, y en caso de haberla, si la magnitud de esta actividad es distinta a la reportada previamente en espermatozoides no capacitados.

3. Tampoco se sabe cuál es la contribución de determinadas isoformas de CAs a la actividad global de estas enzimas en los espermatozoides capacitados.

4. Se desconoce si las CAs participan en la regulación de eventos fundamentales previos a la fecundación, como la movilidad y la RA, en espermatozoides capacitados de humano y ratón.

5. Se desconoce cómo es la dinámica espacial y temporal de los cambios de pH_i en los que participan las CAs en los espermatozoides capacitados de humano.

.

3. Hipótesis

Las CAs participan en la regulación de la movilidad y en la RA en los espermatozoides de humano y ratón.

4. Objetivo general

Estudiar la presencia y el papel que cumplen las CAs en la modulación de la movilidad, la RA y los cambios intracelulares de pH en los espermatozoides capacitados de humano y ratón.

5. Objetivos específicos

1. Determinar el perfil de expresión de los miembros de la familia de CAs α en espermatozoides de humano y ratón.
2. Determinar la actividad de las CAs α en espermatozoides capacitados de ratón.
3. Evaluar la contribución de las CAs en la movilidad y la RA en espermatozoides capacitados de humano y ratón.
4. Evaluar la contribución de las CAs en la regulación del pH_i en espermatozoides capacitados de humano.

6. Materiales y Métodos

6.1 Separación de espermatozoides móviles de humano y de ratón.

Los espermatozoides de ratón se obtuvieron de las caudas de los epidídimos de ratones adultos (de entre 2 y 3 meses de edad), cepas CD1 o C57BL/6J. Los ratones CAII^{-/-} fueron proporcionados por el Dr. Joachim W. Deitmer (Universidad Técnica de Kaiserslautern, Kaiserslautern, Alemania). Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y los espermatozoides móviles de las caudas de los epidídimos se recuperaron en medio Whitten's pH 7.4 (**Tabla 3**) mediante la técnica de *swim-up* (Navarrete *et al.*, 2015) después de 30 minutos de incubación a 37 °C y con una atmósfera de CO₂ 5%/Aire 95%.

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	100
KCl	4.7
KH ₂ PO ₄	1.2
MgSO ₄	1.2
Glucosa	5.5
Piruvato de sodio	1
L-Lactato de sodio	4.8
HEPES	20
NaHCO ₃	24
CaCl ₂	2

Tabla 3. Medio Whitten's para espermatozoides de ratón.

Los espermatozoides de humano se obtuvieron de donadores sanos cuyas muestras de semen cumplieron los valores establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO 2010) (**Tabla 4**).

Parámetro	Límite de referencia inferior
Volumen de semen (mL)	1.5 (1.4-1.7)
Número total de espermatozoides (10 ⁶ /eyaculado)	39 (33-46)
Concentración de espermatozoides (10 ⁶ /mL)	15 (12-16)
Movilidad total (PR+NP, %)	40 (38-42)
Movilidad progresiva (PR, %)	32 (31-34)
Viabilidad (espermatozoides vivos, %)	58 (55-63)
Morfología de los espermatozoides (formas normales, %)	4 (3.0-4.0)

Tabla 4. Límites inferiores de referencia de la OMS para las características del semen humano.

Las muestras se licuaron a 37 °C durante al menos 30 minutos y los espermatozoides móviles se recuperaron en medio Ham's F-10 pH 7.4 mediante la técnica de *swim-up* como se muestra en la **Figura 7** (Mata-Martínez *et al.*, 2013).

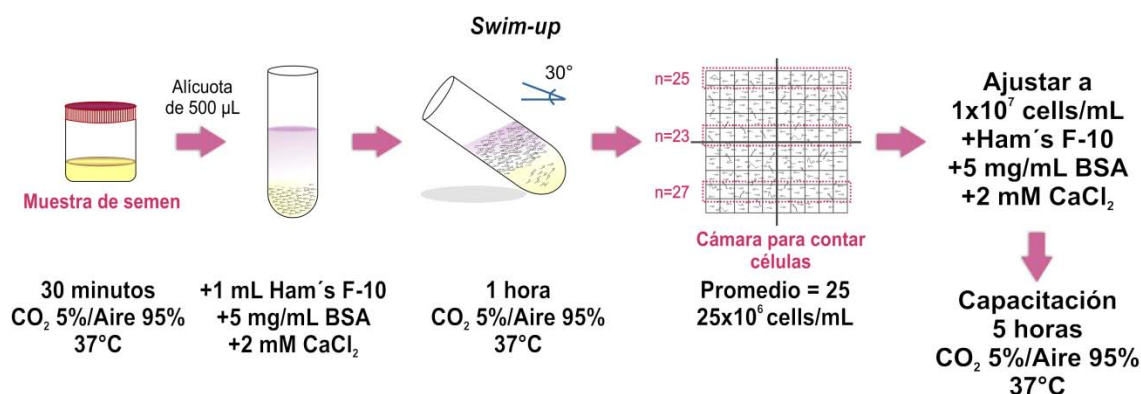


Figura 7. Obtención de espermatozoides móviles de humano mediante la técnica de *swim-up*. La muestra de semen se obtiene dentro de un recipiente estéril y este se coloca dentro de una incubadora a 37 °C con atmósfera de CO₂ 5%/Aire 95%. Se depositan 500 µL de la muestra en el fondo de tubos de ensayo y sobre la fase de semen se coloca 1 mL de medio Ham's F-10. Los tubos de ensayo se inclinan a 30° aproximadamente y se colocan dentro de una incubadora a 37 °C y con una atmósfera de CO₂ 5%/Aire 95% durante al menos 4 horas. Después de este tiempo, se recuperan los 800 µL superiores del medio Ham's F-10 de todos los tubos y se obtiene la concentración de células/mL después de contar a los espermatozoides en una cámara de Makler. Modificado de Mata-Martínez *et al.*, 2013.

La capacitación se promovió en los espermatozoides de ratón y humano incubando a las células en sus respectivos medios (Whitten's o Ham's F-10 pH 7.4) adicionados con albúmina sérica bovina (BSA) 5 mg/mL. Los espermatozoides de ratón y de humano se ajustaron a la concentración de 10x10⁶ células/mL y se mantuvieron dentro de una incubadora a 37 °C y con una atmósfera de CO₂ 5%/Aire 95% durante al menos 40 minutos o 4 horas, respectivamente. Antes de cada experimento, las células capacitadas de humano y de ratón se concentraron por centrifugación durante 5 minutos a 735x g (en una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415 C) y se resuspendieron en sus respectivos medios, pero en esta ocasión sin BSA. La composición de la solución fisiológica en la que se resuspendieron los espermatozoides de humano antes de cada experimento, se muestra en la **Tabla 5**.

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	94
KCl	4
MgCl ₂	1
Glucosa	5
Piruvato de sodio	1
L-Lactato de sodio	10
HEPES	30
NaHCO ₃	25
CaCl ₂	2

Tabla 5. Solución fisiológica para espermatozoides de humano.

6.2 SDS-PAGE y western-blot.

Después de recuperar a los espermatozoides móviles de ratón y de humano mediante la técnica de *swim-up*, las células se lavaron dos veces con PBS pH 7.4 (**Tabla 6**) y esta mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 735x g. Después del último lavado, la pastilla de células se resuspendió en 500 µL del amortiguador de solubilización (**Tabla 7**) y el volumen total se incubó en agitación constante durante 1.5 horas a 4 °C. Posteriormente, las células se concentraron nuevamente por centrifugación a 16,000x g durante 15 minutos a 4 °C, y las proteínas contenidas en el sobrenadante se concentraron a un volumen final de 100 µL con tubos Amicon Ultra de punto de corte de 10 kDa (Merck Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). El concentrado de proteínas se mezcló con amortiguador de carga (**Tabla 8**), se calentó a 70 °C durante 10 minutos y finalmente se centrifugó a 16,000x g durante 10 minutos. El volumen equivalente a la proteína total de 30x10⁶ células se cargó en cada carril de un SDS-PAGE con 10% o 15% de acrilamida, dependiendo del experimento. Las proteínas incluidas en el SDS-PAGE se separaron a 100 mV durante 1.5 horas y posteriormente se electrotransferieron a una membrana Immobilon P (Millipore) dentro de una cámara de transferencia en semiseco (Bio-Rad) durante 1 hora a 0.5 Å. Los sitios inespecíficos de la membrana se bloquearon con leche semidescremada al 5% en TBS-T pH 7.6 (**Tabla 9**) a temperatura ambiente. Los anticuerpos anti-CAI (Sigma Aldrich), anti-CAII (Sigma Aldrich), anti-CAIV (Santa Cruz Biotechnology) y anti-CAXIII (Sigma Aldrich) se diluyeron a una proporción 1:100 en leche semidescremada al 5% en TBS-T pH 7.6 y se incubaron con las membranas durante toda la noche a 4 °C. Las membranas con los anticuerpos primarios se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS-T pH 7.6 en agitación constante. Los anticuerpos *anti-Rabbit-HRP* (Santa Cruz Biotechnology) o

anti-Goat-HRP (Santa Cruz Biotechnology) (dependiendo del anticuerpo primario usado) se utilizaron a una dilución 1:10,000 en TBS-T pH 7.6 y se incubaron con las membranas durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Después, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS-T pH 7.6 y 3 veces durante 10 minutos con TBS pH 7.6. La reacción de quimioluminiscencia se llevó a cabo con los reactivos del kit *SuperSignal West Chemiluminiscent Substrate* (Pierce Biotechnology) dentro de un cuarto oscuro y el tiempo de exposición varió dependiendo del experimento.

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	137
KCl	2.7
Na ₂ HPO ₄	10
KH ₂ PO ₄	1.8

Tabla 6. Amortiguador salino de fosfatos (PBS).

Compuesto	Concentración (mM)/ Porcentaje
NaCl	150 mM
NaH ₂ PO ₄	10 mM
EDTA	2 mM
NaF	50 mM
Na ₂ VO ₄	0.2 mM
NP-40	1%
Desoxicolato de Sodio	1%
SDS	0.1%

Tabla 7. Amortiguador de solubilización. El amortiguador de solubilización contiene además una mezcla de inhibidores de proteasas Complete © (Roche) 2X y DNAsaI.

Compuesto	Concentración/ Porcentaje
EDTA	8 mM
Trisma base	0.5 M
Azul de bromofenol	1 µg/mL
SDS	10%
Glicerol	50%
β-mercaptoetanol	5%

Tabla 8. Amortiguador de carga 5X.

Compuesto	Concentración/Porcentaje
Tris pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0.05%

Tabla 9. Amortiguador salino de Tris con Tween 20 (TBS-T).

6.3 Inmunocitoquímica.

Después de recuperar a los espermatozoides móviles de ratón y humano mediante la técnica de *swim-up*, se tomaron 100 μL del medio con 1×10^5 células, se colocaron dentro de un tubo estéril y se diluyeron 1:2 en paraformaldehído 8% en PBS. Los 200 μL de células fijadas se colocaron dentro del pozo de una laminilla impresa con teflón (Electron Microscopy Sciences) y esta se colocó dentro de una cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 minutos con 100 μL de PBS, y después del último lavado la laminilla se secó al aire libre durante 1 hora. A las células secas se les agregó 100 μL de Tritón 0.1% en PBS durante 10 minutos y posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Para bloquear los sitios inespecíficos se agregaron 100 μL de BSA 5% en PBS y azida de sodio durante 2 horas, y después de retirar el bloqueador de cada pozo, se colocaron 100 μL de los anticuerpos anti-CAI (Sigma Aldrich), anti-CAII (Sigma Aldrich) y anti-CAXIII (Sigma Aldrich) diluidos 1:100 en PBS con BSA 5% y azida de sodio. Las células se incubaron en presencia de los anticuerpos durante toda la noche dentro de una cámara húmeda a 4 °C. Los anticuerpos no unidos se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS y después se colocó durante 1 hora el anticuerpo secundario *anti-Rabbit-Alexa 488* (Invitrogen) o *anti-Goat-Alexa 647* (Invitrogen) (dependiendo del anticuerpo primario usado) diluido 1:100 en PBS. Los anticuerpos secundarios no unidos se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS. Después del último lavado se eliminó el excedente de PBS en cada pozo, se colocaron 12 μL de Citifluor (Electron Microscopy Sciences) y un cubreobjetos. Las muestras se sellaron colocando barniz alrededor del cubreobjetos y se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM510 META.

6.4 Determinación de la actividad catalítica de las CAs en espermatozoides de ratón.

La actividad catalítica de las CAs en espermatozoides de ratón se determinó monitoreando el agotamiento a través del tiempo del ^{18}O a partir del $^{13}\text{C}^{18}\text{O}_2$, como se describió en (Badger and Price 1989). Esto mediante una secuencia de reacciones de hidratación y deshidratación del CO_2 y el HCO_3^- presentes. La pérdida del ^{18}O a partir del $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ (razón masa/carga; $m/z = 49$), el producto intermedio

$^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ ($m/z = 47$) y el producto final $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ($m/z = 45$) se monitoreó con un espectrómetro tetrapolar de masas (Modelo OmniStar GSD 320; Pfeiffer Vacuum GmbH, Asslar, Alemania). El enriquecimiento del ^{18}O se calculó a partir de la abundancia de los intermediarios 45, 47 y 49 en función del tiempo, de acuerdo con la fórmula: enriquecimiento $\log(\text{EL}) = \log [(49 \times 100)/(49 + 47 + 45)]$. Para calcular la actividad de las CAs de las muestras, la tasa de degradación del ^{18}O se obtuvo a partir de la pendiente del enriquecimiento logarítmico a través del tiempo, usando el programa OriginPro 9.1. La tasa de cambio se comparó con la tasa de la reacción no catalizada y la actividad enzimática en unidades por mililitro (U/mL) se calculó a partir de estos valores. En todos los experimentos se utilizaron 6 mL de medio Whitten's sin NaHCO_3 . Posteriormente, se adicionaron 6 μL del sustrato ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_2 + \text{H}_2^{18}\text{O}$) y se registró durante 6 minutos la reacción no catalizada (i. e., la reacción espontánea). Después se adicionaron aproximadamente 100 μL de medio con 5×10^6 células no capacitadas o capacitadas, y la reacción catalizada por las CAs presentes en los espermatozoides se registró durante 10 minutos. Al final del protocolo y sólo en los casos en los que se indica, se adicionaron los inhibidores para las CAs, los cuales se incubaron con las células durante 6 minutos. Antes de utilizar los espermatozoides, estos se lavaron dos veces durante 5 minutos con medio sin NaHCO_3 para eliminar cualquier traza presente de este compuesto que pudiera interferir con la medición de la actividad de las CAs. Los experimentos siempre se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 °C) y la velocidad de mezclado fue la misma en todas las pruebas.

6.5 Ensayos de movilidad.

Los ensayos de movilidad se llevaron a cabo en el equipo *Sperm Class Analyzer* (SCA; Microptic). Alícuotas de espermatozoides capacitados de ratón y de humano a una concentración de 10×10^6 células/mL se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y con una atmósfera de CO_2 5%/Aire 95% en presencia de los inhibidores de las CAs o DMSO como control negativo. Después de este tiempo, 10 μL con espermatozoides de humano o ratón se colocaron entre un portaobjetos y un cubreobjetos, o dentro de una cámara *MicroCell*, respectivamente, y se calcularon en al menos 200 células por experimento los siguientes parámetros: velocidad curvilínea (ing., *curvilinear velocity*; VCL), velocidad de la trayectoria promedio (ing., *average path velocity*; VAP), velocidad linear (ing., *straight line velocity*; VSL), rectitud (ing., *straightness*; STR), linearidad (ing., *linearity*; LIN), índice de oscilación (ing., *wobble*; WOB), desplazamiento lateral de la cabeza (ing., *lateral head displacement*; ALH) y frecuencia del batido flagelar (ing., *beat cross frequency*; BCF). Los valores de los parámetros los calculó el *software* SCA a

partir de una serie de imágenes obtenidas a una frecuencia de 50 Hz y con un microscopio con objetivo de 10X.

6.6 Evaluación de la reacción acrosomal.

La reacción acrosomal (RA) se midió en espermatozoides capacitados de humano y/o ratón mediante alguna(s) de las siguientes técnicas:

6.6.1 Evaluación de la RA con FITC-PSA. Se depositaron 150,000 espermatozoides en solución fisiológica dentro de un tubo Eppendorf. Los espermatozoides capacitados de humano se preincubaron durante 15 minutos o 5 horas con EZA 50 μM y posteriormente la RA se indujo con progesterona 10 μM (inductor fisiológico de la RA) o ionomicina 10 μM (ionóforo de Ca^{2+} que se usa como control positivo) durante 30 minutos dentro de una cámara húmeda a 37 °C y con una atmósfera de CO_2 5%/Aire 95%. Posteriormente se agregaron 100 μl de PBS a cada tubo y estos se centrifugaron durante 5 minutos a 735x g. El sobrenadante se descartó y se adicionaron 50 μL de metanol frío. Inmediatamente después, las células se resuspendieron y se colocaron en hielo para permeabilizar a las membranas plasmática y acrosomal externa de los espermatozoides. Los volúmenes se transfirieron a sus respectivos pozos sobre un portaobjetos con cubierta de teflón alrededor de los pozos y se dejaron secar durante toda la noche. Posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 12 μl de FITC-PSA (lectina de *Pisum sativum* acoplada a FITC; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS pH 7.4) y la placa se colocó dentro de una cámara húmeda durante 30 minutos. Después el portaobjetos se introdujo en un frasco con agua bidestilada fría y se mantuvo en agitación constante durante 15 minutos, cambiando el agua cada 5 minutos para eliminar el exceso de FITC-PSA. El excedente de agua se descartó del portaobjetos y la placa se dejó secar sobre una plancha a 37 °C y protegida de la luz. Finalmente, los espermatozoides se observaron en un microscopio ZEISS de epifluorescencia con un objetivo 100X de inmersión en aceite y se evaluó la presencia o ausencia del acrosoma en por lo menos 200 células elegidas al azar. FITC-PSA presenta una alta afinidad por los residuos de glucosa y manosa que se encuentran dentro del acrosoma. Como se muestra en la **Figura 8**, la lectina del fluoróforo se une a los residuos que se encuentran en los acrosomas intactos y por lo tanto las cabezas de las células no reaccionadas fluorescen. Por otro lado, cuando el contenido del acrosoma se libera durante la RA, se pierden los residuos a los cuales se podría unir la lectina del fluoróforo, y como consecuencia, las cabezas de las células reaccionadas no fluorescen.

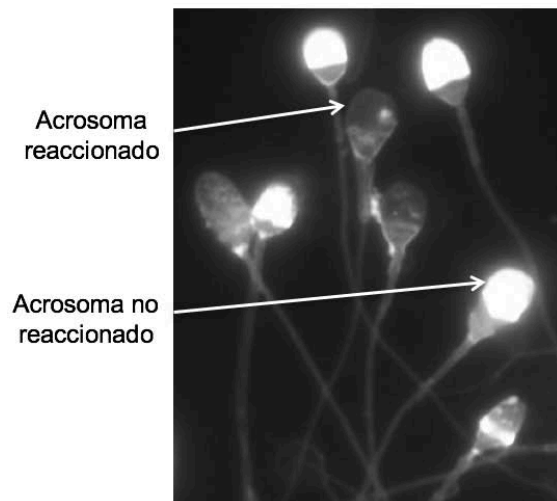


Figura 8. Evaluación de la RA en espermatozoides de humano con FITC-PSA.

6.6.2 Evaluación de la RA con Azul de Coomassie. La zona pelúcida solubilizada fue donada por el Biol. José Luis de la Vega Beltrán y se preparó a partir de homogenizados de ovarios de ratones hembra cepa CD1 de 3 meses de edad, tal y como se ha descrito previamente (Wilde, Ward and Kopf 1992). La suspensión de espermatozoides móviles obtenidos mediante la técnica de *swim-up* se incubó durante 40 minutos a 37 °C en condiciones capacitantes. Los espermatozoides capacitados de ratón se preincubaron durante 15 minutos o 5 horas con EZA 50 μ M y la RA se indujo con progesterona 10 μ M o ionomicina 10 μ M durante 30 minutos a 37 °C. Después, los espermatozoides se fijaron con formaldehído 5% en PBS, se montaron en portaobjetos y se secaron al aire. Las células se tiñeron con Azul de Coomassie G-250 0.22% disuelto en metanol al 50% y ácido acético glacial al 10% durante 5 minutos. Después de eliminar el excedente del colorante, a los portaobjetos se les adicionó glicerol al 50% (v/v) en PBS. El Azul de Coomassie se une a las proteínas que se encuentran dentro del acrosoma de las células intactas, por lo que el acrosoma en estas células se tiñe de azul oscuro, mientras que esta tinción no se produce en las células que han perdido el acrosoma (**Figura 9**). Se observó el estado del acrosoma en al menos 100 espermatozoides por condición experimental y posteriormente se calculó el porcentaje de RA.

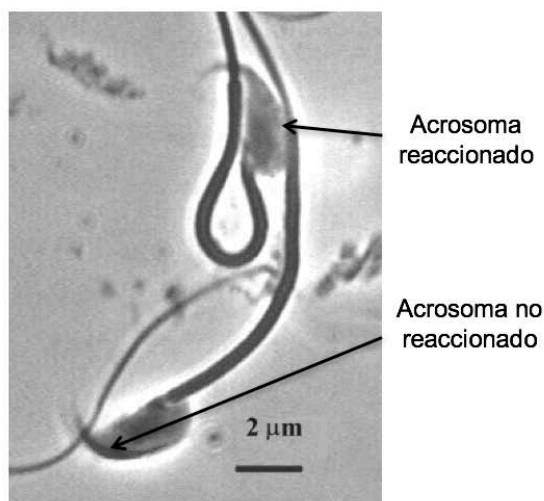


Figura 9. Evaluación de la RA en espermatozoides de ratón con Azul de Coomassie.

6.6.3 Evaluación de la RA con citometría de flujo. Se depositaron 3×10^6 espermatozoides capacitados de humano en solución fisiológica en tubos para citómetro de flujo y se tiñeron con la sonda fluorescente FITC-PSA ($5 \mu\text{g/mL}$ en PBS pH 7.4) para detectar la RA, y el colorante yoduro de propidio 100 nM para medir la viabilidad de las células. La fluorescencia de ambos colorantes se detectó en un citómetro FACSCanto II™ (Becton Dickson). En todos los casos se usaron como controles de compensación espermatozoides no teñidos, espermatozoides teñidos sólo con FITC-PSA y espermatozoides muertos teñidos sólo con yoduro de propidio (**ver Figura suplementaria 1**). Los espermatozoides capacitados de humano se preincubaron durante 15 minutos o 5 horas con EZA $30 \mu\text{M}$ y la RA se indujo con progesterona $10 \mu\text{M}$ o ionomicina $10 \mu\text{M}$ y se registró la fluorescencia de 20,000 células por condición cada 10 minutos durante 30 minutos. Los datos se analizaron usando los programas FACS Diva y FlowJo (Tree star 9.3.3). Los residuos celulares, los agregados celulares y las células muertas se excluyeron del análisis. Contrario a lo que sucede en la tinción con FITC-PSA con el procedimiento convencional (**ver Metodología 6.6.1**), mediante citometría de flujo la fluorescencia que se detecta pertenece a las células reaccionadas, mientras que las células intactas no fluorescen.

6.7 Evaluación de los cambios intracelulares de pH.

Se depositaron 3×10^6 espermatozoides capacitados de humano en solución fisiológica en tubos para citómetro de flujo y se cargaron durante 1.5 horas con la sonda fluorescente SNARF-5F AM $20 \mu\text{M}$ para detectar los cambios intracelulares de pH y posteriormente con el colorante Hoechst 100 ng/mL para medir la viabilidad de las células. La fluorescencia de ambos colorantes se detectó en un citómetro FACSCanto II™ (Becton Dickson). Se usaron como controles de compensación espermatozoides no

teñidos, espermatozoides teñidos sólo con SNARF-5F AM y espermatozoides muertos teñidos sólo con Hoechst. Los espermatozoides capacitados de humano se preincubaron durante 15 minutos o 5 horas con EZA 30 μ M y después los cambios intracelulares de pH se estimularon durante 15 minutos con NaHCO_3 25 mM o NH_4Cl 20 mM como control positivo. Se registró la fluorescencia de 20,000 células por condición. Los datos se analizaron usando los programas FACS Diva y FlowJo (TreeStar 9.3.3). Los residuos celulares, los agregados celulares y las células muertas se excluyeron del análisis.

6.8 Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el *freeware* libre KyPlot (Tokio, Japón) y los valores estadísticos mostrados son el promedio \pm error estándar del promedio (S. E. M.) de al menos tres experimentos. Se hicieron pruebas *t* de Student para calcular las diferencias significativas y se representan en las figuras como: $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

7. Resultados

Durante las décadas recientes se ha utilizado de forma intensiva a los espermatozoides de ratón como modelo para estudiar la fisiología de los gametos masculinos de mamífero, y los resultados obtenidos se han extrapolado en diversas ocasiones a la fisiología de los espermatozoides de humano (Darszon *et al.*, 2011). En el caso específico de las isoformas de CAs α , la presencia de cinco de ellas se exploró en estudios previos en los espermatozoides de mamífero, mediante diferentes técnicas experimentales (**ver Tabla 2**), sin embargo no en todos los casos se utilizaron espermatozoides de humano y de ratón para comparar los resultados y determinar si había diferencias o similitudes en ambas especies. Además, en algunos de estos reportes hay inconsistencias en los resultados obtenidos, las cuales están relacionadas principalmente con la localización subcelular de las CAs (Ali Akbar, Nicolaidis and Brown 1998; Parkkila *et al.*, 1991; Wandernoth *et al.*, 2015). Por todos estos motivos decidimos reexplorar la presencia de las CAs α en los espermatozoides de ambas especies. Para ello, inicialmente los extractos protéicos totales de espermatozoides de ambas especies fueron sometidos a ensayos de tipo *western-blot* usando los anticuerpos específicos anti-CAI, anti-CAII, anti-CAIV y anti-CAXIII. No hay péptidos comerciales disponibles para estos cuatro anticuerpos, por lo que en todos los casos se utilizó como control negativo el anticuerpo secundario correspondiente. Los anticuerpos secundarios por sí solos no son los mejores controles para experimentos de este tipo, debido a que a diferencia de los péptidos, estos no permiten determinar si el anticuerpo primario utilizado reconoce específicamente el antígeno para el cuál se diseñó. Por esta razón intentamos validar la especificidad de cada uno de estos anticuerpos mediante ensayos de coimmunoprecipitación, uniendo cada anticuerpo primario a las perlas de la columna de afinidad y después llevando a cabo ensayos tipo *western-blot* contra sí mismos. Mediante los ensayos de coimmunoprecipitación sólo logramos establecer las condiciones experimentales adecuadas para usar el anti-CAII. Como se muestra en la **Figura suplementaria 2**, comprobamos la presencia de la CAII en los primeros eluidos de la coimmunoprecipitación. Las bandas de los primeros eluidos de al menos tres experimentos independientes se secuenciaron por espectrometría de masas y así comprobamos que la única CA presente en la lista de proteínas obtenidas fue la CAII, lo que valida la especificidad del anticuerpo primario correspondiente. En la **Figura 10** se muestran los resultados obtenidos utilizando las proteínas solubles de los espermatozoides de humano y ratón; en los paneles **A, C, D y F** se observan en las proteínas solubles de ambas especies, bandas principales de aproximadamente 29 kDa que corresponden al peso molecular esperado para CAII y CAXIII. Además, utilizando las proteínas solubles de los espermatozoides de ratón se detectó también la banda de aproximadamente 35 kDa correspondiente a la

CAIV (**Figura 10E**). Por otro lado, utilizando las proteínas solubles de los espermatozoides de humano no se detectó ninguna banda con el peso molecular correspondiente para la CAIV (**Figura 10B**). En estos últimos experimentos se usó siempre como control positivo el mismo anticuerpo anti-CAIV, pero con extractos de proteínas de espermatozoides de ratón, debido a que la presencia de la CAIV ya se había reportado anteriormente en dichas células usando esta metodología (Wandernoth *et al.*, 2010).

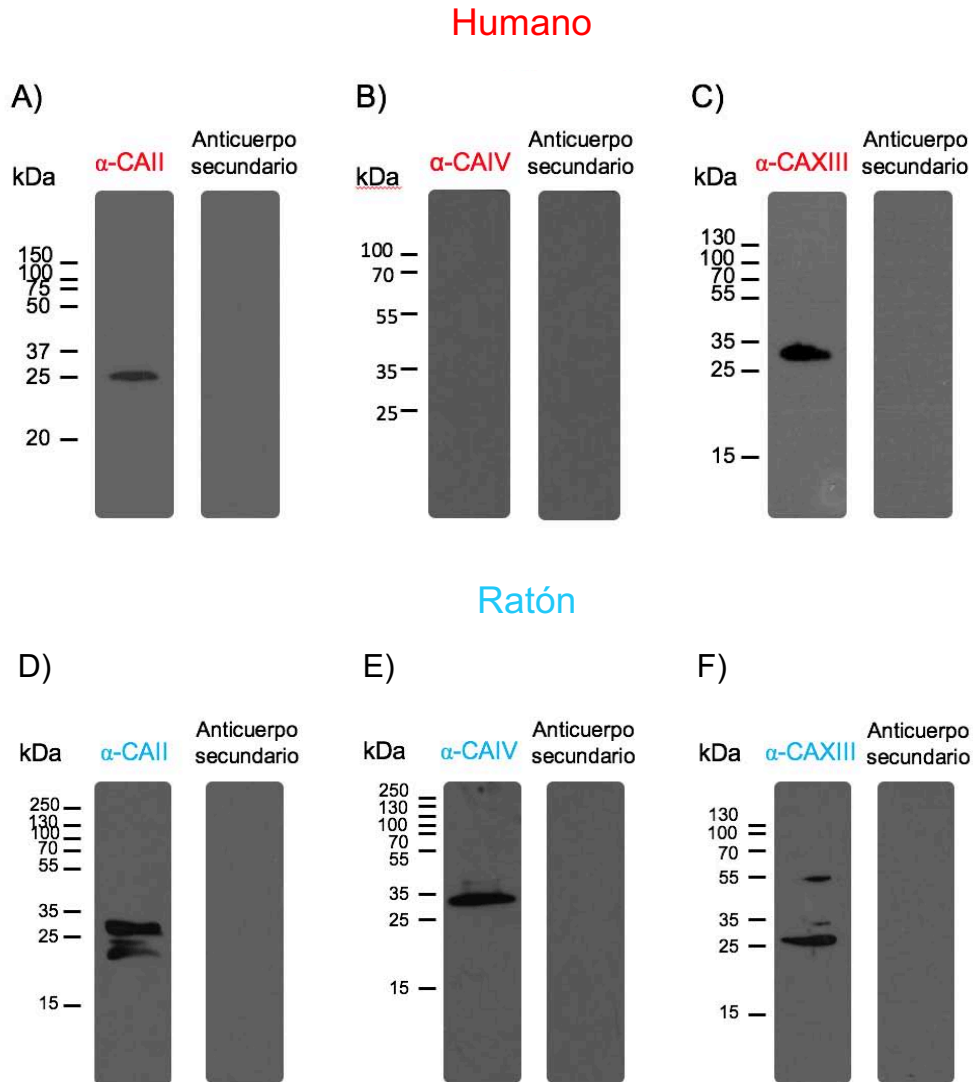


Figura 10. Identificación de CAII, CAIV y/o CAXIII en proteínas solubles de espermatozoides de humano y/o ratón. Se obtuvieron solubilizados de proteína total de espermatozoides no capacitados de (A-C) humano y (D-F) ratón. Se cargó el volumen equivalente a la proteína de 30×10^6 de células en cada carril de un SDS-PAGE al 15%. Como control negativo se utilizaron los anticuerpos secundarios correspondientes. El protocolo del *western-blot* se llevó a cabo como se describe en el apartado de **Materiales y Métodos**. (A, C, D y F) Se observa la presencia de las bandas principales de aproximadamente 29 kDa correspondientes a la CAII y la CAXIII en las proteínas solubles de los espermatozoides de ambas especies, y además (E) la banda de aproximadamente 35 kDa correspondiente a la CAIV en las proteínas solubles de los espermatozoides de ratón. (B) Por otro lado, no se detectó la presencia de la CAIV en las proteínas solubles de los espermatozoides de humano. $n > 3$.

En algunas repeticiones de los ensayos tipo *western-blot* usando el anti-CAII, se obtuvo una segunda banda de menor peso molecular que la esperada, y esto posiblemente se debe a que la CAII se escindió durante el protocolo experimental y el anticuerpo fue capaz de reconocer a esos péptidos de menor tamaño. Por otro lado, en algunas repeticiones de los ensayos usando el anti-CAXIII se obtuvo una banda de mayor peso molecular que la esperada, lo cual se debe posiblemente a la formación de dímeros de esta enzima. Todos estos resultados son importantes porque nunca antes se había demostrado la ausencia de la CAIV en espermatozoides de humano y la presencia de la CAXIII en espermatozoides de ratón. Como se mencionó anteriormente, en los espermatozoides de ambas especies se utilizó también un anticuerpo primario anti-CAI en los ensayos tipo *western-blot*, sin embargo, a pesar de realizar distintas modificaciones en las condiciones experimentales, no logramos establecer las condiciones adecuadas para llevar a cabo estos experimentos, por lo que no obtuvimos resultados que se puedan comparar con lo reportado en la literatura acerca de la presencia de esta isoforma en los espermatozoides de mamífero (Ali Akbar, Nicolaides and Brown 1998).

Además de investigar la presencia de las CAs en los solubilizados totales de proteína de espermatozoides, también es importante saber en qué región de la célula se encuentran estas enzimas, ya que esto puede dar indicios sobre el proceso fisiológico en el cual estaría involucrada cada isoforma. En este caso utilizamos los anticuerpos primarios anti-CAI, anti-CAII y anti-CAXIII. En la **Figura 11** se muestran los resultados obtenidos en espermatozoides de humano y ratón. Las imágenes muestran que las tres CAs se encuentran en el área del flagelo en los espermatozoides de humano; la CAI y la CAII se encuentran distribuidas a lo largo de esta región (**Figura 11A y B**), mientras que la CAXIII se encuentra principalmente en la pieza media (**Figura 11C**). Particularmente, la CAII se encontró también en la región de la cabeza en 104 de las 163 células (64%) que se fotografiaron en total. En todos los experimentos con espermatozoides de humano, el anticuerpo primario anti-CAI funcionó bien. Por otro lado, en los espermatozoides de ratón se utilizaron los mismos anticuerpos primarios para localizar a las CAs, y además se usó el colorante DAPI (que se une al ADN) para contrastar la cabeza (i. e., la zona en donde se encuentra el ADN) de las células en las imágenes obtenidas. Los resultados obtenidos se muestran en los paneles inferiores de la **Figura 11**. Como se muestra en la **Figura 11D y F**, no se logró detectar ninguna señal para la CAI y la CAXIII en los espermatozoides de ratón. Sin embargo, los resultados previos mostrados en el presente trabajo demuestran que estos anticuerpos reconocen a tales isoformas de CAs en los espermatozoides de humano, mediante ensayos de inmunocitoquímica y/o ensayos tipo *western-blot*. Por otro lado, sí se identificó a la CAII distribuida tanto a lo largo del flagelo como en la región acrosomal de los espermatozoides de ratón (**Figura 11E**).

Es importante mencionar que en este trabajo no se investigó la localización subcelular de la CAIV en ninguna de las dos especies, sin embargo los experimentos para determinar esto se realizarán en el futuro.

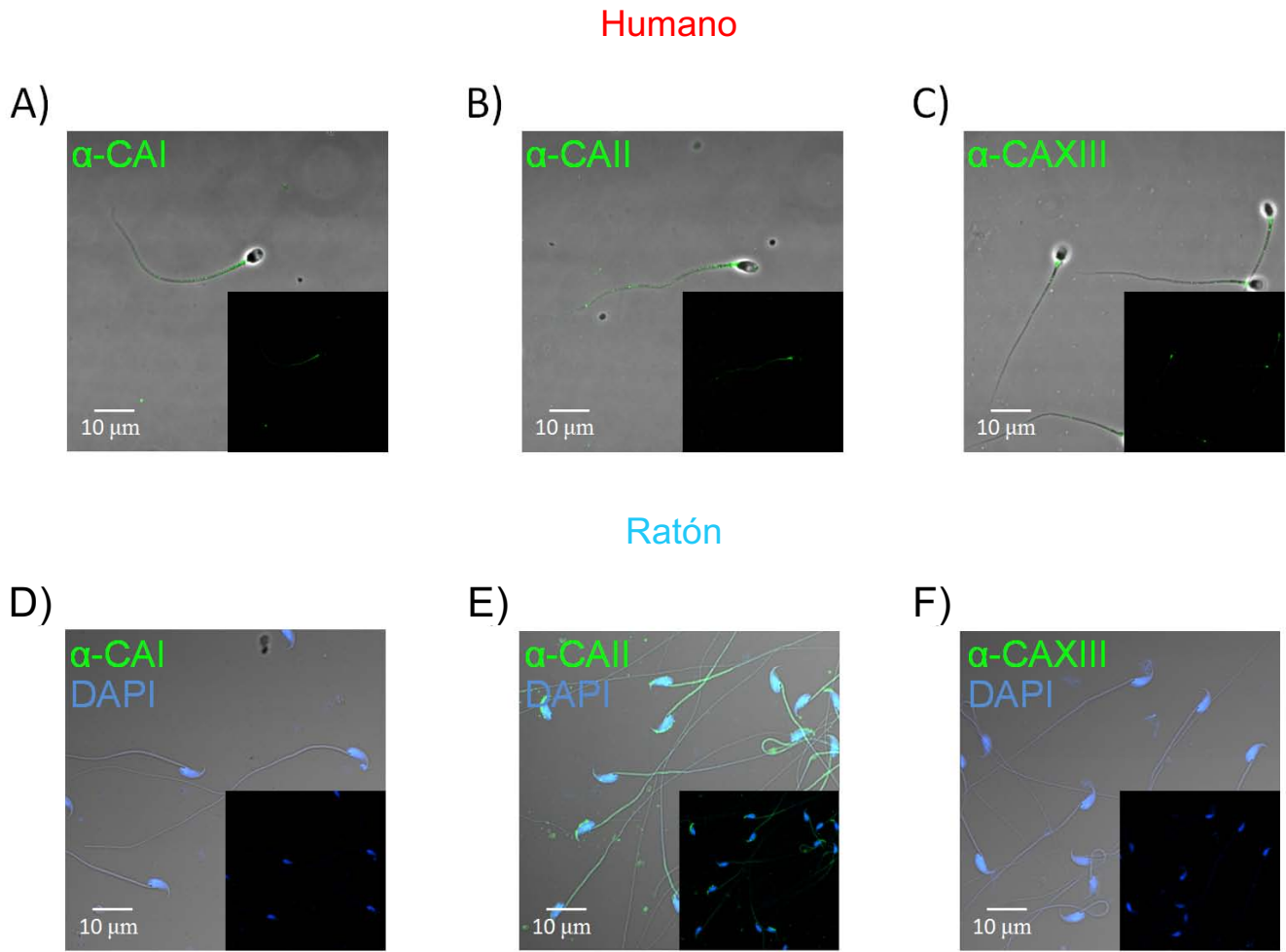


Figura 11. Inmunolocalización de CAI, CAII y/o CAXIII en espermatozoides de humano y/o ratón. Células no capacitadas de (A-C) humano y (D-F) ratón se fijaron sobre un portaobjetos. Posteriormente se permeabilizaron los espermatozoides y se bloquearon los sitios inespecíficos como se describe en **Materiales y Métodos**. En todos los casos se usaron como controles negativos los respectivos anticuerpos secundarios (imágenes no mostradas). (A y C) En los espermatozoides de humano, CAI y CAII se encuentran distribuidas a lo largo del flagelo, (C) mientras que la señal de CAXIII está principalmente en la pieza media. (E) Por otro lado, CAII también se encontró a lo largo del flagelo y además en la región acrosomal de los espermatozoides de ratón, (D y F) mientras que CAI y CAXIII no se pudieron localizar en estas células con los anticuerpos utilizados. $n > 3$.

Este es el primer estudio en el que se identifica la localización subcelular de CAI, CAII y CAXIII en espermatozoides de humano, y de CAII en espermatozoides de ratón. Interesantemente, todas las CAs identificadas se encuentran en el flagelo, lo que hasta este punto sugiere que estas enzimas podrían participar de alguna forma en la regulación de la movilidad. Además, la localización de la CAII en la

cabeza de los espermatozoides de ambas especies podría sugerir la participación de esta isoforma en procesos fisiológicos como la RA.

Después de demostrar la presencia o ausencia de ciertas isoformas de CAs en los espermatozoides de humano y ratón, decidimos averiguar cómo era la actividad catalítica de estas enzimas en las células vivas. Hasta ahora sólo hay un reporte previo en el que se estudió la actividad de las CAs en espermatozoides de ratón, pero únicamente en células no capacitadas (Wandernoth *et al.*, 2010). Los experimentos de esta sección los llevamos a cabo en el laboratorio del Dr. Joachim W. Deitmer, en el departamento de Zoología General de la Universidad Técnica de Kaiserslautern (Kaiserslautern, Alemania). Para realizar los ensayos de actividad de las CAs en los espermatozoides de ratón se utilizó un espectrómetro tetrapolar de masas y un sustrato con los átomos marcados, como se describió en **Materiales y Métodos**. En la **Figura 12A** se muestra cómo se hidroliza el sustrato a través del tiempo y cómo es la relación masa/carga (m/z) en los tres tipos de intermediarios que se producen durante la reacción. En la **Figura 12B**, mediante la fórmula LE (enriquecimiento logarítmico) = $\log [(49 \times 100)/(49 + 47 + 45)]$, se muestra que se obtiene una sola gráfica a partir de la cantidad que hay de los tres intermediarios de CO_2 a lo largo del tiempo: $m/z = 49$ ($^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$), $m/z = 47$ ($^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$) y $m/z = 45$ ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$). La línea roja representa la pendiente del enriquecimiento logarítmico espontáneo (LE_S), mientras que la línea azul indica la pendiente del enriquecimiento logarítmico en presencia de las CAs (LE_{CA}). Finalmente, mediante la fórmula $U = (\text{LE}_{CA} - \text{LE}_S) / \text{LE}_S$ se obtiene la diferencia entre ambas pendientes y el resultado se expresa como unidades por mililitro (U/mL).

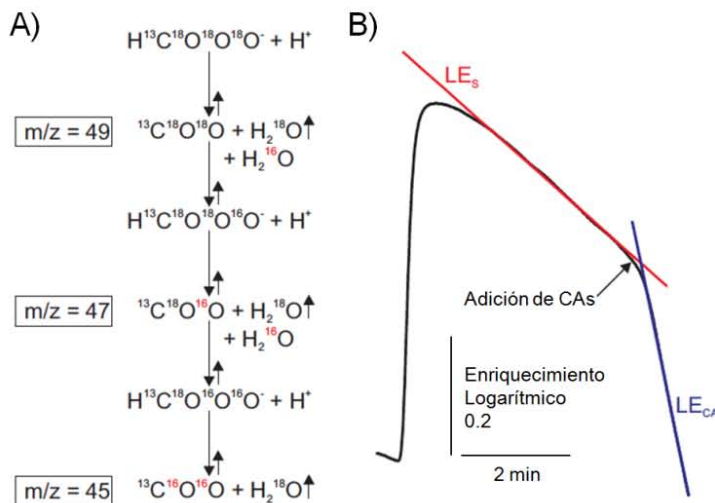
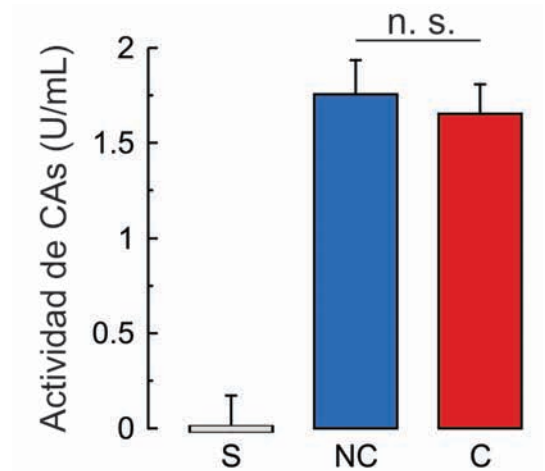


Figura 12. Registro de la actividad catalítica de las CAs. (A) En un espectrómetro tetrapolar de masas se registra el agotamiento a través del tiempo del ^{18}O a partir del $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$. Durante la reacción se producen tres distintos tipos de intermediarios de CO_2 : $m/z = 49$ ($^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$), $m/z = 47$ ($^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$) y $m/z = 45$ ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$). (B) El enriquecimiento logarítmico total se obtiene a partir de la relación de la cantidad de los 3 intermediarios a lo largo del tiempo. Después se ajusta una pendiente a la fase en la que se lleva a cabo la reacción de forma espontánea (LE_S) y a la fase catalizada por las CAs (LE_{CA}). Finalmente se obtiene la diferencia entre LE_S y LE_{CA} . Modificado de (Klier 2012).

Tomando en cuenta la clara importancia fisiológica de la capacitación en los espermatozoides de ratón, inicialmente decidimos investigar si también estas células presentan actividad de CAs, y de ser así,

determinar la magnitud de esta actividad comparada con la de las células no capacitadas. En todos estos experimentos se utilizó siempre como control negativo el valor del sustrato marcado en ausencia de células (i. e., el sustrato solo), por lo que este valor siempre es cercano a cero. En la **Figura 13** se presentan los resultados obtenidos en estas pruebas. La actividad de las CAs en los espermatozoides no capacitados fue de 1.75 ± 0.18 U/mL. Interesantemente también encontramos actividad de las CAs en los espermatozoides capacitados, cuyo valor fue de 1.65 ± 0.15 U/mL. Los valores de actividad de las CAs en las células no capacitadas y capacitadas de ratón no son significativamente distintos entre sí, por lo que se puede concluir que es igual la actividad de las CAs de los espermatozoides en ambos estados fisiológicos.

Figura 13. Los espermatozoides capacitados de ratón presentan actividad catalítica de las CAs. En un espectrómetro tetrapolar de masas se midió la actividad de las CAs en espermatozoides no capacitados (NC) y capacitados (C) de ratón. En ambos estados fisiológicos, el nivel de actividad de las CAs es de la misma magnitud. Como control negativo se usó sustrato marcado (S) en ausencia de células. n = 4. n.s; no significativo.



Considerando la relevancia fisiológica de los espermatozoides capacitados, decidimos utilizar en todos los experimentos posteriores sólo este tipo de células. Después decidimos investigar si la actividad de las CAs en los espermatozoides capacitados es sensible a la etoxizolamida (EZA; un inhibidor general para las CAs), cuya estructura química se presenta en el siguiente esquema.

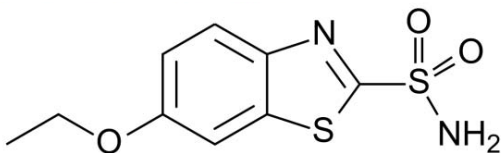


Figura 14. Estructura química de la Etozizolamida. Este compuesto es una sulfonamida que inhibe a los miembros de la familia alfa de las CAs. Si se ingiere tiene propiedades diuréticas y antiglaucoma, por lo que se usa como auxiliar para tratar padecimientos en los que la actividad de las CAs está involucrada.

Para comprender cómo la EZA inhibe la actividad de las CAs, primero es necesario explicar detalladamente cómo se lleva a cabo la reacción de catálisis en una CA α . Este proceso se describe en la **Figura 15**, y en la **Figura 16** se observa el mecanismo de acción de la EZA sobre las CAs.

Figura 15. El mecanismo de acción de las CAs. En esta reacción el ion metálico Zn^{2+} (presente en todas las CAs α) es esencial para la catálisis. Datos de cristalografía de rayos X han demostrado que en cada CA este ion se encuentra situado en el fondo de un sitio activo de 15 Å de profundidad, y está coordinado por tres residuos de Histidina (His94, His96 y His119) y una molécula de agua/ion hidroxilo. La interacción del Zn^{2+} con ciertos aminoácidos incrementa la probabilidad de que ocurra un ataque nucleofílico en la molécula de Zinc-Agua. **A)** La forma activa de la enzima es la básica, con un hidroxilo unido al Zn^{2+} . **B)** Este fuerte nucleófilo ataca a la molécula de CO_2 , **C)** lo que conlleva a la formación de bicarbonato coordinado con Zn^{2+} . **D)** Entonces el ion bicarbonato es desplazado por una molécula de agua y se libera en la solución, lo que produce la forma ácida de la enzima con una molécula de agua coordinada con el Zn^{2+} . Tomado de Supuran *et al.*, 2008.

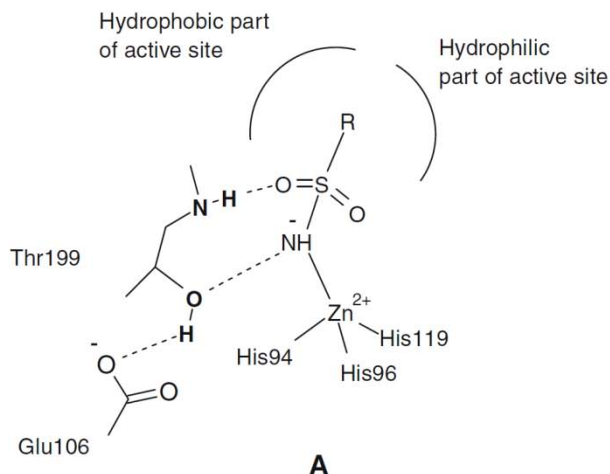
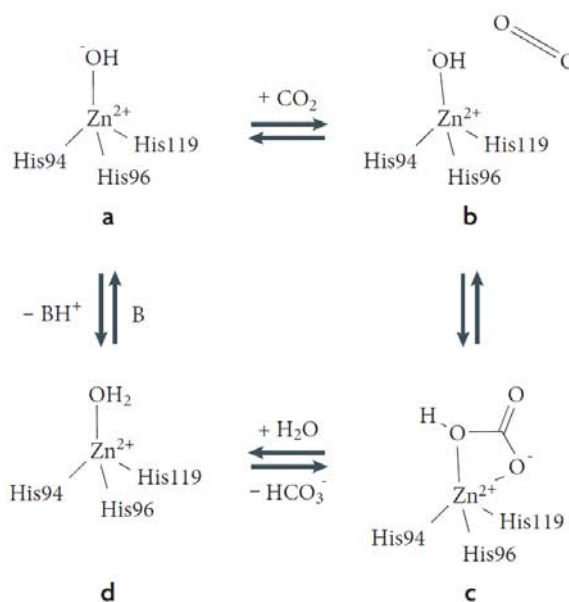


Figura 16. El mecanismo de acción de las Sulfonamidas. Las sulfonamidas y sus isoesteres, los sulfamatos y las sulfamidas, sustituyen al cuarto ligando del Zn^{2+} y se unen en geometría tetraédrica al ion metálico. Tomado de Supuran *et al.*, 2008.

La EZA es un compuesto capaz de inhibir a todas las isoformas de la familia de CAs α . Además, la EZA puede atravesar la membrana plasmática de las células, por lo que no es necesario permeabilizar a las células para medir también la actividad de las CAs intracelulares. Inicialmente realizamos pruebas preliminares para determinar en cuál rango de concentración debíamos usar la EZA. Utilizamos seis concentraciones entre 5 y 90 μM , tomando en cuenta que la IC_{50} de inhibición reportada en otros sistemas celulares es de 30 μM (Stridh *et al.*, 2012). Sin embargo, en todos los casos se inhibió por completo la actividad de las CAs en espermatozoides capacitados de ratón (datos no mostrados en este escrito debido a que no se hizo el número de repeticiones mínimas para hacer el análisis estadístico correspondiente); por este motivo decidimos probar concentraciones menores a 5 μM . Utilizamos tres concentraciones distintas, desde 10 nM hasta 1 μM (**Figura 17**) y DMSO (el vehículo de la EZA) como control negativo. Con 10 nM de EZA (1.70 ± 0.34 U/mL) no se observa un cambio significativo respecto al control con

espermatozoides capacitados (2.33 ± 0.17 U/mL). Sin embargo, a partir de 100 nM de EZA (0.88 ± 0.13 U/mL, $p \leq 0.01$) la actividad de las CAs comienza a disminuir hasta llegar a 0.57 ± 0.31 U/mL, $p \leq 0.001$ con 1 μ M de EZA. Con estos resultados concluimos que la EZA tiene un efecto inhibitorio dosis dependiente a partir de 100 nM en las CAs de los espermatozoides capacitados de ratón, alcanzando la inhibición total con 5 μ M (dato no mostrado). Se intentó calcular la IC_{50} de inhibición por la EZA en estas pruebas, sin embargo el número de puntos (en este caso, el control con células solas más las condiciones con las tres concentraciones de EZA) no es suficiente para hacerlo.

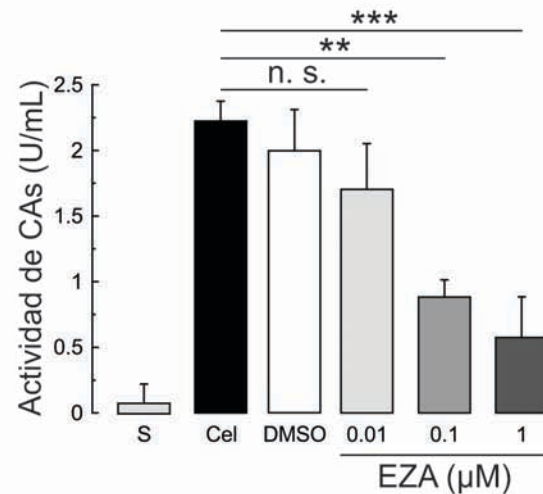


Figura 17. La EZA inhibe de forma dosis dependiente la actividad de las CAs en espermatozoides capacitados de ratón. En un espectrómetro tetrapolar de masas se midió la actividad de las CAs en espermatozoides capacitados (Cel) de ratón. Se usaron tres concentraciones de EZA: 10 nM, 100 nM y 1 μ M. Como controles se usó sustrato sin células (S) y DMSO (vehículo de la EZA). $n = 4$. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

Después procedimos a investigar de qué magnitud es la contribución de ciertas isoformas de las CAs α en la actividad total de CAs en estas células. Para cumplir este objetivo utilizamos dos tipos de recursos: espermatozoides de ratones machos que carecen de la CAII (CAII^{-/-}) y una batería de inhibidores específicos (dependiendo de la concentración usada) para distintas isoformas de las CAs.

Los ratones CAII^{-/-} presentan malformaciones en el esqueleto, lo cual no es sorprendente si se considera que la CAII cumple un papel crucial en el desarrollo de los huesos en organismos vertebrados (Wang, Schröder and Müller 2014). Esto debido a que el HCO₃⁻ formado durante la actividad de las CAs, actúa como precursor para la síntesis del carbonato de calcio (CaCO₃), el cual a su vez está involucrado en la formación inicial de los huesos. Además, estos animales son oligozoospermicos, lo que significa que tienen un número total de espermatozoides por debajo del número considerado como normal. Estudios previos sugieren la participación de la CAII en el proceso de espermatogénesis (Mezquita,

Mezquita and Mezquita 1999), lo que explicaría por qué la ausencia de esta isoforma en los ratones machos ocasiona una disminución en el número total de espermatozoides. Sin embargo, los ratones son fértiles, aunque no todas las crías llegan a la edad adulta. Por estas razones fue difícil, pero posible, llevar a cabo las mediciones correspondientes.

La actividad de las CAs se determinó en los espermatozoides capacitados de tres ratones machos CAII^{-/-} (**Figura 18**). Los espermatozoides CAII^{-/-} capacitados presentaron una actividad promedio de 1.1 ± 0.10 U/mL, valor que es significativamente bajo si se compara con el control de espermatozoides capacitados de ratones silvestres (2.2 ± 0.15 U/mL, $p \leq 0.001$). Esto significa que la ausencia de la CAII en los espermatozoides capacitados ocasiona una disminución de aproximadamente el 50% de la actividad global de las CAs, lo que demuestra que la isoforma CAII es responsable de la mitad de la actividad catalítica total de las CAs en estas células.

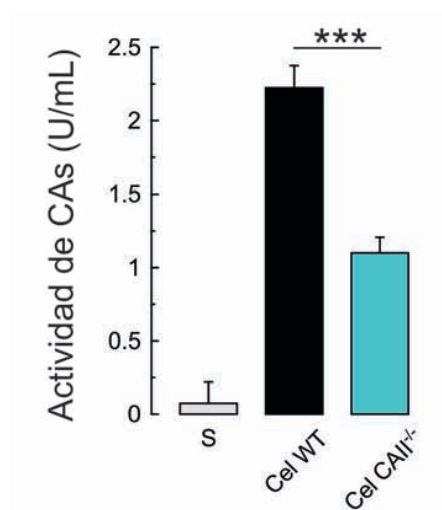
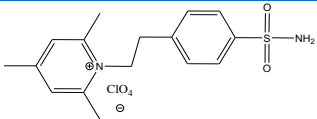
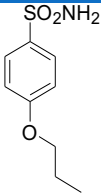
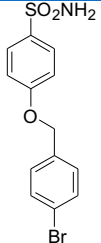
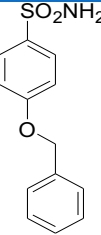
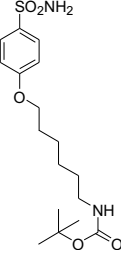
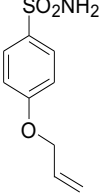


Figura 18. La CAII es responsable de la mitad de la actividad global de las CAs en espermatozoides capacitados de ratón. En un espectrómetro tetrapolar de masas se midió la actividad de las CAs en espermatozoides capacitados de ratones silvestres (Cel WT) y de ratones que carecen de la CAII (Cel CAII^{-/-}). Como control se usó sustrato sin células (S). $n = 3$. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Como se mencionó anteriormente, la EZA es un inhibidor general de las CAs α , sin embargo existen otros compuestos los cuales a ciertas concentraciones pueden inhibir de forma relativamente específica a ciertas isoformas de la familia α . Debido a que intentamos determinar cuáles isoformas (además de la CAII, como se demostró en los experimentos anteriores) se encuentran activas en los espermatozoides de mamífero, además de la EZA también utilizamos seis inhibidores de las CAs, los cuales fueron sintetizados recientemente por los Drs. Fabrizio Carta y Claudiu T. Supuran en la Universidad de Florencia, Italia. En la **Tabla 10** se presenta la información completa de cada uno de estos compuestos. Todos ellos son sulfonamidas (RSO_2NH_2); uno de ellos es impermeable, mientras que los cinco restantes son permeables.

Nombre	Estructura	Fórmula	Peso molecular (g/mol)
FC5-207A [☆]		$C_{16}H_{21}ClN_2O_6S$	404.87
FC19-849A [☾]		$C_9H_{13}NO_3S$	215.27
FC12-512A [☾]		$C_{13}H_{12}BrNO_3S$	342.21
FC10-439A [☾]		$C_{13}H_{13}NO_3S$	263.31
MB1-53B [☾]		$C_{17}H_{28}N_2O_5S$	372.48
FC12-506A [☾]		$C_9H_{11}NO_3S$	213.25

Compuesto impermeable [☆]

Compuesto permeable [☾]

Tabla 10. Inhibidores específicos para las CAs sintetizados recientemente.

Los Drs. Carta y Supuran calcularon previamente la constante de inhibición (K_I) para las distintas isoformas de CAs α (purificadas) en presencia de cada uno de los compuestos; esto mediante ensayos de hidratación de CO_2 en un espectrofluorómetro de mezclado rápido (D'Ambrosio *et al.*, 2012). En la

Tabla 11 se muestran los datos de inhibición para los seis compuestos, y además los valores con Acetazolamida (inhibidor general de CAs) y Celecoxibe (compuesto antiinflamatorio no esteroideo selectivo para COX-2), los cuales se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente. No se realizaron los experimentos correspondientes para calcular los valores de inhibición en las isoformas CAVIII, CAX y CAXI, porque estas tres CAs de forma natural no tienen actividad catalítica debido a la ausencia de uno, dos o tres residuos de histidina, respectivamente, los cuales en las demás isoformas de la familia α coordinan el ion metálico Zn^{2+} del sitio catalítico.

Isoforma de Anhidrasa Carbónica						
Inhibidor	Radical	hCAI	hCAII	hCAVII	hCAIX	hCAXII
FC5-207A		4,000	21	15	14	7
MB1-53B		6.1	5.2	N. D.	6.9	6.4
FC19-849A	<i>n</i> -Pr	780	12.8	10.1	13.2	7.9
FC12-506A	CH ₂ =CH-CH ₂	785	12	9.9	13.5	6.8
FC10-439A	PhCH ₂	762	20.3	8.3	17.9	10.5
FC12-512A	4-BrC ₆ H ₄ CH ₂	246	27.8	8.9	3.5	6.4
Acetazolamida	-	250	12	2.5	25	5.7
Celecoxibe	-	50,000	21	2,170	16	18

Isoforma de Anhidrasa Carbónica							
Inhibidor	hCAIII	hCAIV	hCAVA	hCAVB	hCAVI	mCAXIII	hCAXIV
FC5-207A	3.1x10 ⁵	60	88	70	65	21	13

N. D; Dato no disponible

Tabla 11. Valores de la K_I (nM) para las isoformas de CA α de humano (h) o ratón (m).

Usamos distintas concentraciones de cada compuesto para explorar su efecto sobre la actividad de las CAs en espermatozoides capacitados de ratón (**Figura 19**). Todos los compuestos presentan una inhibición dosis dependiente sobre las CAs a partir de 100 μ M, excepto FC10-439A que lo hace a partir de 1 μ M (**Tabla 12**). Estos resultados son consistentes con los obtenidos previamente con EZA, ya que

demuestran que hay actividad de las CAs α en los espermatozoides capacitados de ratón. Esto significa que entre todos los inhibidores utilizados en este trabajo, la EZA es el más potente, ya que inhibe la actividad de estas enzimas a partir de una concentración de 100 nM.

	Células	1 nM	100 nM	1 μ M	10 μ M	100 μ M	1 mM
FC5-207A	2.78 \pm 0.17 n. s.	-	-	2.56 \pm 0.19 n. s.	1.34 \pm 0.39 n. s.	0.46 \pm 0.32 ***	0.32 \pm 0.26 ***
FC19-849A	1.59 \pm 0.14 n. s.	1.63 \pm 0.68 n. s.	1.71 \pm 0.07 n. s.	1.78 \pm 0.29 n. s.	-	0.43 \pm 0.18 **	0.20 \pm 0.11 ***
FC12-512A	2.85 \pm 0.30 n. s.	-	2.67 \pm 0.14 n. s.	2.24 \pm 0.84 n. s.	-	0.66 \pm 0.23 **	-
FC10-439A	3.11 \pm 0.15 n. s.	2.9 \pm 0.28 n. s.	2.78 \pm 0.27 n. s.	2.33 \pm 0.36 n. s.	-	-0.20 \pm 0.14 ***	-0.54 \pm 0.21 ***
MB1-53B	3 \pm 0.20 n. s.	2.92 \pm 0.07 n. s.	2.57 \pm 0.13 n. s.	2.71 \pm 0.25 n. s.	-	0.51 \pm 0.19 ***	0.43 \pm 0.49 ***
FC12-506A	3.98 \pm 0.60 n. s.	-	3.60 \pm 1.68 n. s.	2.77 \pm 1.06 n. s.	-	-0.58 \pm 0.09 **	-0.02 \pm 0.55 *

Tabla 12. Valores de actividad de las CAs (U/mL) en espermatozoides capacitados de ratón en presencia de los inhibidores de CAs recientemente sintetizados. Los valores representan el promedio \pm S. E. M. n > 3. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

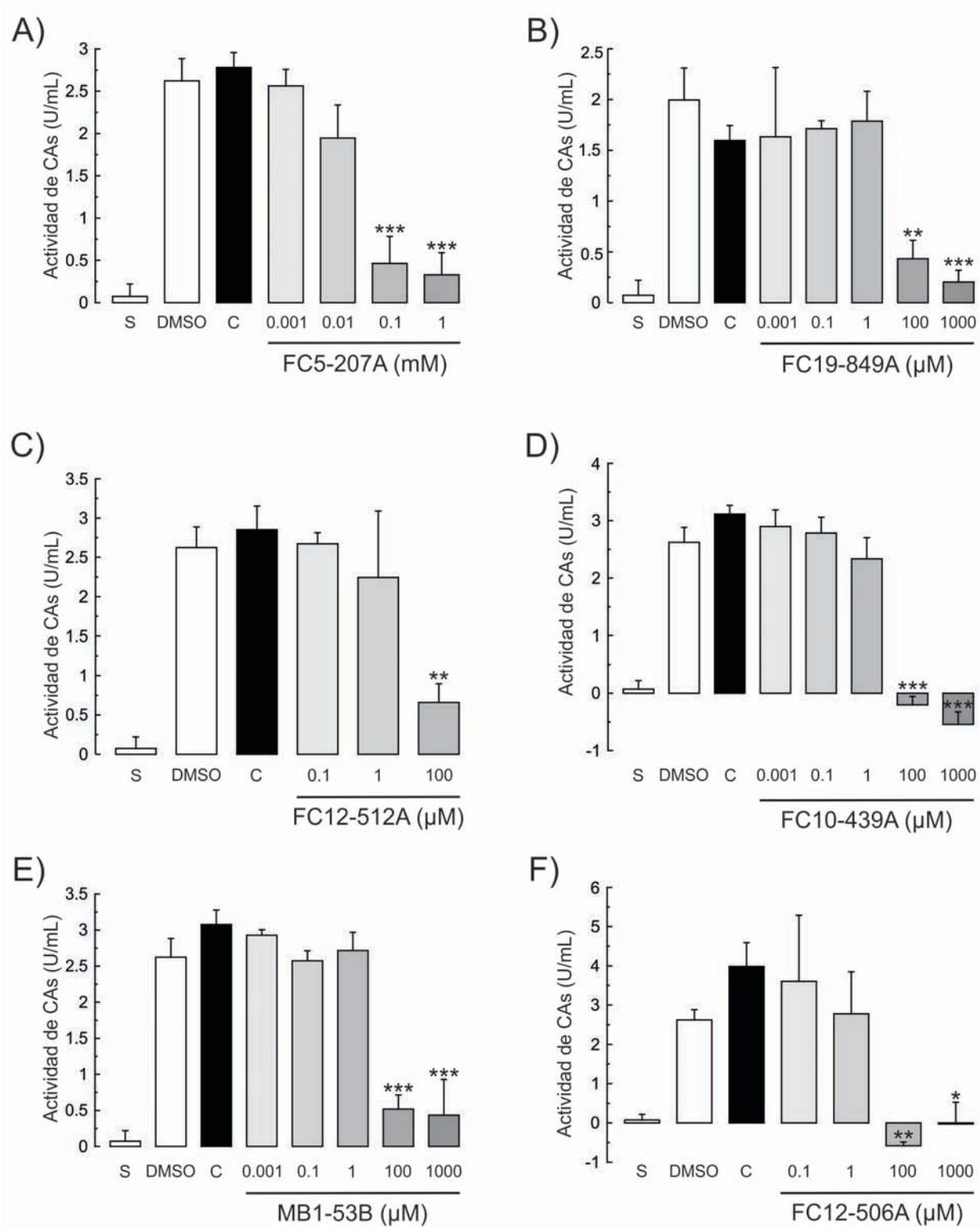


Figura 19. Los compuestos derivados de la sulfonamida inhiben de forma dosis dependiente la actividad de las CAs en espermatozoides capacitados de ratón. En un espectrómetro tetrapolar de masas se midió la actividad de las CAs en espermatozoides capacitados de ratón (C) en presencia de distintas concentraciones de inhibidores de CAs y se usaron sustrato solo (S) y DMSO como controles negativos. (A) FC5-207A es un inhibidor impermeable, (B-F) mientras que los otros cinco compuestos son permeables. $n > 3$. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Después de haber demostrado que las CAs se encuentran activas en los espermatozoides de ratón, el siguiente paso de este trabajo fue averiguar si estas enzimas están involucradas en la regulación de procesos fisiológicos previos a la fecundación. Uno de estos eventos es la movilidad, la cual es crucial porque le permite al espermatozoide desplazarse a lo largo del tracto reproductivo femenino hasta llegar finalmente al óvulo y así depositar el material genético que contiene. Una de las formas para estudiar el movimiento de los espermatozoides es utilizar un dispositivo llamado CASA (ing., *Computer-Aided Sperm Analysis*) que consta de una cámara de video acoplada a un microscopio y a una computadora. Esta última contiene un programa de rastreo de células (Mortimer 2000). En este equipo el análisis del movimiento de los espermatozoides comienza cuando se digitaliza la imagen de las células, obtenida mediante el microscopio y la cámara. La computadora determina el número de píxeles que cubren la cabeza de cada célula. Dependiendo de la especie, hay un número mínimo y máximo de píxeles que es aceptable para el tamaño de la cabeza de un espermatozoide, por lo que la computadora reconoce como espermatozoide a todo aquel objeto cuyo número de píxeles está en ese intervalo. Después de que se han identificado y grabado las posiciones (x,y) de las cabezas de todos los espermatozoides en un marco, se analiza la posición de las mismas células en el siguiente marco. Entonces la computadora busca la imagen de la cabeza de un espermatozoide entre dos marcos consecutivos, dentro de una zona de probabilidad, la cual es un círculo de un radio particular alrededor de la cabeza. Este radio se determina por la distancia máxima que se esperaría que un espermatozoide cubra en el periodo de tiempo que hay entre los dos marcos. Después de que la imagen secuencial de la cabeza de un espermatozoide se ha identificado y se han localizado sus coordenadas (x,y), se analiza el siguiente marco y así sucesivamente hasta que el periodo de tiempo se termina. Una vez que se tienen las trayectorias de los espermatozoides, se pueden calcular los valores numéricos para los parámetros de movimiento.

Los valores cinemáticos determinados para cada espermatozoide cubren la velocidad del movimiento, el ancho de la trayectoria de la cabeza y la frecuencia de cambio en la dirección de la cabeza (Mortimer 2000). Los valores de velocidad que se pueden determinar en un espermatozoide son la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad de línea recta (VSL) y la velocidad promedio de la trayectoria (VAP) (**Figura 20**). Todos estos valores se expresan en micrómetros por segundo. VCL se refiere a la distancia total que la cabeza del espermatozoide cubre durante el periodo de observación y siempre es el valor más alto de los tres tipos de velocidad. VSL se determina a partir de la distancia en línea recta entre el primer y último punto de la trayectoria y expresa la distancia neta de espacio durante el periodo de observación. Este siempre es el valor más bajo de las tres velocidades. VAP es la distancia promedio que un espermatozoide ha viajado en la dirección promedio de movimiento durante el periodo de

observación. Debido a que la forma de la trayectoria influye en los valores de velocidad, los valores de velocidad también se comparan y a partir de esto se derivan más parámetros de movimiento. La relación de las tres velocidades son la linearidad (LIN), la rectitud (STR) y el índice de oscilación (WOB) y se derivan como se muestra a continuación:

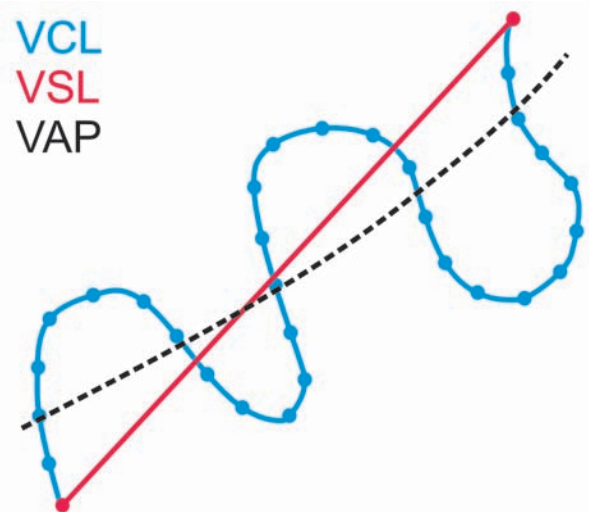
$$\text{LIN} = (\text{VSL}/\text{VCL})\times 100$$

$$\text{STR} = (\text{VSL}/\text{VAP})\times 100$$

$$\text{WOB} = (\text{VAP}/\text{VCL})\times 100$$

Estos tres valores se expresan como porcentajes. La amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), que es el ancho del movimiento lateral de la cabeza del espermatozoide, se calcula como el ancho total de la trayectoria de la cabeza y se expresa en micrómetros. Por último, la frecuencia del batido flagelar (BCF), es el número de veces que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección del movimiento y se expresa en Hertz (Mortimer 2000).

Figura 20. Determinación de los valores cinemáticos de un espermatozoide. Los tres valores de velocidad se determinan como se muestra en la figura. **VCL** se calcula a partir de la distancia total que recorre una célula, **VSL** se calcula a partir de la distancia recta entre el punto inicial y el punto final de la trayectoria, y **VAP** se obtiene a partir de la distancia promedio de desplazamiento. Las tres velocidades se expresan en $\mu\text{m/s}$. Los puntos azules indican la posición del espermatozoide en cada imagen a lo largo del tiempo.



Vale la pena mencionar que este es el primer trabajo en el que se explora a detalle la participación de las CAs en la movilidad de los espermatozoides capacitados de humano y ratón, ya que previamente sólo se había investigado el papel de las CAs en la BCF de los espermatozoides no capacitados de ratón (Wandernoth *et al.*, 2010). Por otro lado, debido a que entre todos los inhibidores de CAs usados en este trabajo, la EZA demostró ser el más potente en los ensayos de actividad catalítica de las CAs, primero decidimos explorar cuál era el efecto de este compuesto en los espermatozoides capacitados de ambas especies.

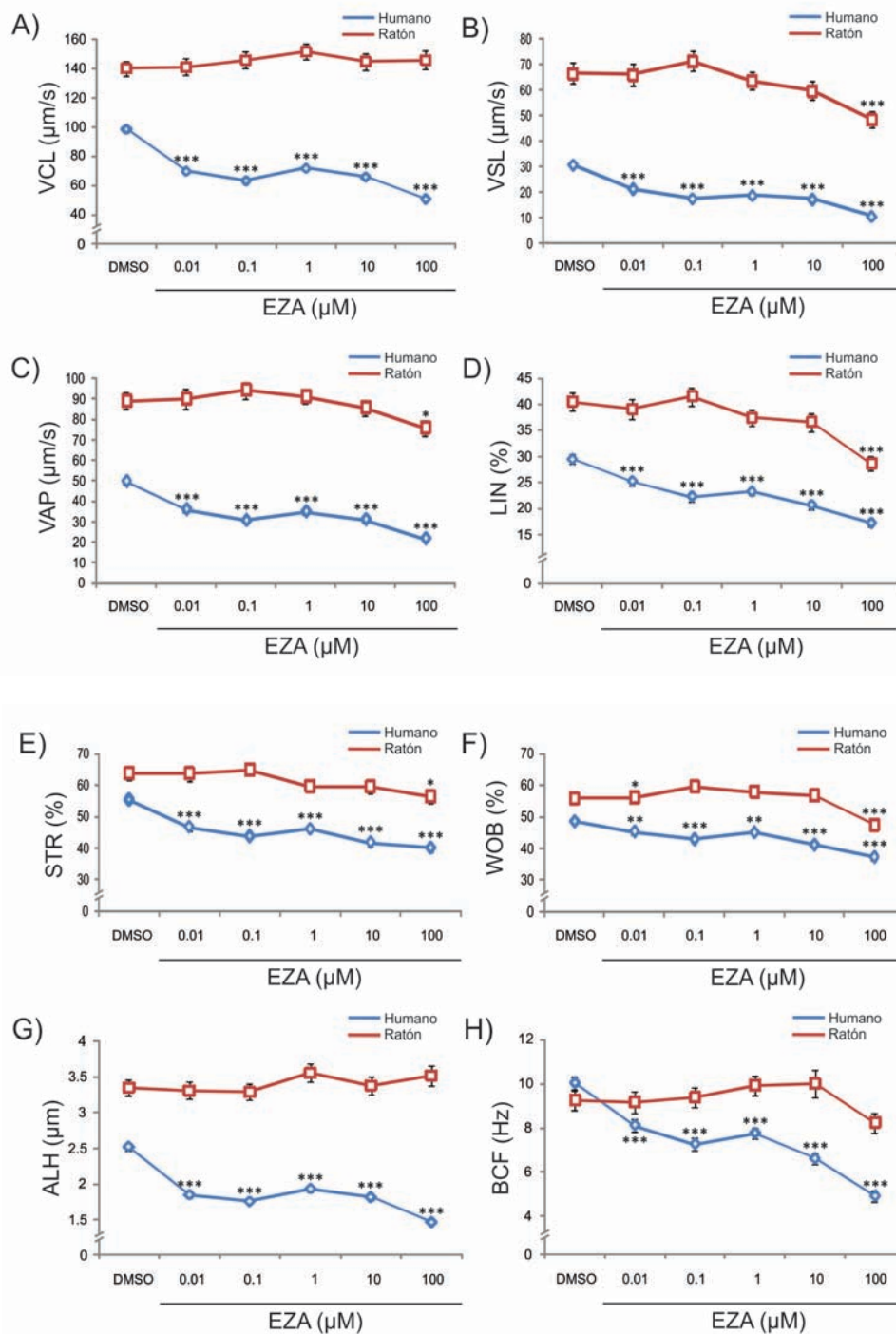


Figura 21. La EZA disminuye los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de humano con mayor potencia que en los espermatozoides capacitados de ratón. Se registró la movilidad de espermatozoides capacitados de humano (azul) y ratón (rojo), en ausencia o presencia de cinco concentraciones distintas de EZA: 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM y 100 μM . En todas las pruebas se usó DMSO (el vehículo de la EZA) como control negativo. La adquisición de las imágenes se realizó siempre a una frecuencia de 50 Hz y las células se observaron con un objetivo de 10X. En cada experimento se analizaron al menos 200 células. $n > 3$. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

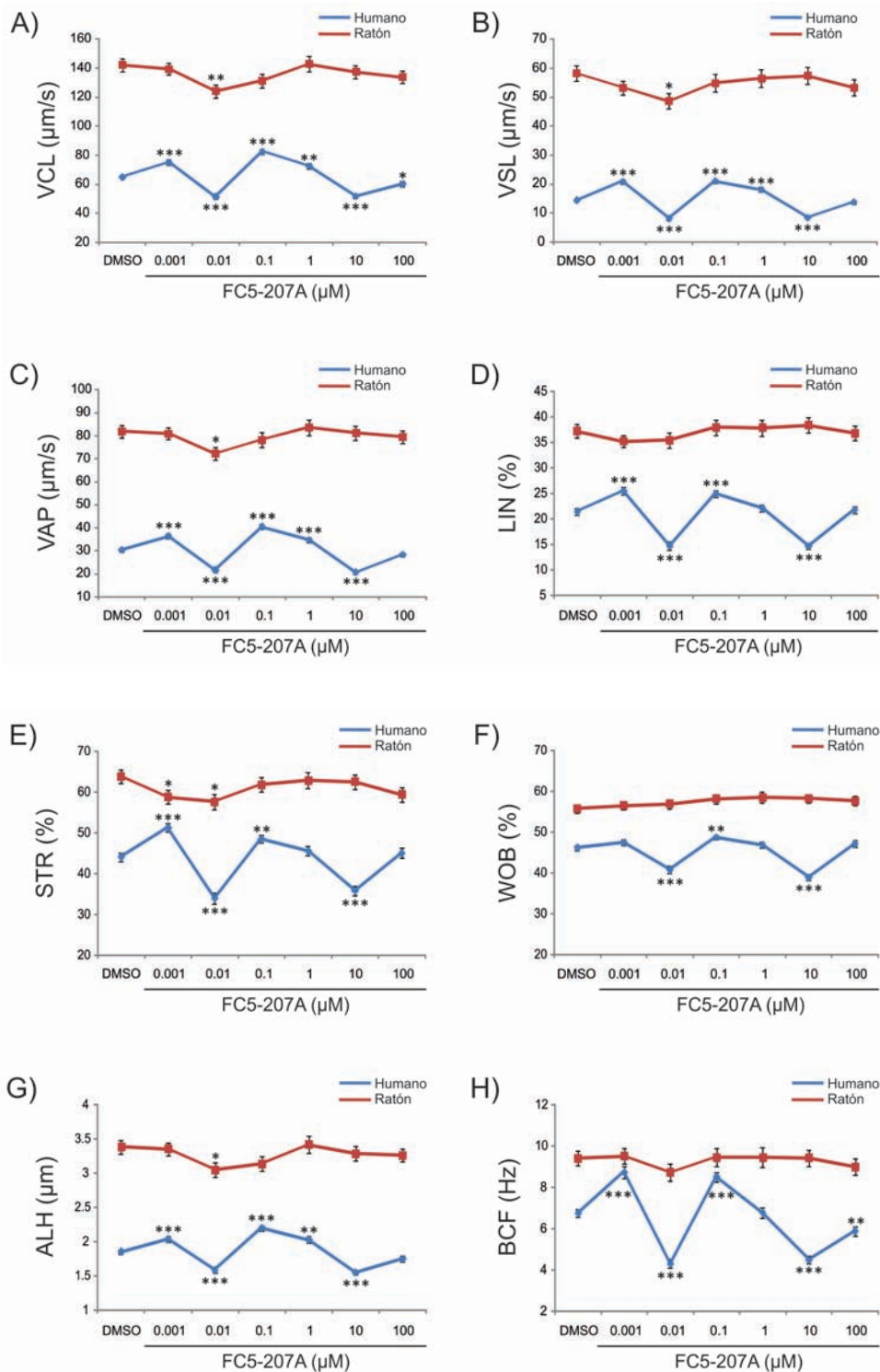


Figura 22. El FC5-207A disminuye a bajas concentraciones los parámetros de movilidad de los espermatozoides capacitados de ratón, mientras que en espermatozoides capacitados de humano disminuye e incrementa los parámetros de movilidad. Se registró la movilidad de espermatozoides capacitados de humano (azul) y ratón (rojo), en ausencia o presencia de seis concentraciones distintas del compuesto impermeable FC5-207A: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM y 100 μM. En todas las pruebas se usó DMSO (el vehículo del FC5-207A) como control negativo. La adquisición de las imágenes se realizó siempre a una frecuencia de 50 Hz y las células se observaron con un objetivo de 10X. En cada experimento se analizaron al menos 200 células. $n > 3$. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

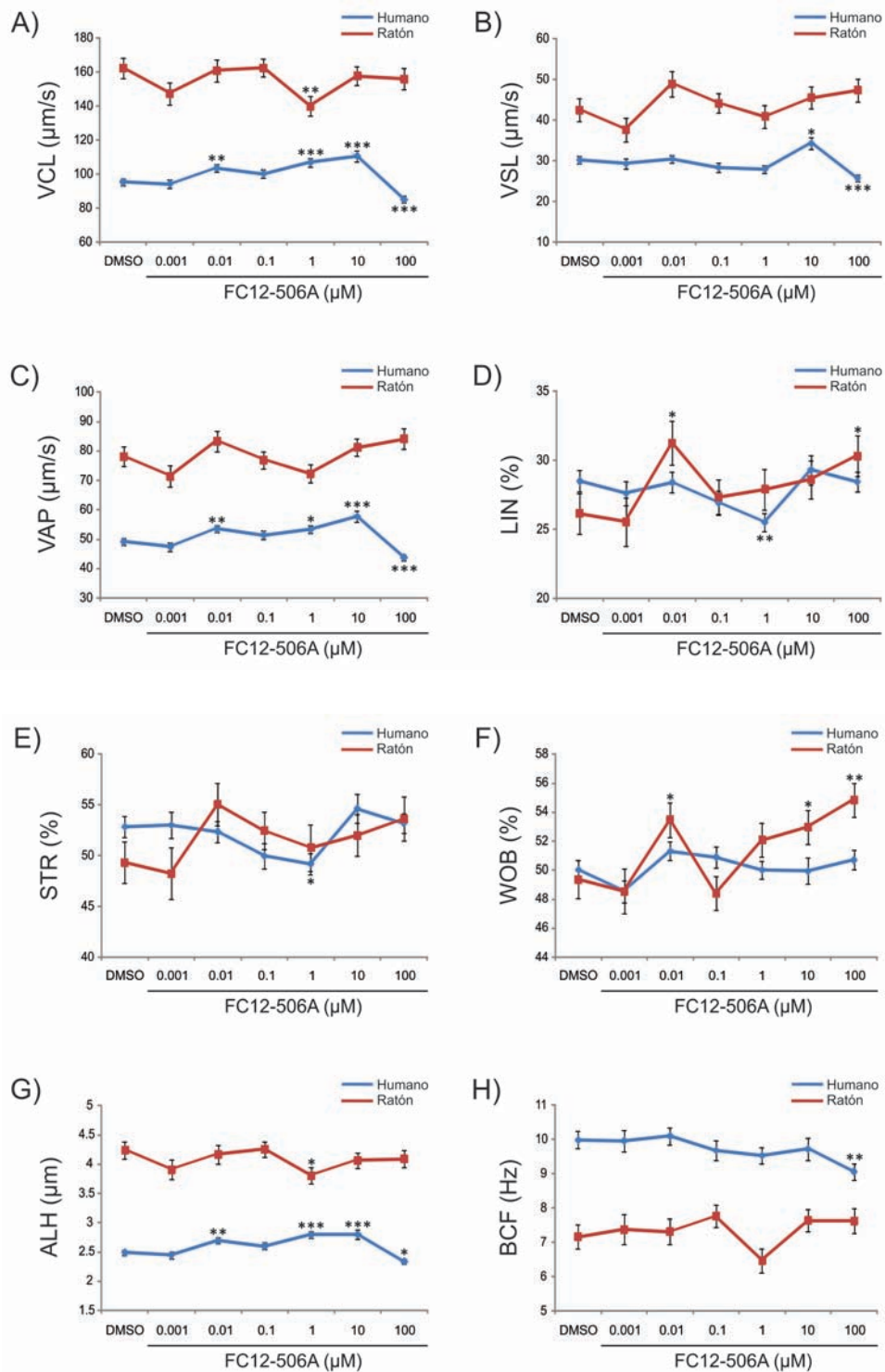


Figura 23. El FC12-506A disminuye e incrementa a distintas concentraciones los parámetros de movilidad de los espermatozoides capacitados de humano y de ratón. Se registró la movilidad de espermatozoides capacitados de humano (azul) y ratón (rojo), en ausencia o presencia de seis concentraciones distintas de FC12-506A: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM y 100 μM. En todas las pruebas se usó DMSO (vehículo del FC12-506A) como control negativo. La adquisición de las imágenes se realizó siempre a una frecuencia de 50 Hz y las células se observaron con un objetivo de 10X. En cada experimento se analizaron al menos 200 células. $n > 3$. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Como se observa en la **Figura 21**, la EZA disminuye todos los valores de movilidad de forma dosis dependiente en espermatozoides capacitados de humano a partir de la concentración más baja utilizada (10 nM) (**Tabla suplementaria 1**). Por otro lado, en los espermatozoides capacitados de ratón solamente hubo una disminución significativa de cinco parámetros de movilidad con 100 μ M (**Figura 21 B-F**), la mayor concentración utilizada de EZA (**Tabla suplementaria 2**). Además del inhibidor general para CAs, en los ensayos de movilidad también utilizamos dos de los inhibidores que se usaron anteriormente en las pruebas para medir el nivel de actividad catalítica de las CAs: el inhibidor impermeable FC5-207A y el inhibidor permeable FC12-506A. Inesperadamente, el FC5-207A (**Figura 22**) en espermatozoides capacitados de humano es capaz de disminuir e incrementar significativamente (dependiendo de la concentración usada) los valores de los ocho parámetros de movilidad (**Tabla suplementaria 3**), y con respecto a los espermatozoides capacitados de ratón, el FC5-207A disminuyó algunos parámetros de movilidad solamente a bajas concentraciones (i. e., 1 y/o 10 nM) (**Tabla suplementaria 4**). Finalmente, el inhibidor permeable FC12-506A (**Figura 23**) también disminuye e incrementa significativamente algunos parámetros de movilidad tanto en espermatozoides capacitados de humano (**Tabla suplementaria 5**), como en los espermatozoides capacitados de ratón (**Tabla suplementaria 6**), dependiendo de la concentración usada. Debido a las inconsistencias obtenidas en las pruebas de movilidad usando los inhibidores FC5-207A y FC12-506A, y considerando que entre los inhibidores utilizados en este trabajo, la EZA fue el inhibidor más potente, para cumplir los siguientes objetivos de este trabajo decidimos utilizar a partir de este punto solamente el inhibidor general EZA.

La RA es otro de los eventos fisiológicos fundamentales previos a la fecundación en los espermatozoides. Considerando esto, y que además al menos una de las isoformas de CAs (i. e., CAII) se encontró específicamente en la región acrosomal de los espermatozoides de humano y ratón, el siguiente paso de este proyecto fue investigar si las CAs también están involucradas en la regulación de este proceso en espermatozoides capacitados de ambas especies. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en un trabajo relativamente reciente (Zoppino *et al.*, 2012), decidimos medir la RA en los espermatozoides de ambas especies usando la técnica de citometría de flujo. Las principales ventajas de la citometría de flujo son: 1) el gran número de eventos (células) que se pueden analizar en pocos segundos, y 2) que las células se encuentran vivas mientras se analiza el estado del acrosoma, lo que significa que se puede medir la cinética del proceso de la RA sin tomar en cuenta a las células muertas. Antes de cada experimento siempre seleccionamos únicamente a la población de células útiles, es decir, la población de espermatozoides vivos y con tamaño y forma adecuados (**ver Figura suplementaria 1**). Usando espermatozoides de humano, primero determinamos la concentración adecuada que usaríamos

de cada reactivo en los experimentos posteriores. En la **Figura suplementaria 3** se muestra la curva dosis respuesta que se obtuvo con yoduro de propidio (PI); debido a que este fluoróforo ingresa solamente a las células cuya membrana plasmática se encuentra dañada y posteriormente se une al ADN, el PI se usó en los ensayos de la RA para identificar a las células muertas y así eliminarlas del posterior análisis. De las concentraciones usadas en un intervalo de 25 a 200 nM, 100 nM fue la concentración mínima con la que se tiñeron adecuadamente los espermatozoides, por lo que se utilizó en todos los experimentos posteriores. Para evaluar la RA, a la par obtuvimos una curva dosis respuesta de FITC-PSA (**Figura suplementaria 4**); este fluoróforo es un isotiocianato de fluoresceína (FITC) que se encuentra unido a una aglutinina de *Pisum sativum* (PSA; lectina de chícharo). Las lectinas de esta especie tienen una alta afinidad por residuos de glucosa y manosa, los cuales se exponen durante el proceso de la RA, por lo que sólo los acrosomas de las células reaccionadas fluorescen. Inicialmente obtuvimos una curva dosis respuesta de FITC-PSA en espermatozoides de humano gracias a la cual identificamos concentraciones en un intervalo de 2.5 a 50 µg/mL que nos servirían posteriormente para llevar a cabo los ensayos; entre tales concentraciones elegimos 5 µg/mL, lo cual es consistente con la concentración de FITC-PSA usada por Zoppino *et al.*, 2012 para llevar a cabo los experimentos de este tipo. Como inductor fisiológico de la RA en espermatozoides capacitados de humano usamos progesterona (Pg) 10 µM, y como control positivo ionomicina (Iono) 10 µM. La Iono es un ionóforo de Ca^{2+} producido por la bacteria *Streptomyces conglobatus*. Al poner a este compuesto en contacto con los espermatozoides, en estos se produce un ingreso masivo de Ca^{2+} , y debido a que la RA depende en gran medida del Ca^{2+} extracelular, entonces se obtiene un nivel importante de células reaccionadas (i. e., el máximo nivel de RA que se puede obtener) en la población total analizada. Por otro lado, como se describió en el apartado de **Introducción**, la progesterona es una hormona que se secreta por las células de la granulosa que rodean al óvulo y se asume que induce la RA en condiciones naturales debido a que lo hace *in vitro*. La ZP no se utilizó como inductor de la RA en estos experimentos, ya que aunque también induce la RA en los espermatozoides de humano, como se mencionó previamente es muy difícil obtener suficientes óvulos para purificar la cantidad necesaria de ZP para realizar estos experimentos.

Además de los inductores de la RA, utilizamos el inhibidor general de CAs EZA a una concentración de 30 µM. Los espermatozoides se incubaron con la EZA durante la capacitación (5 horas) o después de la capacitación (15 minutos) con la finalidad de determinar si las CAs participan en la RA desde que se lleva a cabo la capacitación o sólo durante la RA, respectivamente. En la **Figura suplementaria 5** se muestran los resultados de un experimento representativo de medición de la RA cada 10 minutos durante 30 minutos, mediante citometría de flujo. En el lado izquierdo de cada panel se

encuentra la gráfica de puntos de cada condición, de la cual se seleccionan únicamente las células que son positivas para FITC-PSA (+FITC) y negativas para PI (-PI). Por otro lado, en el extremo derecho de cada panel se encuentra la respectiva distribución de fluorescencia de FITC para las células +FITC/-PI. En todos los experimentos se determinó el porcentaje de células +FITC/-PI de los 20,000 eventos totales por condición. En la **Figura suplementaria 6** se observan los porcentajes promedio de la RA inducida por Pg en células preincubadas con EZA. En esta imagen se aprecia que en las tres condiciones probadas (Pg, EZA 15 min + Pg o EZA 5 h + Pg) hay una diferencia significativa a partir de los 10 minutos en el número de células reaccionadas con Pg (barras azules) *versus* el control con Pg tiempo cero. Sin embargo, en ninguno de los casos se encontró diferencia significativa alguna al comparar cada condición con Pg *versus* su respectivo control negativo de tiempo (barras grises). Los valores numéricos de estos resultados se muestran en la **Tabla suplementaria 7**. Como control positivo de estas pruebas se indujo la RA con Iono en espermatozoides capacitados de humano, y en la **Figura suplementaria 7** se muestran los resultados de estos experimentos. En las tres condiciones probadas hay diferencias significativas en el número de células reaccionadas con Iono (barras rojas) a partir de los 10 minutos *versus* el control de Iono tiempo cero. Además, en todos los casos también se aprecian diferencias significativas al comparar cada condición con Iono *versus* su respectivo control de tiempo (barras grises). Los valores numéricos de estos resultados se muestran en la **Tabla suplementaria 8**. Es importante mencionar que los niveles de RA obtenidos con Iono en estos experimentos son consistentes con los obtenidos en estudios previos realizados también mediante citometría de flujo (Zoppino *et al.*, 2012) y con estudios en los que se tiñen con FITC-PSA a las células previamente fijadas y permeabilizadas (José *et al.*, 2010). Los resultados con Iono confirman que la RA en espermatozoides de humano se puede registrar mediante citometría de flujo, pero solamente con inductores potentes como los ionóforos. Desafortunadamente los resultados obtenidos con Pg no son consistentes con los reportes previos en los que se usó el método de tinción con FITC-PSA en células fijadas y permeabilizadas con metanol (Bonaccorsi *et al.*, 1998; Calogero 1999). Interesantemente, en todos los experimentos de las **Figuras suplementarias 6 y 7** se observa un aparente incremento en los porcentajes de RA a lo largo del tiempo también en las células que nunca estuvieron expuestas a un inductor de la RA. Algunas hipótesis que podrían explicar este fenómeno se mencionan en el apartado de **Discusión** de este documento. También se realizaron pruebas para calcular mediante citometría de flujo la RA en espermatozoides de ratón utilizando FITC-PNA (Aglutinina de maní acoplada a isotiocianato de fluoresceína), sin embargo, no logramos establecer las condiciones óptimas para realizar estos experimentos (datos no mostrados). Por todos estos motivos, para evaluar la posible participación de las CAs en la RA de espermatozoides de humano y de ratón, decidimos utilizar las

técnicas convencionales para medir la RA en espermatozoides capacitados y fijados de ambas especies: la tinción con FITC-PSA para espermatozoides de humano y la tinción con Azul de Coomassie para espermatozoides de ratón (**ver Materiales y Métodos, apartados 6.6.1 y 6.6.2**). Ambas técnicas están plenamente validadas y se siguen utilizando para medir los niveles de RA en las dos especies (José *et al.*, 2010; Wertheimer *et al.*, 2013). Como en los ensayos de citometría de flujo, en estas pruebas las células capacitadas de humano y de ratón se preincubaron con EZA durante 15 minutos o 5 horas y posteriormente la RA se indujo con Pg o ZP. La ZP se utilizó para inducir la RA en los espermatozoides de ratón debido a que, además de ser un inductor cuyos efectos se han caracterizado bien en esta especie, se puede obtener fácilmente la cantidad necesaria de óvulos para purificar suficiente ZP para realizar estos experimentos. Por otro lado, no se utilizó Pg para inducir la RA en los espermatozoides de ratón (como se hizo en los de humano) debido a que en las poblaciones de células de esta especie, los niveles de RA inducidos por la Pg siempre son muy bajos, y además, se requieren altas concentraciones de la hormona para este fin (Romarowski *et al.*, 2016). En estas pruebas también se usó Iono como control positivo de la RA. Los valores obtenidos con Iono se muestran únicamente en las **Tablas 13 y 14**.

En la **Figura 24** se muestran los resultados obtenidos con espermatozoides capacitados de humano; en este caso, el nivel de RA sólo con Pg es consistente con los valores obtenidos en estudios previos (Calogero 1999) (**ver Tabla 13**). Interesantemente, la preincubación con la EZA durante 15 minutos potencia el nivel de RA inducido por Pg. Por otro lado, la preincubación con la EZA durante 5 horas (el equivalente al tiempo total de capacitación), no incrementa de manera significativa el nivel de la RA inducido por Pg, y de hecho, incrementa el nivel de RA espontánea.

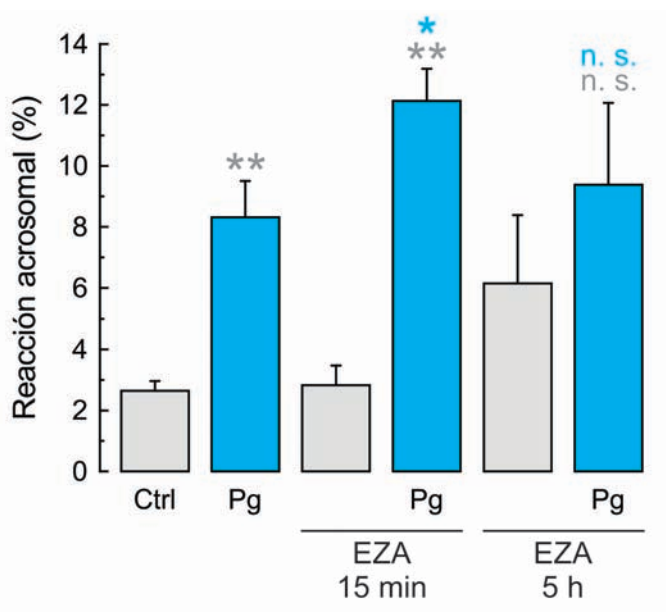


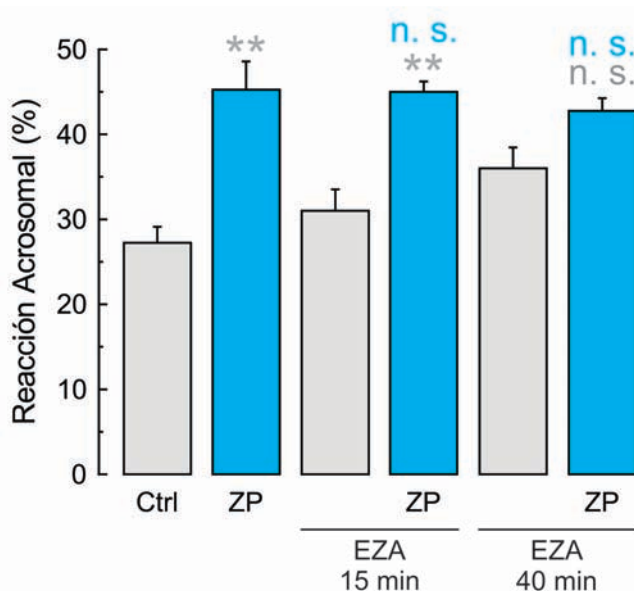
Figura 24. La EZA potencia la RA inducida por Pg en espermatozoides capacitados de humano. Células de humano se preincubaron después de la capacitación (15 minutos) o durante la capacitación (5 horas) con EZA 30 μ M. Posteriormente se usó progesterona 10 μ M para inducir la RA. Los espermatozoides se tiñeron con FITC-PSA y se evaluó el estado del acrosoma en al menos 200 células por condición. Los valores representan el promedio \pm S. E. M. $n > 3$. Los asteriscos grises indican diferencias significativas *versus* el control negativo de cada condición y los asteriscos azules indican diferencias significativas *versus* el control que sólo tiene Pg. $n > 3$. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s.; no significativo.

Condición	Control	+ EZA 30 μ M 15 min	+ EZA 30 μ M 5 h
DMSO	2.64 \pm 0.32 %	2.82 \pm 0.64 %	6.14 \pm 2.24 %
Progesterona	8.31 \pm 1.19 % **	12.12 \pm 1.05 % **	9.38 \pm 2.68 % n. s.
Ionicina	46.88 \pm 6.70 % ***	47.06 \pm 7.02 % ***	35.65 \pm 3.84 % ***

Tabla 13. Valores de RA inducida por Pg o Iono en espermatozoides capacitados de humano preincubados con EZA. Los valores representan el promedio \pm S. E. M. $n > 3$. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

Por otro lado, en los espermatozoides de ratón preincubados con EZA durante 15 minutos o 40 minutos no hubo ningún cambio en el nivel de RA *versus* el control con solamente ZP (**Figura 25 y Tabla 14**). Además, en las pruebas de 40 minutos también se incrementó significativamente el nivel de RA espontánea. En conjunto, los resultados de estos experimentos de RA en espermatozoides capacitados de humano y ratón confirman que las vías de señalización inducidas por ZP y por Pg son distintas, lo cual es consistente con estudios previos (Darszon *et al.*, 2011). Esto sugiere también que las CAs son elementos que participan en la regulación de la RA inducida por Pg, pero no en la inducida por ZP.

Figura 25. La EZA no tiene efecto en la RA inducida por ZP en espermatozoides capacitados de ratón. Células de ratón se preincubaron después de la capacitación (15 minutos) o durante la capacitación (40 minutos) con EZA 30 μ M. Posteriormente se usaron 5 ZPs/ μ L para inducir la RA. Los espermatozoides se tiñeron con Azul de Coomassie y se evaluó el estado del acrosoma en al menos 100 células por condición. Los valores representan el promedio \pm S. E. M. $n > 3$. Los asteriscos grises indican diferencias significativas *versus* el control negativo de cada condición y los asteriscos azules indican diferencias significativas *versus* el control que sólo tiene ZP. $n > 3$. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.



Condición	Control	+ EZA 30 μ M 15 min	+ EZA 30 μ M 40 min
DMSO/H ₂ O	27.25 \pm 1.88 %	31 \pm 2.51 %	36 \pm 2.44 %
ZP	45.25 \pm 3.32 % **	45 \pm 1.22 % **	42.75 \pm 1.49 % n. s.
Ionicina	69.5 \pm 2.10 % ***	72.5 \pm 2.39 % ***	69.75 \pm 2.28 % ***

Tabla 14. Valores de RA inducida por ZP o Iono en espermatozoides capacitados de ratón preincubados con EZA. Los valores representan el promedio \pm S. E. M. n > 3. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

Debido a que en otros tipos celulares el pH_i es uno de los factores en los cuales se ve reflejada la actividad catalítica de las CAs, en este trabajo decidimos averiguar si las CAs también modulan los cambios de pH_i en los espermatozoides capacitados de mamífero. Los resultados de estas pruebas se validaron usando citometría de flujo. Primero decidimos establecer las concentraciones adecuadas de reactivos a utilizar en estos experimentos. Como marcador de viabilidad utilizamos el colorante Hoechst, el cual al igual que el PI usado en los ensayos de RA, se une al ADN de las células que están muertas y que por lo tanto tienen la membrana plasmática dañada. En la **Figura suplementaria 8** se muestra la curva dosis respuesta de Hoechst, gracias a la cual determinamos que la concentración mínima necesaria para teñir a las células es de 100 ng/ μ L. Como indicador de los cambios de pH_i utilizamos SNARF-5F AM; este es un fluoróforo que presenta un cambio significativo de emisión que depende del pH, ya que la emisión se desplaza de la región amarillo-naranja (540-580 nm) a la región roja (620-640 nm) dependiendo de si el fluoróforo se encuentra más o menos protonado, respectivamente. Además, el SNARF-5F AM tiene un grupo químico acetoximetiléster (AM) que lo vuelve permeable, por lo que puede ingresar al citoplasma de las células y permanecer ahí gracias a la posterior acción de las esterasas intracelulares que escinden el grupo AM. En la **Figura suplementaria 9** se muestran las curvas dosis respuesta del SNARF-5F AM. Para calcular el tiempo y concentración óptimos de cargado previos al experimento, poblaciones de espermatozoides capacitados de humano se incubaron con el SNARF-5F AM en un intervalo de concentraciones desde 1 μ M hasta 30 μ M y en tiempos desde 30 minutos hasta 1.5 horas. Considerando todos los valores obtenidos, determinamos que la concentración de 20 μ M y el tiempo de 1.5 horas son los mejores para cargar a las células. Ambos valores son consistentes con los usados previamente en nuestro laboratorio para cargar a los espermatozoides de humano con este mismo fluoróforo para medir los cambios de pH_i en un espectrofluorómetro convencional. Como activador de las CAs utilizamos NaHCO₃ y como control positivo de alcalinización intracelular utilizamos la base débil NH₄Cl, cuyas curvas dosis respuesta en espermatozoides capacitados de humano se presentan en las **Figuras suplementarias 10 y 11**, respectivamente. Para determinar las concentraciones óptimas a

utilizar de estos compuestos, en ambos casos se calculó el valor de la media geométrica para cada gaussiana, gracias a lo cual podemos saber si hay un cambio en el pH_i de la población de células capacitadas, incluso si visualmente tal cambio no es evidente (como en la curva dosis respuesta del NaHCO_3). Basándonos en estos resultados concluimos que las concentraciones óptimas de NaHCO_3 y NH_4Cl son 25 mM y 20 mM, respectivamente. Después, elaboramos los experimentos correspondientes para averiguar si las CAs están involucradas en los cambios de pH_i ocasionados por el NaHCO_3 , para lo cual preincubamos a los espermatozoides no capacitados o capacitados de humano con la EZA durante 15 minutos o 5 horas, siguiendo el razonamiento descrito previamente en los experimentos de medición de la RA. Los resultados de los seis experimentos realizados se muestran en la **Tabla suplementaria 9**. En algunas de estas pruebas obtuvimos resultados inesperados, ya que el NaHCO_3 y/o el NH_4Cl (control positivo) ocasionaron una acidificación intracelular y no una alcalinización. En la **Tabla suplementaria 9** se señalan los casos en los que sucedió esto. Esta variabilidad ocasionó que nos fuera imposible obtener una conclusión a partir de estos experimentos, por lo que desafortunadamente aún no podemos afirmar si las CAs participan en la regulación del pH_i en los espermatozoides capacitados de humano.

8. Discusión

Las anhidrasas carbónicas (CAs) son una amplia familia de metaloenzimas presentes en las células de todos los seres vivos y son responsables de catalizar la reacción: $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ (Supuran 2008b). Esta reacción ocurre de forma tan veloz, que de hecho las CAs pertenecen al grupo de enzimas más rápidas que se conocen hasta ahora. La actividad catalítica de las CAs es crucial para que se lleven a cabo varios procesos fisiológicos y patológicos, como la respiración y el cáncer, respectivamente (Frost and McKenna 2014). Por este motivo, en los últimos años ha crecido de manera importante el interés por estudiar con mayor detalle cómo las CAs participan en la fisiología de distintos tipos celulares, y al mismo tiempo desarrollar inhibidores para combatir las enfermedades en las que participan. A pesar de estar presentes en todos los seres vivos, hasta ahora son escasos los estudios en los que se aborde el papel que las CAs tienen en la fisiología de células tan importantes como los espermatozoides de mamífero, en los cuales ya se ha demostrado plenamente que la vía de señalización de la adenilato ciclasa soluble (ACs) y la regulación del pH_i juegan un papel muy importante (Pablo E Visconti *et al.*, 2011). Por tales motivos, en este trabajo nos dimos a la tarea de explorar con mayor detalle cómo es que las CAs participan en la fisiología de los espermatozoides de humano y de ratón, específicamente. Hasta ahora el ratón se ha utilizado como un modelo experimental muy importante para estudiar la fisiología celular en los mamíferos, y regularmente los resultados experimentales obtenidos se extrapolan a la fisiología humana, sin embargo, desde hace algunos años se ha demostrado que al menos a nivel molecular, en los espermatozoides de ambas especies hay diferencias importantes (Darszon *et al.*, 2011). Debido a esto, en este proyecto siempre que fue posible utilizamos gametos masculinos de ambas especies para llevar a cabo los experimentos planteados y después comparar los resultados. Inicialmente exploramos mediante ensayos tipo *western-blot* e inmunocitoquímicas la presencia de algunas isoformas de CAs cuya presencia se había reportado anteriormente en alguna de las dos especies, y también exploramos por primera vez la presencia de otras isoformas. En resumen, los resultados obtenidos demostraron la presencia de la CAII en los espermatozoides de humano y de ratón, y de la CAXIII en los espermatozoides de humano. Las CAII y CAXIII son isoformas que se encuentran siempre en el citoplasma de las células (Truppo *et al.*, 2012), lo que sugiere que la actividad de las CAs participa de manera importante en la regulación de diversos procesos fisiológicos intracelulares. Aunque también se utilizó un anticuerpo primario anti-CAI, los resultados obtenidos no fueron concluyentes debido a que no logramos establecer las condiciones experimentales adecuadas para realizar las pruebas. Sin embargo, la eficacia del anticuerpo anti-CAI utilizado se demostró previamente por el fabricante en distintos tejidos de humano, por lo que este anticuerpo sí es capaz de reconocer a la CAI. Posiblemente el anticuerpo no

reconoció a la CAI en los espermatozoides completos porque la cantidad de enzima presente en cada una de estas células es muy poca. Esta hipótesis tendría sentido si se considera el trabajo de Wandernoth *et al.*, 2015, en el cual determinaron que las isoformas CAII y CAIV son responsables de aproximadamente el 90% de actividad global de las CAs en los espermatozoides de ratón, por lo que la cantidad de ambas enzimas debe ser predominante en la cantidad total de CAs en estas células. Por otro lado, la expresión de la CAIV demostró ser diferencial en ambas especies, ya que se encontró en los espermatozoides de ratón pero no en los espermatozoides de humano. El caso de la CAIV es muy interesante, porque esta isoforma siempre se encuentra anclada a la membrana plasmática de las células mediante un GPI (i. e., glicosilfosfatidilinositol). Se demostró previamente que la CAIV se une a estas células sólo mientras se desplazan a lo largo del epidídimo y no antes (Ekstedt, Holm and Ridderstråle 2004; Wandernoth *et al.*, 2010), por lo que posiblemente la adquisición de esta CA es necesaria para que los espermatozoides sobrevivan durante su estancia dentro del tracto reproductivo femenino. Dado que en el tracto hay un equilibrio entre el CO_2 y el HCO_3^- (Lishko *et al.*, 2012), la actividad de la CAIV podría transformar tales sustratos e ingresarlos a la célula para finalmente usar el HCO_3^- en cualquiera de los procesos mencionados anteriormente. Al menos en los proteomas testiculares de ratón que se consultaron durante el desarrollo de este trabajo (UniPort, Pride y Protein Atlas), no se encontraron evidencias que sugieran la presencia de otras CAs extracelulares en los espermatozoides de ratón, por lo que en principio toda la actividad extracelular de las CAs recaería en la CAIV, que es la segunda CA más rápida de la familia α sólo por detrás de la CAII; la CAIV tiene una k_{cat} de $1.1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, mientras que la k_{cat} de la CAII es de $1.4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Supuran 2008a). Por otro lado, en el proteoma testicular de humano se corroboró que no hay ninguna isoforma de CA extracelular. Todo lo mencionado anteriormente sugiere que es distinta la composición del tracto reproductivo femenino en el que se desplazan los espermatozoides de ambas especies antes de la fecundación, lo que sugiere diferencias en la fisiología de los gametos masculinos de humano y de ratón.

Después de estos experimentos, llevamos a cabo mediciones de la actividad catalítica global de las CAs en espermatozoides de ratón. En un estudio previo esto se había explorado, pero usando solamente espermatozoides no capacitados de esta especie (Wandernoth *et al.*, 2010). Por tal motivo, en este trabajo decidimos ir un paso más allá y enfocarnos en las células capacitadas debido a su clara importancia fisiológica (Darszon *et al.*, 2011). Interesantemente, descubrimos que la magnitud de la actividad de las CAs es similar en las células no capacitadas y las capacitadas, lo que sugiere que la actividad catalítica de las CAs se requiere en los espermatozoides durante todo el tiempo posterior a la eyaculación. Esto indica hasta este punto que la participación de las CAs podría ser crucial, como se mencionó antes, en la

vía de señalización de la ACs para finalmente influenciar la movilidad de los gametos masculinos, y/o podría participar en la regulación del pH_i. En experimentos posteriores probamos que la actividad de las CAs se redujo de forma dosis dependiente por el inhibidor general de CAs etoxizolamida (EZA) y por otras seis sulfonamidas permeables o no permeables recientemente sintetizadas (D'Ambrosio *et al.*, 2012; Supuran 2008b), lo que al menos para la EZA, es consistente con los resultados obtenidos previamente en otros tipos celulares (Stridh *et al.*, 2012). De estos siete compuestos utilizados, la EZA fue el inhibidor más potente porque disminuyó la actividad de las CAs de los espermatozoides capacitados de ratón a partir de 100 nM. El hecho de que la EZA sea el compuesto más potente de entre todos los usados no es sorprendente si se considera que debido a su estructura química, este inhibidor de CAs es el más lipofílico de todos los que se han creado hasta ahora (comunicación personal con el Dr. Claudiu Supuran), lo que significa que además de inhibir a las CAs extracelulares, la EZA puede ingresar a las células con mucha mayor facilidad que cualquier otro compuesto para así inhibir la actividad de todas las CAs presentes.

Debido a que mediante las técnicas de bioquímica utilizadas en este trabajo logramos detectar en los espermatozoides de ambas especies a la isoforma CAII, y gracias a que contábamos con la línea de ratones *knock-out* CAII (CAII^{-/-}), después exploramos la contribución de esta isoforma en la actividad global de las CAs en los espermatozoides capacitados de ratón. Descubrimos que la CAII es responsable del 50% de la actividad global de las CAs en estas células, resultado que es consistente con un estudio que se publicó durante el desarrollo de este escrito (Wandernoth *et al.*, 2015). En dicho trabajo se estimó que la actividad global de las CAs en los espermatozoides *knock-out* individuales CAII^{-/-} y CAIV^{-/-} fue de 35% y 68%, respectivamente, lo que indica en principio que estas dos isoformas son responsables de casi el 100% de la actividad global de las CAs en estas células. Por otro lado, el porcentaje de actividad global en los espermatozoides de los ratones doble *knock-out* CAII^{-/-} CAIV^{-/-} fue de 13%, lo que indica en este caso (a diferencia de los *knock-out* individuales) que ambas CAs son responsables de casi el 90% de la actividad global en los espermatozoides y que, por lo tanto, otras isoformas son responsables del 10% restante (posiblemente CAXIII, por ejemplo). Estos últimos resultados demuestran que en los espermatozoides de los ratones *knock-out* individuales también hay compensación en la actividad de las CAs (i. e., CAII compensa un poco la actividad de CAIV cuando esta se encuentra ausente y viceversa). Es muy importante recalcar que a diferencia de este trabajo, en el cual utilizamos células capacitadas, en todos los experimentos de la referencia mencionada se utilizaron espermatozoides no capacitados (Wandernoth *et al.*, 2015), por lo que los resultados de ambos trabajos demuestran que se conserva el nivel de actividad de las CAs en ambos estados fisiológicos incluso ante la ausencia de CAII.

Desafortunadamente, las pruebas para explorar la actividad global de las CAs en espermatozoides de humano no se pudieron llevar a cabo en este estudio; sólo se pudieron realizar algunos experimentos preliminares cuyos resultados sugieren que también hay actividad catalítica de las CAs en estas células y que su magnitud depende de la cantidad de CAs presentes durante las pruebas hechas (datos no mostrados). Evaluar la contribución de cada isoforma de CA a la actividad global en los espermatozoides de humano sería más difícil de lograr que en espermatozoides de ratón, debido a que la única herramienta disponible en este caso es el uso de inhibidores de las CAs. Las sulfonamidas (los inhibidores más usados para CAs) son compuestos que se unen sólo a los dieciséis miembros de la subfamilia α , pero hasta ahora sigue siendo muy difícil sintetizar inhibidores específicos para cada isoforma, debido a que la región catalítica de las CAs con la que interactúan los inhibidores es muy parecida en las dieciséis isoformas.

En este trabajo también se investigó si las CAs contribuyen a regular la movilidad en los espermatozoides capacitados de ambas especies. Los resultados de estos experimentos son muy interesantes porque en el caso de los espermatozoides capacitados de ratón, a pesar de que previamente confirmamos mediante espectrometría de masas que había actividad catalítica de las CAs, la movilidad es pobremente sensible a la EZA. Esto significa que a pesar de que las CAs se encuentran activas, no participan en el mantenimiento de la movilidad, por lo que la pregunta obvia es: ¿Si no participan en la movilidad, en qué otro proceso fisiológico están involucradas? (ver más adelante). En contraste, los parámetros de movilidad de los espermatozoides de humano disminuyeron significativamente por acción de la EZA desde concentraciones en el orden de nanomolar, lo que significa que en los espermatozoides de esta especie es muy importante la participación de las CAs al menos en este proceso. En los experimentos de movilidad también se probaron dos de los inhibidores recientemente sintetizados para CAs (D'Ambrosio *et al.*, 2012; Supuran 2008b): un compuesto impermeable y otro permeable. Como se mencionó en el apartado de **Resultados**, no obtuvimos resultados concluyentes con estos compuestos, porque al usarlos a diferentes concentraciones, incrementaban o decrementaban los parámetros de movilidad. Sin embargo, al usarlos previamente en los experimentos de espectrometría de masas, sí ocasionaron una disminución dosis dependiente de la actividad catalítica de las CAs. La única diferencia en ambos tipos de experimentos es que, en el espectrómetro de masas, las células se encontraban siempre en agitación constante durante el experimento, mientras que esto no ocurrió en las pruebas de movilidad, en las cuales los volúmenes con células se resuspendieron mediante pipeteo. Tomando en cuenta esto, posiblemente los inhibidores no se solubilizaron adecuadamente en la pruebas de movilidad, lo que provocó artefactos debido a la formación de agregados. Además, es importante mencionar que este fue el primer estudio en el que se utilizaron dichos inhibidores en presencia de células, ya que en los reportes

previos se usaron siempre con las CAs purificadas (D'Ambrosio *et al.*, 2012; Supuran 2008b), por lo que en realidad no se comprobó previamente la permeabilidad del compuesto que debía ingresar a las células.

Otro proceso fisiológico en el que estudiamos la participación de las CAs fue la RA. Como se explicó antes, preincubamos a los gametos con EZA durante 15 minutos y posteriormente se indujo la RA con ZP o Pg en los espermatozoides capacitados de ratón y de humano, respectivamente. En el caso de los espermatozoides de ratón, la preincubación con EZA no modificó los niveles de la RA en comparación con el control, sin embargo, los espermatozoides de humano presentaron un incremento significativo de la RA en comparación con el control. Estas diferencias se deben en primer lugar, a que como ya se ha demostrado previamente (Darszon *et al.*, 2011), las vías de señalización intracelular de ZP y Pg no son las mismas, lo que en principio explica por qué la participación de las CAs parece estar involucrada en la RA inducida por Pg y no por ZP. Respecto a la Pg, durante varios años se buscó en los espermatozoides de humano a su receptor, y hasta hace poco tiempo se descubrió su identidad (Lishko, Botchkina and Kirichok 2011; Strünker *et al.*, 2011). Se trata de un canal de Ca^{2+} llamado CatSper (canal catiónico del espermatozoide) conformado por cuatro subunidades α que constituyen al canal *per se*, más tres subunidades auxiliares: β , γ y δ . Como lo indica su nombre, este canal se expresa exclusivamente en los espermatozoides, y su participación es indispensable para que se lleve a cabo el proceso de hiperactivación y por lo tanto, la fecundación también (Lishko *et al.*, 2012). Este canal se puede activar además por una alcalinización intracelular, por lo que posiblemente la RA inducida por Pg en los espermatozoides capacitados de humano se incrementa aún más en presencia de EZA, debido a que cesa la actividad de las CAs y, por lo tanto, posiblemente se acumula HCO_3^- en el citoplasma de las células, incrementando así el pH_i . Esta activación de CatSper en teoría permitiría que ingrese más Ca^{2+} a las células, causando que más espermatozoides reaccionen, sin embargo hasta ahora no es clara la participación de CatSper en la RA.

Posteriormente, investigamos si las CAs participan en la modulación del pH_i en los espermatozoides de mamífero. Estandarizamos la técnica para poder detectar estos cambios en espermatozoides capacitados de humano mediante citometría de flujo, sin embargo, los cambios ocasionados por el HCO_3^- fueron muy pequeños, incluso a relativamente altas concentraciones. Debido también a que la variabilidad de las respuestas entre las distintas muestras fue alta, es muy difícil obtener una conclusión con los resultados de estos experimentos. Es un hecho que el HCO_3^- es fundamental en la fisiología de los espermatozoides (Pablo E Visconti *et al.*, 2011), sin embargo, los cambios intracelulares de este ión probablemente son muy sutiles una vez que el espermatozoide está capacitado,

por lo que tal vez por este motivo no se pudieron detectar usando esta técnica. Por lo tanto, para poder estudiar la posible participación de las CAs en la modulación del pH_i en los espermatozoides, probablemente sea necesario llevar a cabo estudios en célula única, en vez de utilizar poblaciones de espermatozoides como en este trabajo.

Tomando en cuenta todo lo mencionado anteriormente, se puede concluir que las CAs participan al menos en la movilidad y en la RA en los espermatozoides capacitados de humano. En contraste, al menos en nuestros experimentos las CAs parecen no estar involucradas en ninguno de estos dos procesos en los espermatozoides capacitados de ratón. Sin embargo, comprobamos previamente que las CAs se encuentran activas en estas células, por lo tanto: ¿En qué otro proceso fisiológico podrían estar involucradas las CAs en estas células? Previamente se analizó con anticuerpos primarios el patrón de expresión de la CAII y la CAIV en los espermatozoides, los testículos y los epidídimos de ratones prepúberes (3 semanas) y púberes (5 semanas) (Wandernoth *et al.*, 2015). En ese estudio se demostró que en los ratones machos, la pubertad provoca que se comience a expresar (y no antes) la CAII a lo largo de los tejidos mencionados. Por otro lado, la CAIV se comienza a expresar también a partir de la pubertad, pero sólo en el caput y en la cauda del epidídimo, lo que es consistente con su localización en los ratones adultos. Si la CAII se comienza a expresar en los espermatozoides y testículos a partir de la pubertad, entonces estos resultados sugieren que al menos la CAII podría cumplir un papel importante durante la maduración de los espermatozoides, ayudando a controlar el pH_i y las concentraciones de HCO_3^- dentro y fuera de las células, factores que son cruciales durante y después de la maduración de los gametos.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo indican que las CAs son muy importantes en la fisiología de los espermatozoides capacitados de humano y de ratón, pero participan en la regulación de distintos procesos en ambas especies. Tomando en cuenta también la información obtenida a partir de estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio y en otros, en el modelo mostrado en la **Figura 26** proponemos cómo las CAs encajan en la vía de señalización de la capacitación/hiperactivación en el espermatozoide de mamífero.

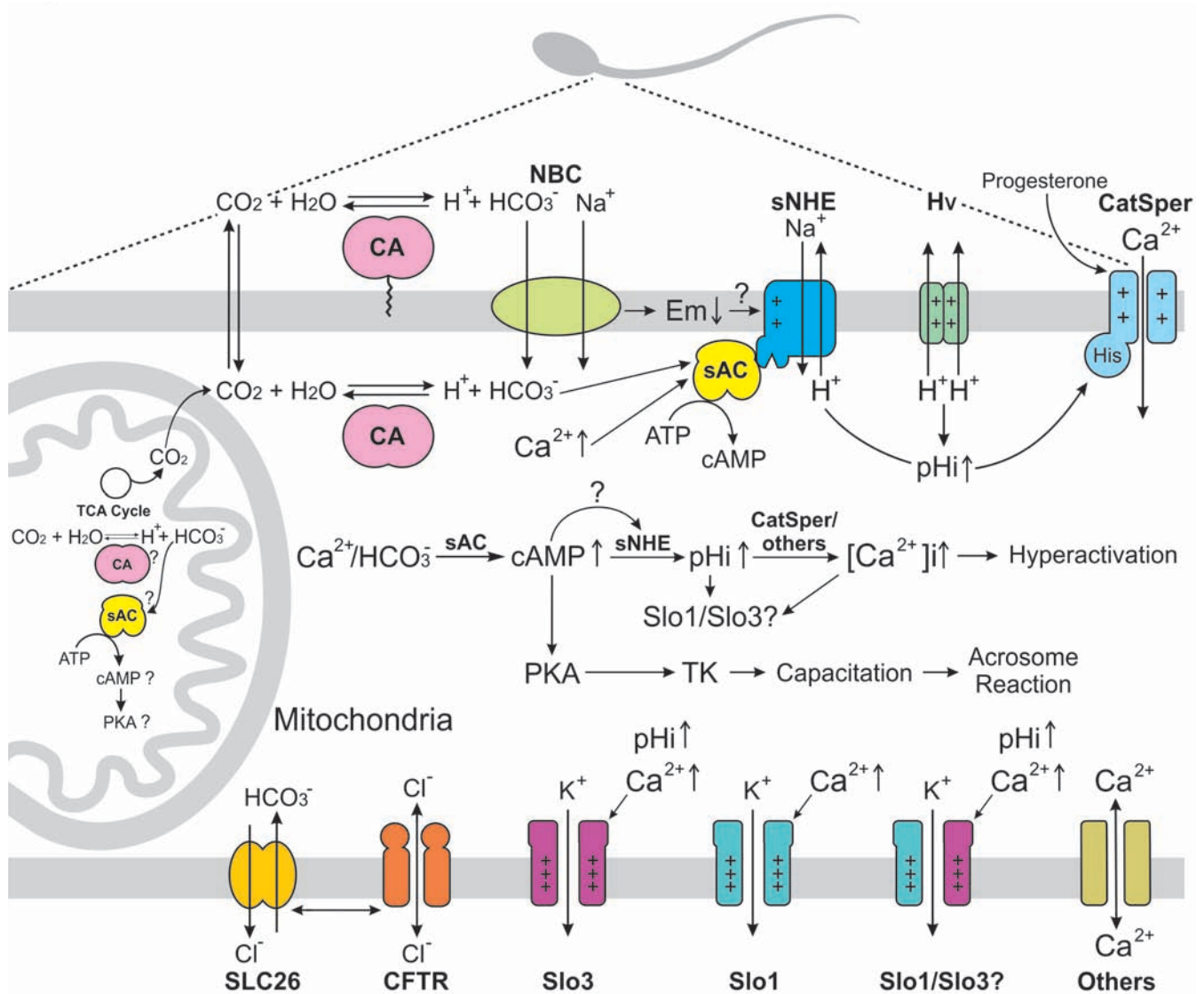


Figura 26. Modelo de la regulación del pH_i en espermatozoides de mamífero durante la capacitación/hiperactivación.

El par $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ se encuentra en equilibrio dentro del tracto genital femenino gracias a la presencia de CAs asociadas a la membrana plasmática. El ingreso de HCO_3^- al espermatozoide es mediado por cotransportadores $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) e intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (SLC26). Probablemente las CAs citoplásmicas también contribuyen al incremento de HCO_3^- por la conversión del CO_2 citosólico. Específicamente, las isoformas SLC26A3 y A6 parecen tener una interacción física con CFTR, el cual podría permear HCO_3^- además de Cl^- . Además, el ingreso de HCO_3^- al espermatozoide ocasiona una hiperpolarización dependiente de la $[\text{Na}^+]_e$ vía NBC. El HCO_3^- activa junto con el Ca^{2+} una adenilato ciclasa soluble (sAC), lo que ocasiona un incremento de cAMP, el cual activa a la PKA y/o también se podría unir al dominio de unión a nucleótido cíclico del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE), lo que induce un incremento del pH_i en los espermatozoides de ratón. El sNHE también podría ser estimulado por la hiperpolarización que sucede durante la capacitación. A diferencia del ratón, un canal de H^+ dependiente de voltaje (Hv) podría estar involucrado en el incremento de pH_i en el espermatozoide de humano. En ambas especies el incremento de pH_i (entre otros factores) activa a un canal permeable a Ca^{2+} específico del espermatozoide, llamado CatSper, lo que media un incremento intracelular de Ca^{2+} esencial para la hiperactivación. Por otro lado, los canales de K^+ Slo3 y Slo1 (o su heterotetrámero) son activados por una alcalinización intracelular y/o Ca^{2+} , lo que contribuye a la hiperpolarización que sucede durante la capacitación. El CO_2 también se genera dentro de las mitocondrias a través del ciclo de Krebs, y podría servir como sustrato para CAs intracelulares o intramitocondriales. El HCO_3^- también podría activar sAC intramitocondriales, lo que a su vez iniciaría la fosforilación de proteínas. Tomado de Nishigaki *et al.*, 2014.

9. Conclusiones

- ✓ Las CAs II y XIII están presentes en los solubilizados totales de proteína de los espermatozoides de humano y de ratón. Por otro lado, la expresión de la CAIV es diferencial en ambas especies; esta isoforma está presente en los solubilizados totales de proteína de los espermatozoides de ratón, mientras que está ausente en los de humano.
- ✓ La CAXIII se encuentra exclusivamente a lo largo del flagelo de los espermatozoides de humano. Por otro lado, la CAII se encuentra a lo largo del flagelo tanto en los espermatozoides de humano como en los de ratón.
- ✓ Los espermatozoides capacitados de ratón presentan actividad catalítica de las CAs y su magnitud es similar a la presente en los espermatozoides no capacitados de la misma especie.
- ✓ La actividad catalítica de las CAs en los espermatozoides capacitados de ratón se puede inhibir de forma dosis dependiente por la EZA y por otras sulfonamidas. De todos los inhibidores de CAs utilizados en este estudio, la EZA fue el inhibidor más potente.
- ✓ La CAII es responsable de la mitad de la actividad catalítica global de las CAs en los espermatozoides capacitados de ratón, por lo que la otra mitad depende de otras isoformas.
- ✓ La actividad de las CAs cumple un papel fundamental en el mantenimiento de la movilidad en los espermatozoides capacitados de humano. Por otro lado, los espermatozoides capacitados de ratón dependen muy poco de la actividad de las CAs.
- ✓ Las CAs participan en la regulación de la RA inducida por progesterona en los espermatozoides capacitados de humano, sin embargo no participan en la regulación de la RA inducida por ZP en los espermatozoides capacitados de ratón.

10. Perspectivas

Los resultados de este estudio confirmaron que no siempre es posible extrapolar a la fisiología de los espermatozoides de humano, los resultados experimentales obtenidos utilizando espermatozoides de ratón, sin embargo, este modelo animal seguirá siendo en el futuro una herramienta biológica muy valiosa, porque estos organismos se pueden manipular para obtener información que sería imposible obtener usando células de humano (e. g., se pueden producir ratones *knock-out*). Por lo tanto, será necesario continuar investigando en ambas especies cuál es el papel que las CAs cumplen en los eventos descritos previamente. Dada la importancia que la actividad de las CAs demostró tener en la fisiología de los espermatozoides de humano y de ratón, en el futuro será necesario verificar si otras isoformas de CAs se encuentran en estas células y en cuáles regiones subcelulares. También será necesario investigar qué tanto contribuyen estas CAs a la fisiología de los espermatozoides de ambas especies y explorar si el efecto de las CAs en estas células se da a través de la vía de señalización de la ACs y/o la regulación del pH_i . Debido a que varias isoformas de CAs pueden formar metabolones, también será muy interesante investigar si las CAs interactúan física y/o funcionalmente con alguna de las entidades moleculares que ya se han descrito previamente en los espermatozoides de mamífero.

11. Material suplementario

Parámetro	DMSO	[EZA]				
		10 nM	100 nM	1 μM	10 μM	100 μM
VCL (μm/s)	98.65 ± 2.34	69.8 ± 1.97 ***	63.4 ± 1.9 ***	71.83 ± 1.78 ***	65.87 ± 1.86 ***	50.78 ± 1.58 ***
VSL (μm/s)	30.84 ± 1.03	21.33 ± 0.88 ***	17.67 ± 0.88 ***	18.75 ± 0.76 ***	17.32 ± 0.84 ***	10.55 ± 0.61 ***
VAP (μm/s)	49.67 ± 1.24	35.92 ± 1.15 ***	30.59 ± 1.08 ***	34.68 ± 1.02 ***	30.98 ± 1.04 ***	21.69 ± 0.84 ***
LIN (%)	29.51 ± 0.84	25.22 ± 0.88 ***	22.27 ± 0.87 ***	23.29 ± 0.76 ***	20.66 ± 0.76 ***	17.24 ± 0.75 ***
STR (%)	55.4 ± 1.15	46.63 ± 1.26 ***	43.77 ± 1.29 ***	46.2 ± 1.12 ***	41.71 ± 1.16 ***	40.09 ± 1.31 ***
WOB (%)	48.46 ± 0.76	45.22 ± 0.93 **	42.81 ± 0.91 ***	45.09 ± 0.8 **	41.13 ± 0.81 ***	37.21 ± 0.92 ***
ALH (μm)	2.52 ± 0.05	1.84 ± 0.04 ***	1.75 ± 0.04 ***	1.93 ± 0.04 ***	1.81 ± 0.04 ***	1.46 ± 0.04 ***
BCF (Hz)	10.03 ± 0.27	8.11 ± 0.28 ***	7.25 ± 0.28 ***	7.75 ± 0.24 ***	6.61 ± 0.24 ***	4.90 ± 0.23 ***

Tabla suplementaria 1. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de humano incubados con distintas concentraciones de EZA. Los valores representan el promedio ± S. E. M. n > 3. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Parámetro	DMSO	[EZA]				
		10 nM	100 nM	1 μM	10 μM	100 μM
VCL (μm/s)	140.19 ±	141.18 ±	146.06 ±	151.67 ±	145 ± 5.72	145.85 ± 6.3
	4.96	5.61	5.41	5.43	n. s.	n. s.
		n. s.	n. s.	n. s.		
VSL (μm/s)	66.63 ± 3.98	66 ± 4.48	71.36 ± 3.92	63.7 ± 3.42	59.7 ± 3.6	48.61 ± 3.25
		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	***
VAP (μm/s)	88.85 ± 4.11	89.8 ± 4.84	94.15 ± 4.03	91.08 ± 3.58	85.72 ± 3.77	75.81 ± 3.77
		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*
LIN (%)	40.53 ± 1.78	39.12 ± 1.93	41.51 ± 1.68	37.49 ± 1.55	36.58 ± 1.69	28.65 ± 1.39
		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	***
STR (%)	63.78 ± 2.14	63.75 ± 2.37	64.94 ± 2.01	59.71 ± 1.97	59.48 ± 2.13	56.33 ± 2.06
		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*
WOB (%)	55.9 ± 1.13	56.1 ± 1.25	59.54 ± 1.32	57.89 ± 1.18	56.8 ± 1.31	47.43 ± 1.3
		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	***
ALH (μm)	3.35 ± 0.11	3.31 ± 0.12	3.29 ± 0.11	3.55 ± 0.12	3.38 ± 0.12	3.52 ± 0.14
		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
BCF (Hz)	9.25 ± 0.43	9.16 ± 0.48	9.37 ± 0.44	9.92 ± 0.43	10.01 ± 0.62	8.23 ± 0.44
		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

Tabla suplementaria 2. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de ratón incubados con distintas concentraciones de EZA. Los valores representan el promedio ± S. E. M. n > 3. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

Parámetro	DMSO	[FC5-207A]					
		1 nM	10 nM	100 nM	1 μM	10 μM	100 μM
VCL (μm/s)	65.07 ± 1.41	75.05 ± 1.86 ***	51.51 ± 1.52 ***	82.45 ± 1.7 ***	72.69 ± 1.97 **	51.98 ± 1.16 ***	60.28 ± 1.76 *
VSL (μm/s)	14.45 ± 0.55	20.9 ± 0.77 ***	8.19 ± 0.49 ***	21.1 ± 0.66 ***	18.11 ± 0.78 ***	8.47 ± 0.43 ***	13.87 ± 0.64 n. s.
VAP (μm/s)	30.56 ± 0.78	36.45 ± 0.99 ***	21.7 ± 0.8 ***	40.51 ± 0.93 ***	34.77 ± 1.01 ***	20.75 ± 0.62 ***	28.43 ± 0.9 n. s.
LIN (%)	21.46 ± 0.62	25.51 ± 0.71 ***	14.75 ± 0.79 ***	24.96 ± 0.65 ***	22.15 ± 0.68 n. s.	14.68 ± 0.64 ***	21.78 ± 0.74 n. s.
STR (%)	44.16 ± 0.99	51.38 ± 1.1 ***	34.04 ± 1.35 ***	48.54 ± 0.94 **	45.64 ± 1.12 n. s.	35.9 ± 1.12 ***	45.1 ± 1.19 n. s.
WOB (%)	46.25 ± 0.6	47.5 ± 0.69 n. s.	40.82 ± 0.91 ***	48.79 ± 0.61 **	46.94 ± 0.69 n. s.	38.96 ± 0.75 ***	47.19 ± 0.77 n. s.
ALH (μm)	1.85 ± 0.03	2.04 ± 0.04 ***	1.58 ± 0.04 ***	2.2 ± 0.03 ***	2.03 ± 0.04 **	1.55 ± 0.02 ***	1.75 ± 0.04 n. s.
BCF (Hz)	6.76 ± 0.19	8.74 ± 0.27 ***	4.3 ± 0.2 ***	8.52 ± 0.23 ***	6.77 ± 0.23 n. s.	4.49 ± 0.18 ***	5.89 ± 0.23 **

Tabla suplementaria 3. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de humano incubados con distintas concentraciones de FC5-207A. Los valores representan el promedio ± S. E. M. n > 3. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, n.s; no significativo.

Parámetro	DMSO	[FC5-207A]					
		1 nM	10 nM	100 nM	1 μM	10 μM	100 μM
VCL (μm/s)	142.29 ± 4.51	139.27 ± 4.02 n. s.	124.16 ± 4.39 **	131.3 ± 4.66 n. s.	142.87 ± 5.44 n. s.	137.51 ± 4.57 n. s.	133.87 ± 4.02 n. s.
	58.25 ± 2.69	53.29 ± 2.35 n. s.	48.66 ± 2.59 *	54.93 ± 2.95 n. s.	56.5 ± 3.04 n. s.	57.41 ± 2.97 n. s.	53.3 ± 2.74 n. s.
VSL (μm/s)	81.89 ± 2.84	80.91 ± 2.58 n. s.	72.23 ± 2.78 *	78.2 ± 3.16 n. s.	83.61 ± 3.29 n. s.	81.26 ± 3.02 n. s.	79.47 ± 2.83 n. s.
	37.27 ± 1.29	35.27 ± 1.23 n. s.	35.53 ± 1.5 n. s.	37.98 ± 1.51 n. s.	37.9 ± 1.6 n. s.	38.42 ± 1.47 n. s.	36.87 ± 1.44 n. s.
LIN (%)	63.91 ± 1.69	58.88 ± 1.61 *	57.66 ± 1.95 *	61.92 ± 1.86 n. s.	62.95 ± 2 n. s.	62.57 ± 1.82 n. s.	59.47 ± 1.8 n. s.
	55.79 ± 0.99	56.53 ± 0.93 n. s.	56.95 ± 1.13 n. s.	58.21 ± 1.2 n. s.	58.58 ± 1.28 n. s.	58.33 ± 1.03 n. s.	57.76 ± 1.12 n. s.
WOB (%)	3.38 ± 0.1	3.35 ± 0.09 n. s.	3.05 ± 0.1 *	3.14 ± 0.1 n. s.	3.42 ± 0.12 n. s.	3.28 ± 0.1 n. s.	3.26 ± 0.09 n. s.
	9.41 ± 0.36	9.52 ± 0.36 n. s.	8.72 ± 0.4 n. s.	9.46 ± 0.43 n. s.	9.45 ± 0.47 n. s.	9.43 ± 0.38 n. s.	9 ± 0.38 n. s.
ALH (μm)	9.41 ± 0.36	9.52 ± 0.36 n. s.	8.72 ± 0.4 n. s.	9.46 ± 0.43 n. s.	9.45 ± 0.47 n. s.	9.43 ± 0.38 n. s.	9 ± 0.38 n. s.
	9.41 ± 0.36	9.52 ± 0.36 n. s.	8.72 ± 0.4 n. s.	9.46 ± 0.43 n. s.	9.45 ± 0.47 n. s.	9.43 ± 0.38 n. s.	9 ± 0.38 n. s.
BCF (Hz)	9.41 ± 0.36	9.52 ± 0.36 n. s.	8.72 ± 0.4 n. s.	9.46 ± 0.43 n. s.	9.45 ± 0.47 n. s.	9.43 ± 0.38 n. s.	9 ± 0.38 n. s.
	9.41 ± 0.36	9.52 ± 0.36 n. s.	8.72 ± 0.4 n. s.	9.46 ± 0.43 n. s.	9.45 ± 0.47 n. s.	9.43 ± 0.38 n. s.	9 ± 0.38 n. s.

Tabla suplementaria 4. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de ratón incubados con distintas concentraciones de FC5-207A. Los valores representan el promedio ± S. E. M. n > 3. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

Parámetro	DMSO	[FC12-506A]					
		1 nM	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	100 µM
VCL (µm/s)	95.53 ±	94.3 ± 2.51	103.61 ±	100.31 ±	106.92 ±	110.7 ±	85.15 ±
	1.99	n. s.	2.15 **	2.68 n. s.	2.46 ***	3.28 ***	1.92 ***
VSL (µm/s)	30.22 ±	29.31 ±	30.47 ±	28.35 ±	27.96 ±	34.33 ±	25.75 ±
	0.98	1.22 n. s.	0.97 n. s.	1.17 n. s.	0.94 n. s.	1.43 *	0.84 ***
VAP (µm/s)	49.17 ±	47.49 ±	53.56 ± 1.2	51.44 ±	53.33 ±	57.81 ±	43.81 ±
	1.15	1.42 n. s.	**	1.44 n. s.	1.25 *	1.89 ***	1.06 ***
LIN (%)	28.49 ±	27.61 ±	28.4 ±	26.93 ±	25.51 ±	29.31 ±	28.46 ±
	0.77	0.89 n. s.	0.74 *	0.86 n. s.	0.67 n. s.	1.04 n. s.	0.7 *
STR (%)	52.86 ±	53.01 ±	52.38 ±	49.98 ±	49.2 ±	54.64 ±	53.18 ±
	1.06	1.31 n. s.	1.04 n. s.	1.24 n. s.	1.04 *	1.44 n. s.	0.96 n. s.
WOB (%)	50.02 ±	48.54 ±	51.3 ± 0.64	50.91 ±	50.02 ±	49.93 ±	50.7 ±
	0.66	0.77 n. s.	n. s.	0.73 n. s.	0.6 n. s.	0.9 n. s.	0.65 n. s.
ALH (µm)	2.48 ± 0.04	2.44 ± 0.05	2.69 ± 0.05	2.59 ± 0.06	2.79 ±	2.8 ± 0.07	2.33 ±
		n. s.	**	n. s.	0.05 ***	***	0.04 *
BCF (Hz)	9.98 ± 0.25	9.96 ± 0.31	10.1 ± 0.24	9.68 ± 0.29	9.53 ±	9.72 ±	9.06 ±
		n. s.	n. s.	n. s.	0.24 n. s.	0.32 n. s.	0.23 **

Tabla suplementaria 5. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de humano incubados con distintas concentraciones de FC12-506A. Los valores representan el promedio ± S. E. M. n > 3. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

Parámetro	DMSO	[FC12-506A]					
		1 nM	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	100 µM
VCL (µm/s)	162.59 ± 5.96	147.41 ± 6.62 n. s.	160.9 ± 6.55 n. s.	162.51 ± 5.13 n. s.	140.04 ± 5.69 **	157.71 ± 5.54 n. s.	156.07 ± 6.1 n. s.
VSL (µm/s)	42.55 ± 2.8	37.69 ± 2.96 n. s.	48.95 ± 3.07 n. s.	44.21 ± 2.4 n. s.	40.91 ± 2.83 n. s.	45.49 ± 2.72 n. s.	47.36 ± 2.87 n. s.
VAP (µm/s)	78.13 ± 3.28	71.48 ± 3.58 n. s.	83.32 ± 3.38 n. s.	76.9 ± 2.87 n. s.	72.31 ± 3.09 n. s.	81.25 ± 3 n. s.	84.17 ± 3.43 n. s.
LIN (%)	26.14 ± 1.45	25.54 ± 1.73 n. s.	31.26 ± 1.58 *	27.33 ± 1.26 n. s.	27.89 ± 1.48 n. s.	28.61 ± 1.35 n. s.	30.32 ± 1.46 *
STR (%)	49.32 ± 2.02	48.26 ± 2.51 n. s.	55.05 ± 2.1 n. s.	52.45 ± 1.83 n. s.	50.79 ± 2.29 n. s.	52.01 ± 2.06 n. s.	53.62 ± 2.17 n. s.
WOB (%)	49.36 ± 1.32	48.54 ± 1.53 n. s.	53.46 ± 1.2 *	48.4 ± 1.17 n. s.	52.07 ± 1.16 n. s.	52.97 ± 1.16 *	54.84 ± 1.14 **
ALH (µm)	4.23 ± 0.14	3.9 ± 0.16 n. s.	4.16 ± 0.15 n. s.	4.25 ± 0.12 n. s.	3.8 ± 0.14 *	4.06 ± 0.13 n. s.	4.08 ± 0.14 n. s.
BCF (Hz)	7.16 ± 0.34	7.36 ± 0.43 n. s.	7.31 ± 0.37 n. s.	7.76 ± 0.32 n. s.	6.47 ± 0.34 n. s.	7.63 ± 0.32 n. s.	7.62 ± 0.36 **

Tabla suplementaria 6. Valores de los parámetros de movilidad en espermatozoides capacitados de ratón incubados con distintas concentraciones de FC12-506A. Los valores representan el promedio ± S. E. M. n > 3. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, n.s. no significativo.

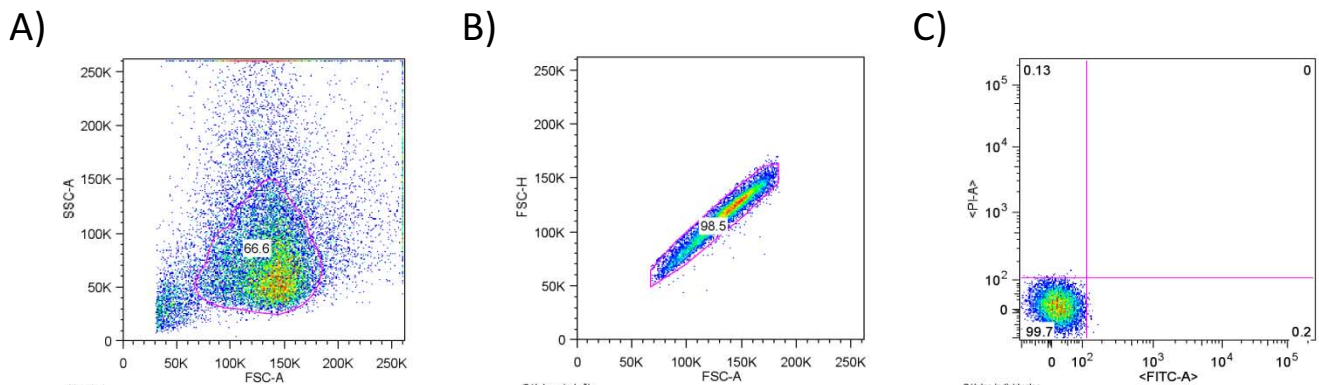


Figura suplementaria 1. Selección de espermatozoides de humano mediante citometría de flujo. Antes de cada experimento para medir los cambios de RA, se seleccionó únicamente la subpoblación útil de espermatozoides. **(A)** Inicialmente la población total de células (20,000 en todos los casos) se clasificó siempre en función de su tamaño (FSC-A; dispersión frontal-área) y su complejidad o granularidad (SSC-A; dispersión lateral-área) y en el programa FlowJo se seleccionó la subpoblación (línea púrpura) en donde gracias a estudios previos, se sabe que se encuentra la mayor densidad de espermatozoides normales, eliminando así los residuos celulares. **(B)** Posteriormente esa subpoblación se clasificó nuevamente en función de su FSC-A, pero ahora *versus* su altura (FSC-H; dispersión frontal-altura) y se seleccionó nuevamente la subpoblación en donde se sabe que se encuentran las células individuales, eliminando así a los agregados celulares. **(C)** La subpoblación final se visualizó siempre en una gráfica con cuatro cuadrantes y su posición indica negatividad o positividad para yoduro de propidio (PI) y FITC-PSA. En la figura ejemplo, todas las células se localizan en el cuadrante negativo para ambos colorantes.

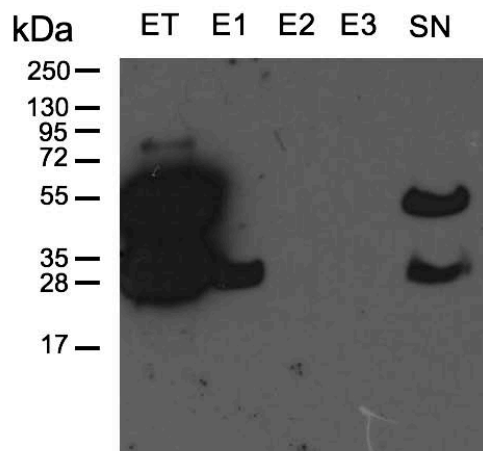


Figura suplementaria 2. Coinmunoprecipitación y *western-blot* con el anticuerpo primario anti-CAII. El anticuerpo anti-CAII se unió a la perlas de una columna de afinidad para coinmunoprecipitar proteínas. Después, la proteína total de los solubilizados de espermatozoides de humano se hizo pasar a través de la columna y de esta forma la CAII y las proteínas que interactúan con ella se unieron a las perlas. Posteriormente estas proteínas se eluyeron tres veces y en un SDS-PAGE al 15% se cargó el extracto total (ET), los tres eluidos (E1, E2 y E3) y el sobrenadante (SN). Después se llevó a cabo el protocolo de *western-blot* descrito en **Materiales y Métodos** y se reveló contra el anticuerpo primario anti-CAII. En la imagen se observan bandas cercanas al peso molecular de la CAII (29 kDa). La banda del eluido 1 se secuenció por espectrometría de masas y los resultados indicaron que la CAII fue la única isoforma de CA presente.

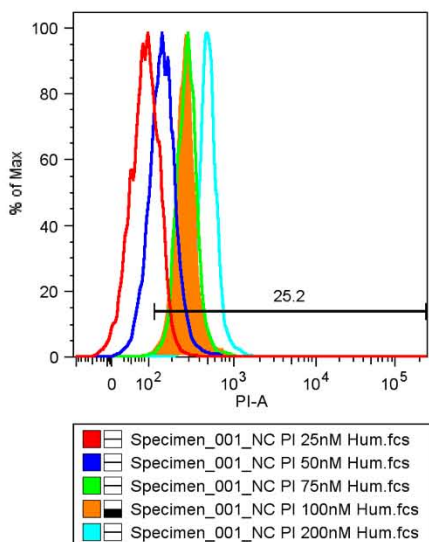


Figura suplementaria 3. Determinación de la concentración óptima de yoduro de propidio para medir la viabilidad de los espermatozoides capacitados de humano. Las células se tiñeron con cinco concentraciones distintas de yoduro de propidio (PI; 25-200 nM) y se determinó que 100 nM (distribución anaranjada) es la concentración mínima necesaria para teñir adecuadamente a las células y medir su viabilidad.

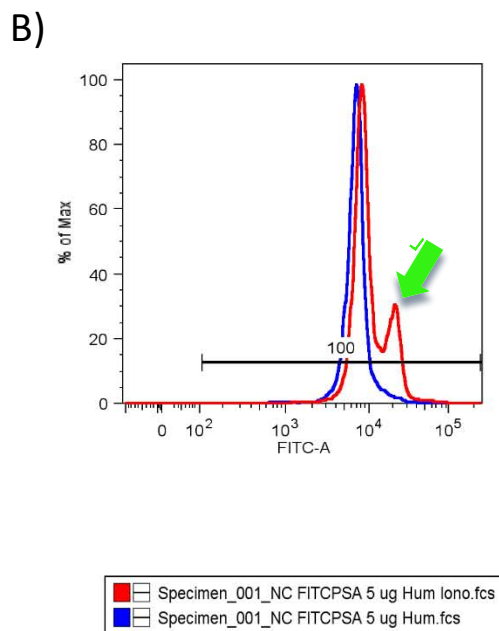
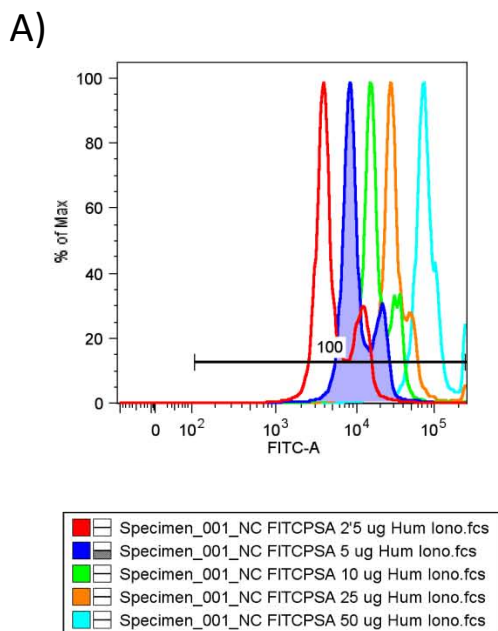


Figura suplementaria 4. Determinación de la concentración óptima de FITC-PSA para medir la RA en los espermatozoides capacitados de humano. (A) Las células se tiñeron con cinco concentraciones distintas de FITC-PSA (2.5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó que 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (distribución azul) se encuentra a la mitad del rango de concentraciones adecuadas para medir la RA en los espermatozoides. (B) Ejemplo de las distribuciones de poblaciones de células teñidas con FITC-PSA 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin (trazo azul) y con ionomicina (Iono) 10 μM (trazo rojo). La subpoblación diferente entre ambas poblaciones (señalada con la flecha verde) representa a las células reaccionadas por la acción de la Iono. El número exacto de células reaccionadas se calculó en todos los experimentos usando el programa FlowJo.

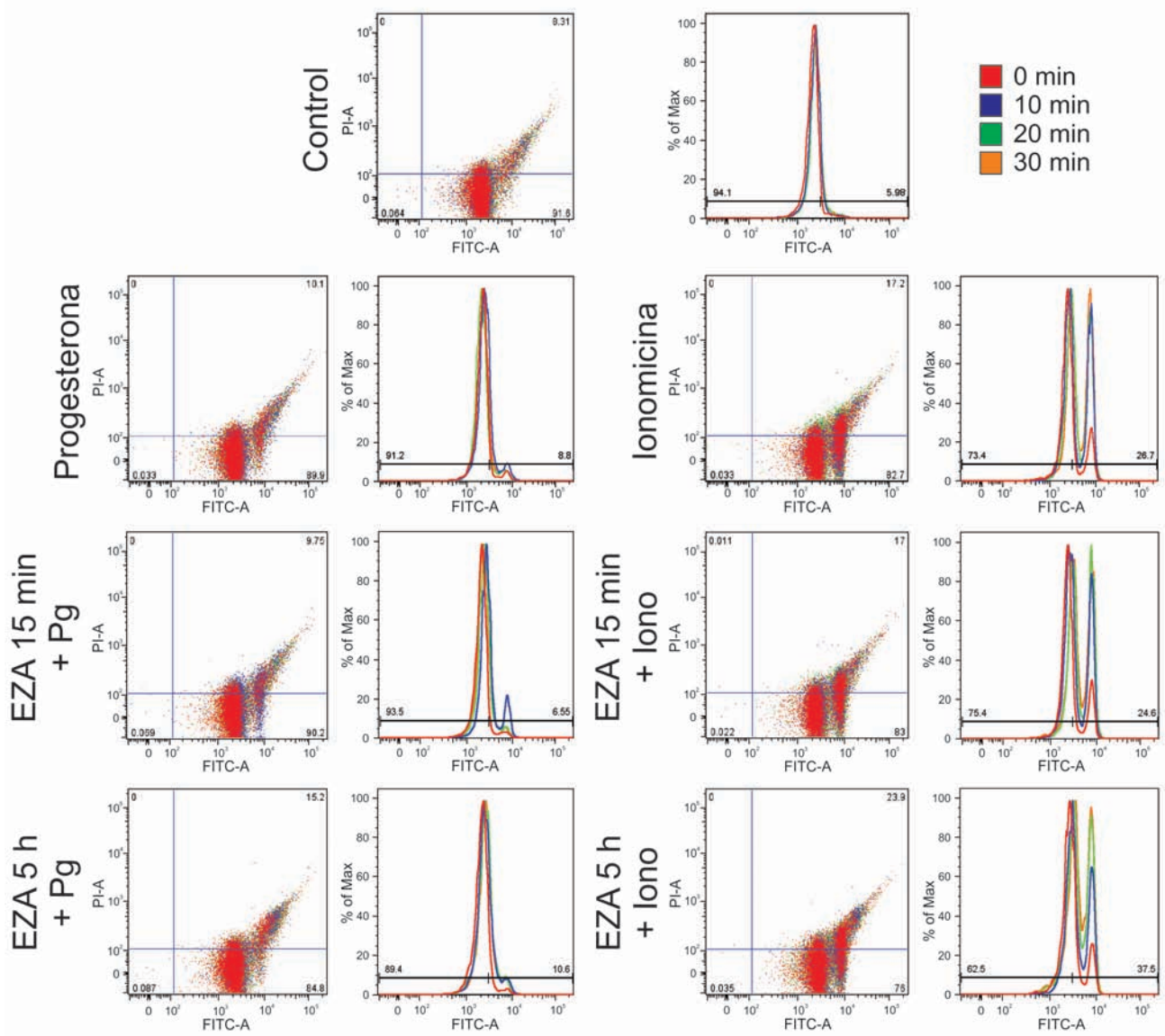


Figura suplementaria 5. Experimento representativo de detección de la RA mediante citometría de flujo en espermatozoides capacitados de humano. Células capacitadas de humano y preincubadas con EZA 30 μ M durante 15 minutos o 5 horas, se tiñeron con FITC-PSA 5 μ g/mL. Se indujo la RA con progesterona (Pg) 10 μ M o Ionomicina (Iono) 10 μ M durante 30 minutos y se registró el nivel de RA cada 10 minutos durante 30 minutos. Los paneles muestran la gráfica de puntos (izquierda) y la distribución (derecha) de las siguientes condiciones experimentales: Control (sin inductor de la RA), Pg, Iono, EZA durante 15 minutos + Pg, EZA durante 5 horas + Pg, EZA durante 15 minutos + Iono y EZA durante 5 horas + Iono. El número total de células reaccionadas por condición se calculó utilizando el programa FlowJo.

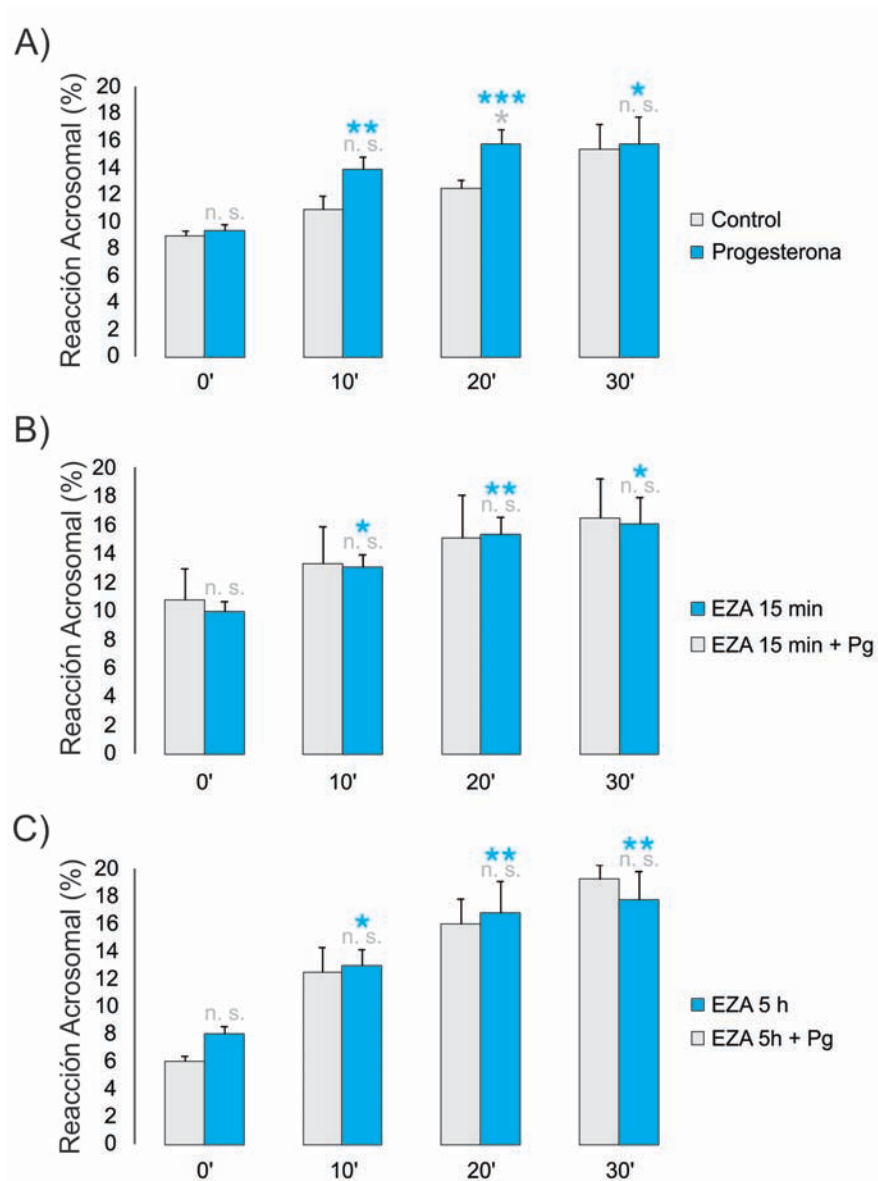


Figura suplementaria 6. Dinámica de la RA inducida por Pg en espermatozoides capacitados de humano. Células de humano se preincubaron con EZA 30 μ M durante 15 minutos o 5 horas y después se tiñeron con FITC-PSA 5 μ g/mL. La RA se indujo con progesterona (Pg) 10 μ M y se detectó en un citómetro de flujo cada 10 minutos durante 30 minutos. Las condiciones analizadas, con sus respectivos controles negativos, fueron las siguientes: **(A)** Pg, **(B)** EZA durante 15 minutos + Pg y **(C)** EZA durante 5 horas + Pg. Los valores representan el promedio \pm S. E. M. $n > 3$. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

Tiempo	Control	Pg	EZA 15 min	EZA 15 min + Pg	EZA 5 h	EZA 5 h + Pg
0'	8.95 ± 0.38	9.36 ± 0.47	10.77 ± 2.25	9.94 ± 0.73	6.07 ± 0.4	8.05 ± 0.57
10'	10.92 ± 1.01	13.92 ± 0.96 **	13.32 ± 2.6	13.07 ± 0.89 *	12.49 ± 1.9	13 ± 1.21 *
20'	12.51 ± 0.57	15.76 ± 1.09 ***	15.08 ± 3.08	15.38 ± 1.21 **	15.99 ± 1.85	16.8 ± 2.33 **
30'	15.41 ± 1.87	15.83 ± 1.98 *	16.54 ± 2.76	16.07 ± 1.87 *	19.33 ± 1.09	17.78 ± 2.11 **

Tabla suplementaria 7. Valores de RA inducida por Pg en espermatozoides capacitados de humano preincubados con EZA. La RA se detectó mediante citometría de flujo después de preincubar a las células con EZA 30 μ M durante 15 minutos o 5 horas. Los espermatozoides se tiñeron con FITC-PSA 5 μ g/mL y la RA se indujo con progesterona (Pg) 10 μ M. El nivel de RA en cada condición se midió cada 10 minutos durante 30 minutos. Los valores representan el promedio \pm S. E. M. n > 3. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

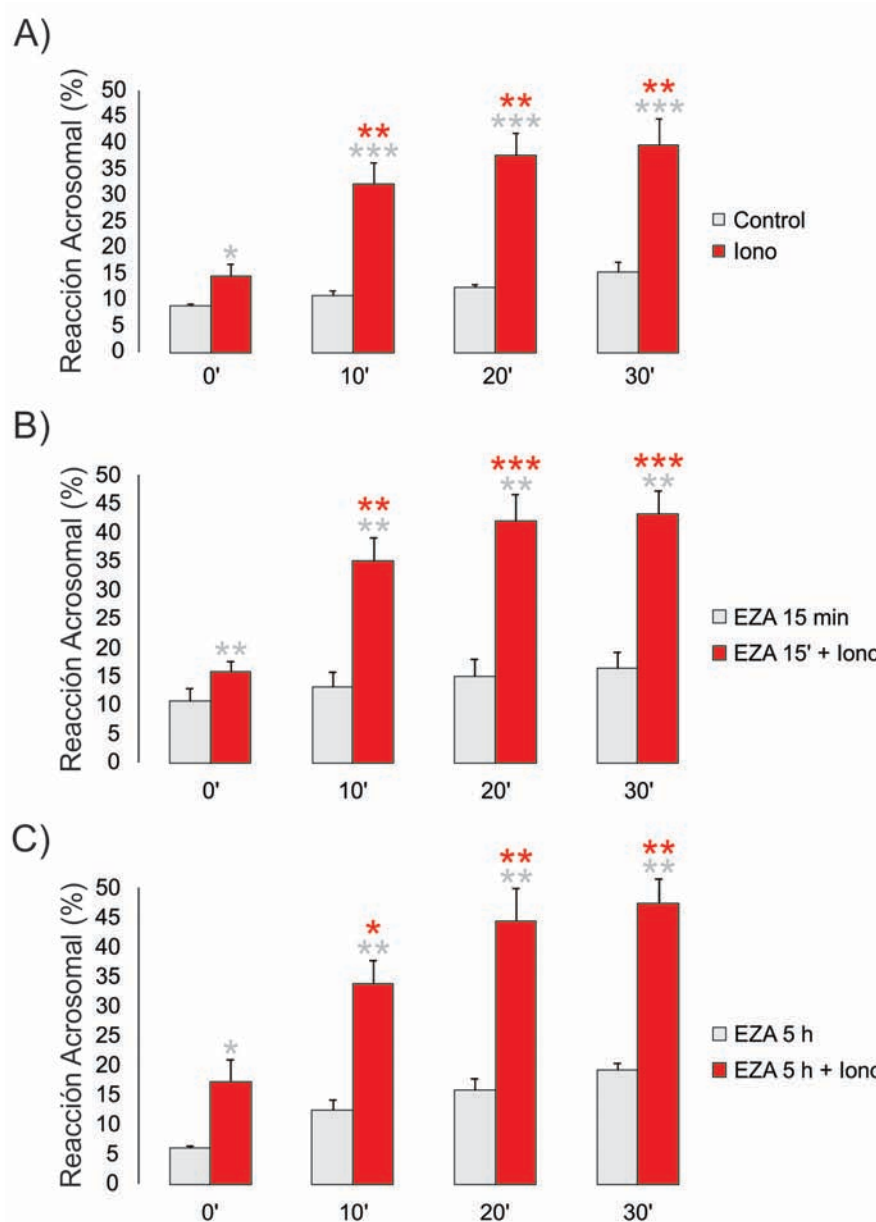


Figura suplementaria 7. Dinámica de la RA inducida por Iono en espermatozoides capacitados de humano. Células de humano se preincubaron con EZA 30 μ M durante 15 minutos o 5 horas y después se tiñeron con FITC-PSA 5 μ g/mL. La RA se indujo con ionomicina (Iono) 10 μ M y se detectó en un citómetro de flujo cada 10 minutos durante 30 minutos. Las condiciones analizadas, con sus respectivos controles negativos, fueron las siguientes: **(A)** Iono, **(B)** EZA durante 15 minutos + Iono y **(C)** EZA durante 5 horas + Iono. Los valores representan el promedio \pm S. E. M. $n > 3$. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

Tiempo	Control	Iono	EZA 15 min	EZA 15 min + Iono	EZA 5 h	EZA 5 h + Iono
0'	8.95 ± 0.38	14.54 ± 2.45	10.77 ± 2.25	15.93 ± 1.88	6.07 ± 0.4	17.23 ± 3.95
10'	10.92 ± 1.01	32.2 ± 4.13 **	13.32 ± 2.6	35.14 ± 4.07 **	12.49 ± 1.9	33.97 ± 3.81 *
20'	12.51 ± 0.57	37.78 ± 4.25 **	15.08 ± 3.08	42.08 ± 4.67 ***	15.99 ± 1.85	44.43 ± 5.61 **
30'	15.41 ± 1.87	39.73 ± 5.1 **	16.54 ± 2.76	43.37 ± 4.09 ***	19.33 ± 1.09	47.53 ± 7.02 **

Tabla suplementaria 8. Valores de RA inducida por Iono en espermatozoides capacitados de humano preincubados con EZA. La RA se detectó mediante citometría de flujo después de preincubar a las células con EZA 30 μ M durante 15 minutos o 5 horas. Los espermatozoides se tiñeron con FITC-PSA 5 μ g/mL y la RA se indujo con ionomicina (Iono) 10 μ M. El nivel de RA en cada condición se midió cada 10 minutos durante 30 minutos. Los valores representan el promedio \pm S. E. M. n > 3. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, n.s; no significativo.

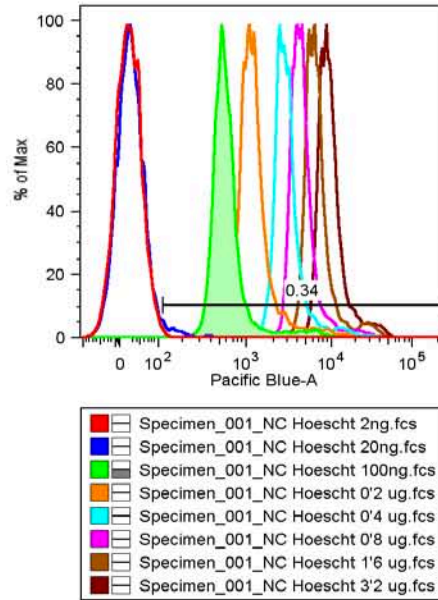


Figura suplementaria 8. Determinación de la concentración óptima de Hoechst para medir la viabilidad de los espermatozoides capacitados de humano. Las células se tiñeron con ocho concentraciones distintas de Hoechst (2 ng-3.2 μ g) y se determinó que 100 ng (distribución verde) es la concentración mínima necesaria para medir la viabilidad de los gametos.

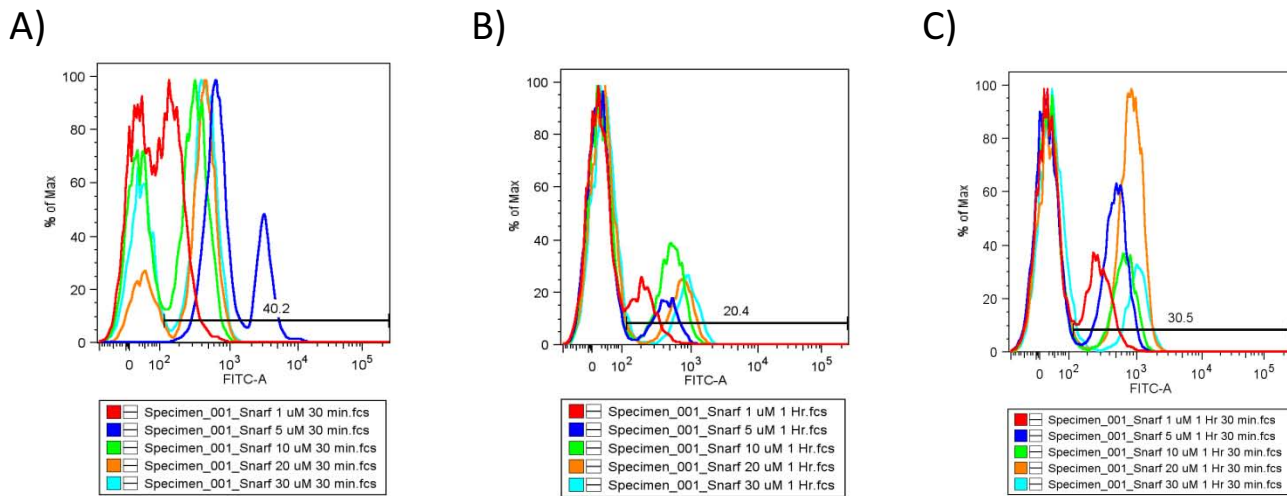


Figura suplementaria 9. Determinación de la concentración y el tiempo óptimos de cargado de SNARF-5F AM para detectar la señal de mayor magnitud en los espermatozoides capacitados de humano. Células de humano se cargaron con cinco concentraciones distintas de la sonda fluorescente para detectar cambios de pH, SNARF-5F AM (1-30 μ M) y en tres tiempos distintos: (A) 30 minutos, (B) 1 hora y (C) 1.5 horas. La detección de la señal del colorante se llevó a cabo en un citómetro de flujo. Se determinó que la concentración y el tiempo óptimos de cargado son 20 μ M y 1.5 horas, respectivamente.

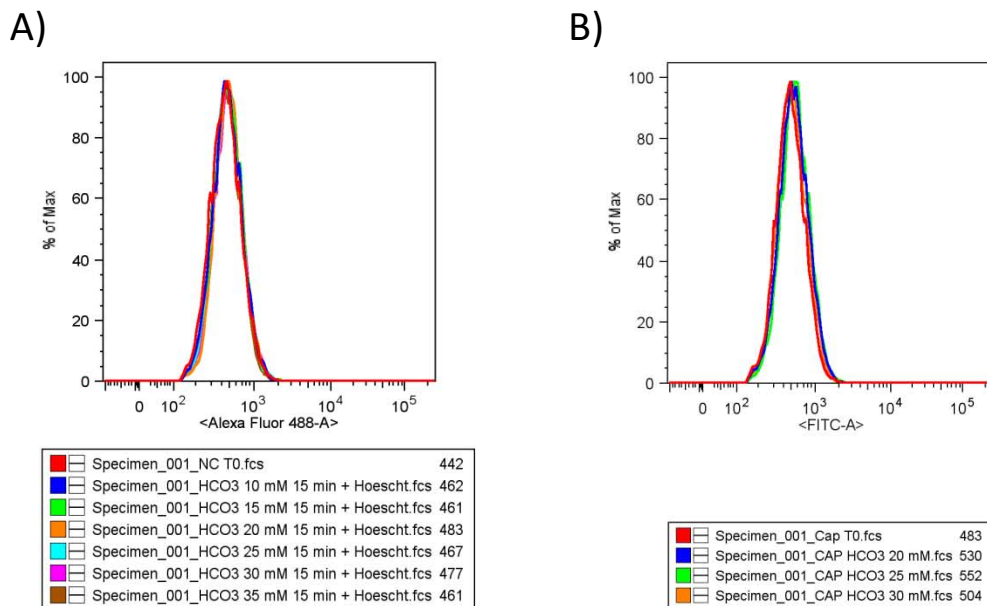
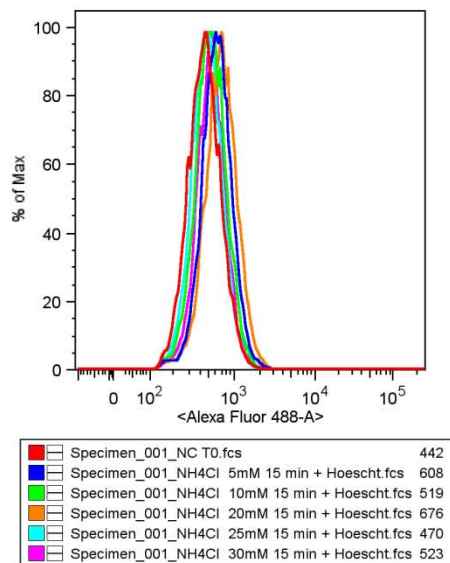


Figura suplementaria 10. Determinación de la concentración óptima de NaHCO_3 para inducir un cambio significativo de pH_i en espermatozoides no capacitados y capacitados de humano. (A) Células no capacitadas de humano se cargaron durante 1.5 horas con la sonda fluorescente SNARF-5F AM y posteriormente en un citómetro de flujo se registraron los cambios de pH_i ocasionados por seis concentraciones distintas de NaHCO_3 (10-35 mM). Utilizando el programa FlowJo se calculó la media geométrica de cada distribución y de acuerdo con los resultados obtenidos, a partir de 20 mM de NaHCO_3 se produjo el mayor desplazamiento de la media geométrica *versus* el valor obtenido con las células sin estímulo (NC). (B) En células capacitadas se utilizaron tres concentraciones altas de NaHCO_3 (20-30 mM) y se determinó que 25 mM es la concentración de NaHCO_3 que ocasiona el mayor desplazamiento de la media geométrica *versus* el valor obtenido con las células sin estímulo (Cap).

A)



B)

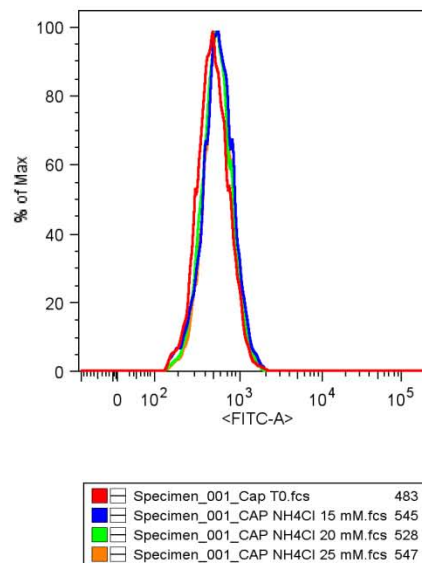


Figura suplementaria 11. Determinación de la concentración óptima de NH_4Cl para inducir un cambio significativo de pH_i en espermatozoides no capacitados y capacitados de humano. (A) Células no capacitadas de humano se cargaron durante 1.5 horas con la sonda fluorescente SNARF-5F AM y posteriormente en un citómetro de flujo se registraron los cambios de pH_i ocasionados por cinco concentraciones distintas de NaHCO_3 (5-30 mM). Utilizando el programa FlowJo se calculó la media geométrica de cada distribución y de acuerdo con los resultados obtenidos, con 20 mM de NH_4Cl se produjo el mayor desplazamiento de la media geométrica *versus* el valor obtenido con las células sin estímulo (NC). (B) En células capacitadas se utilizaron tres concentraciones altas de NH_4Cl (15-25 mM) y se determinó que cualquiera de las tres concentraciones ocasiona un desplazamiento significativo de la media geométrica *versus* el valor obtenido con las células sin estímulo (Cap).

EB	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA15	NC+EZA15 +HCO ₃ ⁻	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA5	NC+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	228	225	224	219	228	225	213	210
	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA15	CAP+EZA15 +HCO ₃ ⁻	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA5	CAP+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	258	252	251	239	258	252	228	221
JASV	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA15	NC+EZA15 +HCO ₃ ⁻	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA5	NC+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	266	300	268	282	266	300	267	267
	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA15	CAP+EZA15 +HCO ₃ ⁻	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA5	CAP+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	212	213	210	208	212	213	325	305
HST	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA15	NC+EZA15 +HCO ₃ ⁻	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA5	NC+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	217	213	225	210	217	213	230	232
	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA15	CAP+EZA15 +HCO ₃ ⁻	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA5	CAP+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	234	234	240	233	234	234	276	262
DV	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA15	NC+EZA15 +HCO ₃ ⁻	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA5	NC+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	276	269	279	259	276	269	254	247
	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA15	CAP+EZA15 +HCO ₃ ⁻	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA5	CAP+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	221	214	214	212	221	214	238	234
EM	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA15	NC+EZA15 +HCO ₃ ⁻	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA5	NC+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	591	584	524	525	591	584	150	151
	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA15	CAP+EZA15 +HCO ₃ ⁻	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA5	CAP+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	551	543	570	554	551	543	200	215
CB	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA15	NC+EZA15 +HCO ₃ ⁻	NC	NC+HCO ₃ ⁻	NC+EZA5	NC+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	396	400	389	409	396	400	157	152
	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA15	CAP+EZA15 +HCO ₃ ⁻	CAP	CAP+HCO ₃ ⁻	CAP+EZA5	CAP+EZA5 +HCO ₃ ⁻
MG	314	295	312	291	314	295	161	160

Tabla suplementaria 9. Cambios de pH_i ocasionados por NaHCO₃ o NH₄Cl en espermatozoides no capacitados y capacitados de humano. Los valores numéricos representan la media geométrica de la gaussiana obtenida para cada condición. Se utilizaron muestras de semen de seis donadores distintos. NC, no capacitados; CAP, capacitados; EZA, etoxizolamida; 15, preincubación con EZA durante 15 minutos; 5, preincubación con EZA durante 5 horas; MG, media geométrica.

12. Bibliografía

- Ali Akbar, S., K. H. Nicolaidis, and P. R. Brown. 1998. "Carbonic Anhydrase Isoenzymes CAI and CAII in Semen, Decidua, Chorionic Villi and Various Fetal Tissues." *Early Human Development* 51: 205–11.
- Alper, Seth L. 2009. "Molecular Physiology and Genetics of Na⁺-Independent SLC4 Anion Exchangers." *The Journal of experimental biology* 212(Pt 11): 1672–83. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2683012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Alvarez, Bernardo V, Gonzalo L Vilas, and Joseph R Casey. 2005. "Metabolon Disruption: A Mechanism That Regulates Bicarbonate Transport." *The EMBO journal* 24(14): 2499–2511. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1176462&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (November 27, 2013).
- Badger, M R, and G D Price. 1989. "Carbonic Anhydrase Activity Associated with the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942." *Plant physiology* 89(1): 51–60.
- Baibakov, Boris et al. 2007. "Sperm Binding to the Zona Pellucida Is Not Sufficient to Induce Acrosome Exocytosis." *Development (Cambridge, England)* 134(5): 933–43.
- Bhandari, Beena, Pankaj Bansal, Pankaj Talwar, and Satish K Gupta. 2010. "Delineation of Downstream Signalling Components during Acrosome Reaction Mediated by Heat Solubilized Human Zona Pellucida." *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 8: 7.
- Blackmores, F, J Beeben, and R Danforthn. 1990. "And 17wHydroxyprogesterone." 265(3): 1376–80.
- Bonaccorsi, L. et al. 1998. "Progesterone-Stimulated Intracellular Calcium Increase in Human Spermatozoa Is Protein Kinase C-Independent." *Molecular Human Reproduction* 4(3): 259–68.
- Boron, Walter F, Liming Chen, and Mark D Parker. 2009. "Modular Structure of Sodium-Coupled Bicarbonate Transporters." *The Journal of experimental biology* 212(Pt 11): 1697–1706.
- Buffone, Mariano G, Noritaka Hirohashi, and George L Gerton. 2014. "Unresolved Questions Concerning Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis." *Biology of reproduction* 90(5): 112. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24671881>.
- Caballero-Campo, Pedro et al. 2006. "Biological Effects of Recombinant Human Zona Pellucida Proteins on Sperm Function." *Biology of reproduction* 74(4): 760–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407501> (November 28, 2013).
- Calogero, a. 1999. "γ-Aminobutyric Acid (GABA) a and B Receptors Mediate the Stimulatory Effects of GABA on the Human Sperm Acrosome Reaction: Interaction with Progesterone." *Fertility and Sterility* 71(5): 930–36. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028299000631>.
- Casey, Joseph R, Sergio Grinstein, and John Orłowski. 2010. "Sensors and Regulators of Intracellular pH." *Nature reviews. Molecular cell biology* 11(1): 50–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997129> (November 11, 2013).
- Cipriano, Daniel J. et al. 2008. "Structure and Regulation of the Vacuolar ATPases." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1777(7-8): 599–604.
- Cummins, Eoin P. et al. 2014. "Carbon Dioxide-Sensing in Organisms and Its Implications for Human

- Disease.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(5): 831–45.
- D’Ambrosio, Katia et al. 2012. “Development of Potent Carbonic Anhydrase Inhibitors Incorporating Both Sulfonamide and Sulfamide Groups.” *Journal of Medicinal Chemistry* 55(15): 6776–83.
- Darszon, A., T. Nishigaki, C. Beltran, and C. L. Trevino. 2011. “Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa.” *Physiological Reviews* 91: 1305–55.
- Demarco, Ignacio A et al. 2003. “Involvement of a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation.” *The Journal of biological chemistry* 278: 7001–9.
- Ekstedt, Elisabeth, Lena Holm, and Yvonne Ridderstråle. 2004. “Carbonic Anhydrase in Mouse Testis and Epididymis; Transfer of Isozyme IV to Spermatozoa during Passage.” *Journal of molecular histology* 35: 167–73.
- Escoffier, J. et al. 2015. “Flow Cytometry Analysis Reveals That Only a Subpopulation of Mouse Sperm Undergoes Hyperpolarization During Capacitation.” *Biology of Reproduction* 92(April): 1–11. <http://www.bioreprod.org/cgi/doi/10.1095/bioreprod.114.127266>.
- Frost, Susan C, and Robert Mckenna, eds. 2014. *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*. 1st editio. Gainesville, FL, USA: Springer.
- Gupta, Satish K, and Beena Bhandari. 2011. “Acrosome Reaction: Relevance of Zona Pellucida Glycoproteins.” *Asian journal of andrology* 13(1): 97–105. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3739397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (November 28, 2013).
- Halmi, Piia et al. 2004. “Expression of Hypoxia-Inducible, Membrane-Bound Carbonic Anhydrase Isozyme XII in Mouse Tissues.” *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 277: 171–77.
- Hirohashi, Noritaka et al. 2013. “Sperm from Sneaker Male Squids Exhibit Chemotactic Swarming to CO_2 .” *Current Biology* 23(9): 775–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.040>.
- Inaba, Kazuo, Catherine Dréanno, and Jacky Cosson. 2003. “Control of Flatfish Sperm Motility by CO_2 and Carbonic Anhydrase.” *Cell motility and the cytoskeleton* 55: 174–87.
- Inoue, Naokazu et al. 2011. “Acrosome-Reacted Mouse Spermatozoa Recovered from the Perivitelline Space Can Fertilize Other Eggs.” : 1–4.
- Ishiguro, Hiroshi et al. 2009. “CFTR Functions as a Bicarbonate Channel in Pancreatic Duct Cells.” *The Journal of general physiology* 133(3): 315–26. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2654087&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jin, Mayuko et al. 2011. “Most Fertilizing Mouse Spermatozoa Begin Their Acrosome Reaction before Contact with the Zona Pellucida during in Vitro Fertilization.”
- José, Omar et al. 2010. “Recombinant Human ZP3-Induced Sperm Acrosome Reaction: Evidence for the Involvement of T- and L-Type Voltage-Gated Calcium Channels.” *Biochemical and biophysical research communications* 395(4): 530–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20394732> (November 28, 2013).
- Kirichok, Yuriy, and Polina V. Lishko. 2011. “Rediscovering Sperm Ion Channels with the Patch-Clamp Technique.” *Molecular Human Reproduction* 17(8): 478–99.

- Klier, Michael. 2012. "Isoform-Spezifische Interaktionen von Proteinfamilien: Differentielle Kooperation von Monocarboxylattransportern Mit Carboanhydrasen." Technische Universität Kaiserslautern.
- Kühlbrandt, Werner. 2004. "Biology, Structure and Mechanism of P-Type ATPases." *Nature reviews. Molecular cell biology* 5(4): 282–95.
- De La Vega-Beltran, Jose Luis et al. 2012. "Mouse Sperm Membrane Potential Hyperpolarization Is Necessary and Sufficient to Prepare Sperm for the Acrosome Reaction." *Journal of Biological Chemistry* 287(53): 44384–93.
- Lehtonen, Jonna et al. 2004. "Characterization of CA XIII, a Novel Member of the Carbonic Anhydrase Isozyme Family." *The Journal of biological chemistry* 279(4): 2719–27.
- Lishko, Polina V et al. 2012. "The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels." *Annual review of physiology* 74: 453–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22017176> (November 8, 2013).
- Lishko, Polina V, Inna L Botchkina, and Yuriy Kirichok. 2011. "Progesterone Activates the Principal Ca²⁺ Channel of Human Sperm." *Nature* 471(7338): 387–91.
- Lishko, Polina V., Inna L. Botchkina, Andriy Fedorenko, and Yuriy Kirichok. 2010. "Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel." *Cell* 140: 327–37.
- Liu, Ying, Deng-Ke Wang, and Li-Ming Chen. 2012. "The Physiology of Bicarbonate Transporters in Mammalian Reproduction." *Biology of reproduction* 86(4): 99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262691> (November 22, 2013).
- López-González, I. et al. 2014. "Membrane Hyperpolarization during Human Sperm Capacitation." *Molecular Human Reproduction* 20(7): 619–29.
- Malo, M E, and L Fliegel. 2006. "Physiological Role and Regulation of the Na⁺/H⁺ Exchanger." *Can J Physiol Pharmacol* 84(11): 1081–95. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17218973.
- Mata-Martínez, Esperanza et al. 2013. "Measuring Intracellular Ca²⁺ Changes in Human Sperm Using Four Techniques: Conventional Fluorometry, Stopped Flow Fluorometry, Flow Cytometry and Single Cell Imaging." *Journal of visualized experiments: JoVE* (75): 1–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23728309>.
- Mezquita, P, C Mezquita, and J Mezquita. 1999. "Novel Transcripts of Carbonic Anhydrase II in Mouse and Human Testis." *Molecular human reproduction* 5: 199–205.
- Mortimer, Sharon T. 2000. "CASA: Practical Aspects." *Journal of Andrology*.
- Navarrete, Felipe A. et al. 2015. "Biphasic Role of Calcium in Mouse Sperm Capacitation Signaling Pathways." *Journal of Cellular Physiology* 230(8): 1758–69.
- Nishigaki, Takuya et al. 2014. "Biochemical and Biophysical Research Communications Intracellular pH in Sperm Physiology." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 450(3): 1149–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.100>.
- Orlowski, John, and Sergio Grinstein. 2004. "Diversity of the Mammalian Sodium/proton Exchanger

- SLC9 Gene Family.” *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 447(5): 549–65.
- Parkkila, S, K Kaunisto, S Kellokumpu, and H Rajaniemi. 1991. “A High Activity Carbonic Anhydrase Isoenzyme (CA II) Is Present in Mammalian Spermatozoa.” *Histochemistry* 95: 477–82.
- Paroutis, P, N Touret, and S Grinstein. 2004. “The pH of the Secretory Pathway: Measurement, Determinants, and Regulation.” *Physiology (Bethesda)* 19: 207–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15304635>.
- Romarowski, A. et al. 2016. “A Specific Transitory Increase in Intracellular Calcium Induced by Progesterone Promotes Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm.” *Biology of Reproduction* 94(January): 1–12. <http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.115.136085>.
- Sánchez-Cárdenas, Claudia et al. 2014. “Acrosome Reaction and Ca²⁺ Imaging in Single Human Spermatozoa: New Regulatory Roles of [Ca²⁺]_i.” *Biology of reproduction* 91(August): 1–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25100708>.
- Sindić, Aleksandra, Min-Hwang Chang, David B Mount, and Michael F Romero. 2007. “Renal Physiology of SLC26 Anion Exchangers.” *Current opinion in nephrology and hypertension* 16(5): 484–90.
- Skakkebaek, N. E. et al. 2015. “Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility.” *Physiological Reviews* 96(1): 55–97.
- Sleight, Susan B et al. 2005. “Isolation and Proteomic Analysis of Mouse Sperm Detergent-Resistant Membrane Fractions: Evidence for Dissociation of Lipid Rafts during Capacitation.” *Biology of reproduction* 73(4): 721–29.
- Steward, Martin C, and Hiroshi Ishiguro. 2009. “Molecular and Cellular Regulation of Pancreatic Duct Cell Function.” *Current opinion in gastroenterology* 25(5): 447–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19571747>.
- Stridh, Malin H et al. 2012. “Lactate Flux in Astrocytes Is Enhanced by a Non-Catalytic Action of Carbonic Anhydrase II.” *The Journal of physiology* 590(Pt 10): 2333–51. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3424756&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Strünker, Timo et al. 2011. “The CatSper Channel Mediates Progesterone-Induced Ca²⁺ Influx in Human Sperm.” *Nature* 471(7338): 382–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412338> (November 27, 2013).
- Suarez, S S, and H-c Ho. 2003. “Hyperactivated Motility in Sperm Introduction: Functions of Hyperactivation Initiation of Hyperactivation In Vivo.” 124: 119–24.
- Suarez, S S, and a a Pacey. 2006. “Sperm Transport in the Female Reproductive Tract.” *Human reproduction update* 12(1): 23–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16272225> (November 14, 2013).
- Suarez, Susan S. 2008. “Control of Hyperactivation in Sperm.” *Human reproduction update* 14(6): 647–57.
- Supuran, Claudiu T. 2008a. “Carbonic Anhydrases: An Overview.” *Current pharmaceutical design* 14(7): 603–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336305>.
- Supuran, Claudiu T. 2008b. “Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and

- Activators.” *Nature reviews. Drug discovery* 7(2): 168–81.
- Supuran, Claudiu T. 2011. “Carbonic Anhydrase Inhibition with Natural Products: Novel Chemotypes and Inhibition Mechanisms.” *Molecular Diversity* 15(2): 305–16.
- Supuran, Claudiu T., and Andrea Scozzafava. 2007. “Carbonic Anhydrases as Targets for Medicinal Chemistry.” *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15(13): 4336–50.
- Tamburrino, Lara et al. 2014. “The CatSper Calcium Channel in Human Sperm: Relation with Motility and Involvement in Progesterone-Induced Acrosome Reaction.” *Human Reproduction* 29(3): 418–28.
- Teves, María Eugenia et al. 2006. “Progesterone at the Picomolar Range Is a Chemoattractant for Mammalian Spermatozoa.” *Fertility and sterility* 86(3): 745–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16784744> (November 29, 2013).
- Tresguerres, Martin, Katie L Barott, Megan E Barron, and Jinae N Roa. 2014. “Established and Potential Physiological Roles of Bicarbonate- Sensing Soluble Adenylyl Cyclase (sAC) in Aquatic Animals.” : 663–72.
- Truppo, Emanuela et al. 2012. “Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Carbonic Anhydrase VII Is S-Glutathionylated without Loss of Catalytic Activity and Affinity for Sulfonamide Inhibitors.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22(4): 1560–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.12.134>.
- Visconti, P E et al. 1995. “Capacitation of Mouse Spermatozoa. I. Correlation between the Capacitation State and Protein Tyrosine Phosphorylation.” *Development (Cambridge, England)* 121(4): 1129–37.
- Visconti, Pablo E et al. 2011. “Ion Channels, Phosphorylation and Mammalian Sperm Capacitation.” *Asian journal of andrology* 13(3): 395–405.
- Wandernoth, Petra M et al. 2010. “Role of Carbonic Anhydrase IV in the Bicarbonate-Mediated Activation of Murine and Human Sperm.” *PloS one* 5(11): e15061.
- Wandernoth, Petra M. et al. 2015. “Normal Fertility Requires the Expression of Carbonic Anhydrases II and IV in Sperm.” *Journal of Biological Chemistry* 290(49): 29202–16.
- Wang, Xiaohong, Heinz C. Schröder, and Werner E G Müller. 2014. “Biocalcite, a Multifunctional Inorganic Polymer: Building Block for Calcareous Sponge Spicules and Bioseed for the Synthesis of Calcium Phosphate-Based Bone.” *Beilstein Journal of Nanotechnology* 5(1): 610–21.
- Wertheimer, Eva et al. 2013. “Compartmentalization of Distinct cAMP Signaling Pathways in Mammalian Sperm.” *Journal of Biological Chemistry* 288(49): 35307–20.
- WHO. 2010. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5th ed. Geneva, Switzerland.
- Wilde, M W, C R Ward, and G S Kopf. 1992. “Activation of a G Protein in Mouse Sperm by the Zona Pellucida, an Egg-Associated Extracellular Matrix.” *Molecular reproduction and development* 31(4): 297–306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1571163>.
- Zanetti, Natalia, and Luis S Mayorga. 2009. “Acrosomal Swelling and Membrane Docking Are Required for Hybrid Vesicle Formation during the Human Sperm Acrosome Reaction.” *Biology of reproduction* 81(2): 396–405.

Zoppino, Felipe Carlos Martín et al. 2012. “Recording and Sorting Live Human Sperm Undergoing Acrosome Reaction.” *Fertility and Sterility* 97(6): 1309–15.

Apéndice A

Artículo publicado con los resultados de este trabajo



Carbonic anhydrases and their functional differences in human and mouse sperm physiology



O. José^a, P. Torres-Rodríguez^a, L.S. Forero-Quintero^b, J.C. Chávez^a,
J.L. De la Vega-Beltrán^a, F. Carta^c, C.T. Supuran^{c,d}, J.W. Deitmer^b, C.L. Treviño^{a,*}

^a Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^b Abteilung Allgemeine Zoologie, Fachbereich Biologie, University of Kaiserslautern, D-67653, Kaiserslautern, Germany

^c Dipartimento di Chimica "U. Schiff", Laboratorio di Chimica Bioinorganica, Università degli Studi di Firenze, Via della Lastruccia 3, Polo Scientifico, 50019, Sesto Fiorentino, Florence, Italy

^d Dipartimento Neurofarba, Sezione di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Firenze, Via Ugo Schiff 6, Polo Scientifico, 50019, Sesto Fiorentino, Florence, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2015

Accepted 3 November 2015

Available online 6 November 2015

Keywords:

Sperm

Carbonic anhydrase

Motility

Acrosome reaction

ABSTRACT

Fertilization is a key reproductive event in which sperm and egg fuse to generate a new individual. Proper regulation of certain parameters (such as intracellular pH) is crucial for this process. Carbonic anhydrases (CAs) are among the molecular entities that control intracellular pH dynamics in most cells. Unfortunately, little is known about the function of CAs in mammalian sperm physiology. For this reason, we re-explored the expression of CAI, II, IV and XIII in human and mouse sperm. We also measured the level of CA activity, determined by mass spectrometry, and found that it is similar in non-capacitated and capacitated mouse sperm. Importantly, we found that CAII activity accounts for half of the total CA activity in capacitated mouse sperm. Using the general CA inhibitor ethoxzolamide, we studied how CAs participate in fundamental sperm physiological processes such as motility and acrosome reaction in both species. We found that capacitated human sperm depend strongly on CA activity to support normal motility, while capacitated mouse sperm do not. Finally, we found that CA inhibition increases the acrosome reaction in capacitated human sperm, but not in capacitated mouse sperm.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Before internal fertilization can occur, spermatozoa travel a long stretch inside the female reproductive tract; throughout their journey in this harsh environment, they face important changes in the concentration of different ions. Sperm encounter reduced $[K^+]_e$, increased $[HCO_3^-]_e$ (which in turn increases $[HCO_3^-]_i$) and $[Na^+]_e$, and during capacitation the intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) increases [1]. The increases in $[HCO_3^-]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ activate soluble adenylate cyclase (sAC). Therefore, sAC is a likely connection between carbonic anhydrases (CAs; metalloenzymes that turn CO_2 into HCO_3^-) and downstream steps in the sperm signaling pathways. It has been demonstrated that cAMP produced by sAC

has different targets, including protein kinase A (PKA), cyclic nucleotide gated (CNG) channels, sperm Na^+/H^+ exchanger (sNHE), and exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) [2]. In turn, PKA is a crucial modulator of sperm motility through phosphorylation of different proteins. Sperm are immotile inside the epididymis, in part due to the acidic conditions of the extracellular fluid. Upon ejaculation, spermatozoa are mixed with seminal fluid having an alkaline pH (7.2–8.4) and higher $[HCO_3^-]$. Bicarbonate ions not only help maintain the motility of spermatozoa, but also protect them in the acidic environment of the vagina [3]. These changes constitute the first motility stimulus, and are followed by increases of $[HCO_3^-]$ in upper regions of the female tract, which in addition to further activate motility, contribute to the capacitation process. While the role of HCO_3^- during the acrosome reaction is not as well established, it is now clear that regulation of sperm activity is strongly related to $[HCO_3^-]_i$ levels and pH_i values. However, the identity and interplay of the molecular entities participating in their modulation remain far from clear. For example, despite the

* Corresponding author. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos C.P. 62210, Mexico.

E-mail address: ctrevino@ibt.unam.mx (C.L. Treviño).

importance of CAs in the regulation of pH in almost every cell type, little is known about their subcellular distribution and their physiological role in mammalian sperm. CAs are present in the three domains of life, though encoded by six evolutionarily unrelated gene families, namely α , β , γ , δ , ζ and η -CAs [4]. The sixteen isoforms of α -CAs are the only CAs present in mammals, displaying distinct subcellular and tissue distribution, kinetic properties, and sensitivity to inhibitors [5]. Using different biochemical techniques, it has been shown that isoforms CAI [3], CAII [3,6] and CAXIII [7] are present in human sperm, while isoforms CAII [8], CAIV [9–11] and CAXII [12] are found in mouse sperm. Interestingly, it has been demonstrated that isoform CAIV is transferred to the plasma membrane of non-capacitated mouse sperm as they pass through the epididymis, and that both murine and human non-capacitated sperm respond to increases in extracellular CO₂ with an increase in flagellar beat frequency, an effect that can be blocked by the general CA inhibitor ethoxzolamide (EZA) [11]. Moreover, non-capacitated sperm from CAIV^{-/-} null mice showed a decrease in total CA activity and a reduced response to CO₂ compared to the wild type [11]. Another study led to the proposal that glucose consumption and the regulation of flagellar beat frequency in mouse sperm are interconnected through the generation of HCO₃⁻ from CO₂, a reaction that is mediated by the activity of CAs [13]. Given that various physiological important differences between human and mouse sperm have been established [1,5], and considering the scarcity of studies on CAs in sperm, in this work we set out to compare their distribution and activity between both species using various experimental techniques, along with general and specific CA inhibitors.

2. Materials and methods

2.1. Mouse and human sperm preparation

Mouse spermatozoa were obtained from adult (~3 months old) male CD1 or C57BL/6J mice. The CAII^{-/-} mice colony was obtained from the University of Kaiserslautern, Germany. The animals were killed by cervical dislocation and non-capacitated motile spermatozoa were obtained from epididymal caudas in Whitten's medium pH 7.4 using the swim-up technique [14]. Whitten's medium contains (in mM): NaCl 100, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, glucose 5.5, sodium pyruvate 1, Na-L-lactate 4.8, HEPES 20, NaHCO₃ 24 and CaCl₂ 2. The use of human sperm in this study was approved by the Bioethics Committee at the Biotechnology Institute, UNAM. Ejaculates were obtained by masturbation from healthy donors after 48 h of sexual abstinence. Samples that fulfilled the parameters established by the World Health Organization were used. The semen samples were allowed to liquefy at 37 °C and then the motile spermatozoa were recovered in Ham's F-10 medium pH 7.4 (plus CaCl₂ 2 mM) using the swim-up technique [15]. To generate capacitated cells, mouse and human sperm samples were incubated in their respective media, supplemented with bovine serum albumin 5 mg/mL. Mouse and human sperm samples (either capacitated or non-capacitated) were then adjusted to a concentration of 10 × 10⁶ cells/mL, and incubated at 37 °C with CO₂ 5%/air 95% during at least 40 min or 4 h, respectively. Before each experiment, capacitated human cells were centrifuged during 5 min at 735 × g and resuspended in physiological solution pH 7.4, which contains (in mM): NaCl 94, KCl 4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, sodium pyruvate 1, NaHCO₃ 25, glucose 5, HEPES 30 and Na-L-lactate 10.

2.2. SDS-PAGE and western blot assays

After swim-up, mice and human spermatozoa were washed twice with PBS and centrifuged during 5 min at 735 × g. Pellets

were resuspended in 500 μL of solubilization buffer and the samples were left in constant agitation during 1.5 h at 4 °C. Samples were centrifuged at 16,000 × g during 15 min and proteins in the supernatant were concentrated to 50 μL with centrifugal filters Amicon Ultra 10K (Merck Millipore, Carrigtwohill, Ireland). The concentrated protein was mixed with loading buffer as described previously [15]. The sample was then heated at 70 °C during 10 min and finally centrifuged at 16,000 × g for 10 min. A volume equivalent to the protein content of 30 × 10⁶ cells was loaded per lane on a 10% or 15% SDS-PAGE gel, depending on the condition. Proteins were electrotransferred to an Immobilon P membrane (Millipore, Massachusetts, USA) with a semi-dry electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, Mexico City, Mexico) and the membrane was blocked with fat-free milk 5% v/v. Membranes were probed with anti-CAII, anti-CAXIII (Sigma Aldrich, Mexico City, Mexico) or anti-CAIV (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA). Immunodetection was performed as described elsewhere [15].

2.3. Immunocytochemistry

Mouse and human sperm cells were attached to glass slides and fixed with paraformaldehyde/PBS 4% during 1 h at room temperature (RT), and then washed 3 times with PBS. Cells were permeabilized with Triton X-100/PBS 0.1% for 10 min and washed 3 times with PBS at room temperature. Non-specific sites were blocked with BSA/PBS 5% during 2 h at RT and then incubated overnight at 4 °C in a 1:100 dilution of anti-CAI, anti-CAII or anti-CAXIII. Cells were washed 3 times with PBS at RT, incubated with a secondary antibody coupled to Alexa 488 (Invitrogen, Mexico City, Mexico), and washed again 3 times with PBS; finally, the samples were mounted with Citifluor (Electron Microscopy Sciences, Pennsylvania, USA). The fluorescence of cells was observed in a confocal microscope Zeiss LSM510 META with a 100X objective.

2.4. Determination of CA catalytic activity

Activity of CAs was determined by measuring the ¹⁸O depletion of doubly labeled ¹³C¹⁸O₂ through several hydration and dehydration steps of CO₂ and HCO₃⁻ at RT. The reaction sequence of ¹⁸O loss from ¹³C¹⁸O¹⁸O (*m/z* = 49) over the intermediate product ¹³C¹⁸O¹⁶O (*m/z* = 47) and the end product ¹³C¹⁶O¹⁶O (*m/z* = 45) was monitored with a quadrupole mass spectrometer (OmniStar GSD 320; Pfeiffer Vacuum, Asslar, Germany). The relative ¹⁸O enrichment was calculated from the measured 45, 47 and 49 abundance as a function of time according to the equation: log enrichment = log [49 × 100/(49+47+45)]. For the calculation of CA activity in capacitated mouse spermatozoa, the rate of ¹⁸O degradation was obtained from the linear slope of the logarithmic enrichment over time, using the analysis software OriginPro 9.1. This rate was compared with that of the non-catalyzed reaction. Enzyme activity in units (U) was calculated from these two values as defined previously [16]. For each experiment the cuvette was filled with 6 mL of Whitten's medium without NaHCO₃ and 5 × 10⁶ (either capacitated or non-capacitated) cells. Measurements were performed either in the absence or presence of CA inhibitors.

2.5. Motility assays

Motility of capacitated human and mouse sperm was measured in a Sperm Class Analyzer (SCA Microptic, Barcelona, Spain). Aliquots (10 × 10⁶ cells/mL) were incubated during 30 min at 37 °C with CO₂ 5%/air 95% either with vehicle (DMSO) or with increasing concentrations of the general CA inhibitor EZA. 10 μL of cell sample were placed inside a MicroCell[®] chamber (mouse) or between a glass slide (human) and a coverslip, and the motility parameters

VCL (curvilinear velocity), VSL (straight line velocity), VAP (average path velocity), LIN (linearity), STR (straightness), WOB (wobble), ALH (amplitude of lateral head displacement) and BCF (beat cross frequency) of at least 200 cells per experiment were calculated by the SCA motility software from a stack of images acquired at 50 Hz and with a 10X objective. Analyses of numerical data for trajectories were done with the software SigmaPlot 10 (California, USA).

2.6. Acrosome reaction assays

Acrosome reaction (AR) was promoted in capacitated human and mouse sperm by incubation at 37 °C with CO₂ 5%/air 95% for 30 min with physiological inductors of the AR, namely progesterone (10 μM) for human or *zona pellucida* (ZP; 5 ZP equivalents/μL) for mouse, with or without 15 min pre-incubation in the presence of the general CA inhibitor, EZA 30 μM. Sperm were also incubated with either a Ca²⁺ ionophore ionomycin 10 μM or without any inductor of AR, as positive and negative controls, respectively. Human and mouse sperm were fixed, stained with FITC-PSA (25 μg/mL, PBS pH 7.4) or Coomassie Blue G-250 0.22% v/v, respectively, and AR was evaluated as previously described [17,18].

2.7. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with the freeware KyPlot 2.0 (Tokyo, Japan), and statistical values are shown as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). Student's *t* tests were used for calculation of significant differences and are represented in the figures and the table as: **P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01 and ****P* ≤ 0.001.

3. Results and discussion

3.1. Human and mouse sperm express different CA isoforms

The physiological importance of CAs has been clearly demonstrated in several types of cells [19]; however, little is known about their presence in mammalian sperm and even less is known about their participation in sperm physiology [5]. Some α-CA isoforms have been detected in mammalian sperm (human and mouse) through very different experimental techniques [3,6–9,11,12]; for this reason, in this study we re-explored in a more systematic and uniform approach the presence of the isoforms CAI (cytosolic), CAII (cytosolic), CAIV (GPI-anchored) and CAXIII (cytosolic) in human and mouse sperm through western blot and immunocytochemistry assays. Western blot experiments allowed us to confirm the presence of CAII and to detect for the first time CAXIII in human sperm (Fig. 1A,C), while CAIV, which had not been explored before in these cells, was not found (Fig. 1B). On the other hand CAII, CAIV, and also for the first time CAXIII, were detected in mouse sperm (Fig. 1D–F). CAI was also assayed in both species, but no band with the appropriate molecular weight was detected. On the other hand, our immunocytochemistry assays revealed that CAI, CAII and CAXIII localized to the flagellum of human sperm (Fig. 1G–I). While these three antibodies were also tested in mouse sperm samples (Fig. 1J–L), only CAII was found in this species, both in the flagellum and in the acrosomal region (Fig. 1K).

3.2. Capacitated mouse sperm possess CA activity

A previous study demonstrated that CAs are active in non-capacitated mouse sperm [11]. Given that there are important physiological differences between non-capacitated and capacitated spermatozoa [1], we decided to explore whether CAs are also active in capacitated cells, and if so, whether there is any difference in the total activity of CAs between the two physiological states. Fig. 2A

shows for the first time that CAs are also active in capacitated mouse sperm, and that the magnitude of CA activity is similar to that of non-capacitated cells. Considering that only capacitated cells have the ability to fertilize [1], we decided to use only capacitated mouse cells in all further experiments. As a first approach, ethoxzolamide (EZA), a general inhibitor of CAs, was used at various concentrations, aiming to inhibit CA activity in capacitated mouse cells. As seen in Fig. 2B, EZA significantly diminished CA activity in a dose-dependent manner. In these trials we also tested six different recently designed permeable and impermeable CA inhibitors [19,20] whose expected specific targets are CAVII, CAIX and CAXII. The inhibitory constants of these compounds were determined only for the human CA isoforms [19,20]. In our experiments, the concentrations needed to obtain a significant inhibition of CA activity were above 100 μM in all cases (data not shown), which makes EZA the most potent CA inhibitor in our model among the ones tested. Considering that CAII was the only isoform we detected by both western blot and immunocytochemistry in mouse sperm, and given the availability of CAII^{-/-} null mice, we also explored the contribution of CAII to the total CA activity in these cells (Fig. 2C). We found that total CA activity decreases by 50% in CAII^{-/-} compared to WT cells, which means that CAII contributes to half of the total activity in capacitated mouse cells; and thus other isoforms, such as CAIV [11], are responsible for the remaining activity. Human CA activity could not be measured due to restrictions on the use of human sperm at the University of Kaiserslautern.

3.3. Human sperm motility strongly depends on CA activity

Motility is modulated by different factors including pH_i [5]. It was previously demonstrated that general CA inhibitors such as EZA and acetazolamide decrease beat cross frequency (BCF) in a dose-dependent manner in non-capacitated mouse sperm [11]. In this work we explored the possible participation of CAs in capacitated human and mouse sperm motility analyzing seven different parameters, in addition to BCF. All eight parameters were affected by EZA in a dose-dependent manner in capacitated human cells, and the observed changes were statistically significant starting at EZA 10 nM (Fig. 3A–H). Interestingly, and in contrast to results reported for non-capacitated mouse sperm, among the eight motility parameters analyzed in capacitated mouse sperm, five of them decreased significantly only at EZA 100 μM (Table 1).

Altogether, these data demonstrate that CAs play a preponderant role in the regulation of capacitated human sperm motility; and although we demonstrated that CAs are active in capacitated mouse sperm, they do not seem to play a major role in the regulation of motility (at least under our experimental conditions). These results in capacitated mouse sperm were surprising, considering that inhibition of CAs in non-capacitated cells had been previously reported to alter at least BCF [11]. The difference in the results obtained for mouse sperm might very well be caused by the different physiological state of cells (non-capacitated *versus* capacitated), but it could also be due to the differences in the composition of media (the concentration of pyruvate is five times higher in the medium used in this work).

3.4. CA inhibition potentiates acrosome reaction in capacitated human sperm

We explored the possible participation of CAs in both species during the AR in response to physiological inductors. As shown in Fig. 4A, progesterone 10 μM promotes the AR in capacitated human sperm, albeit small, at a level consistent with previous reports [21], and pre-incubation of 15 min with EZA 30 μM causes a two-fold potentiation effect in the AR. Regarding these results,

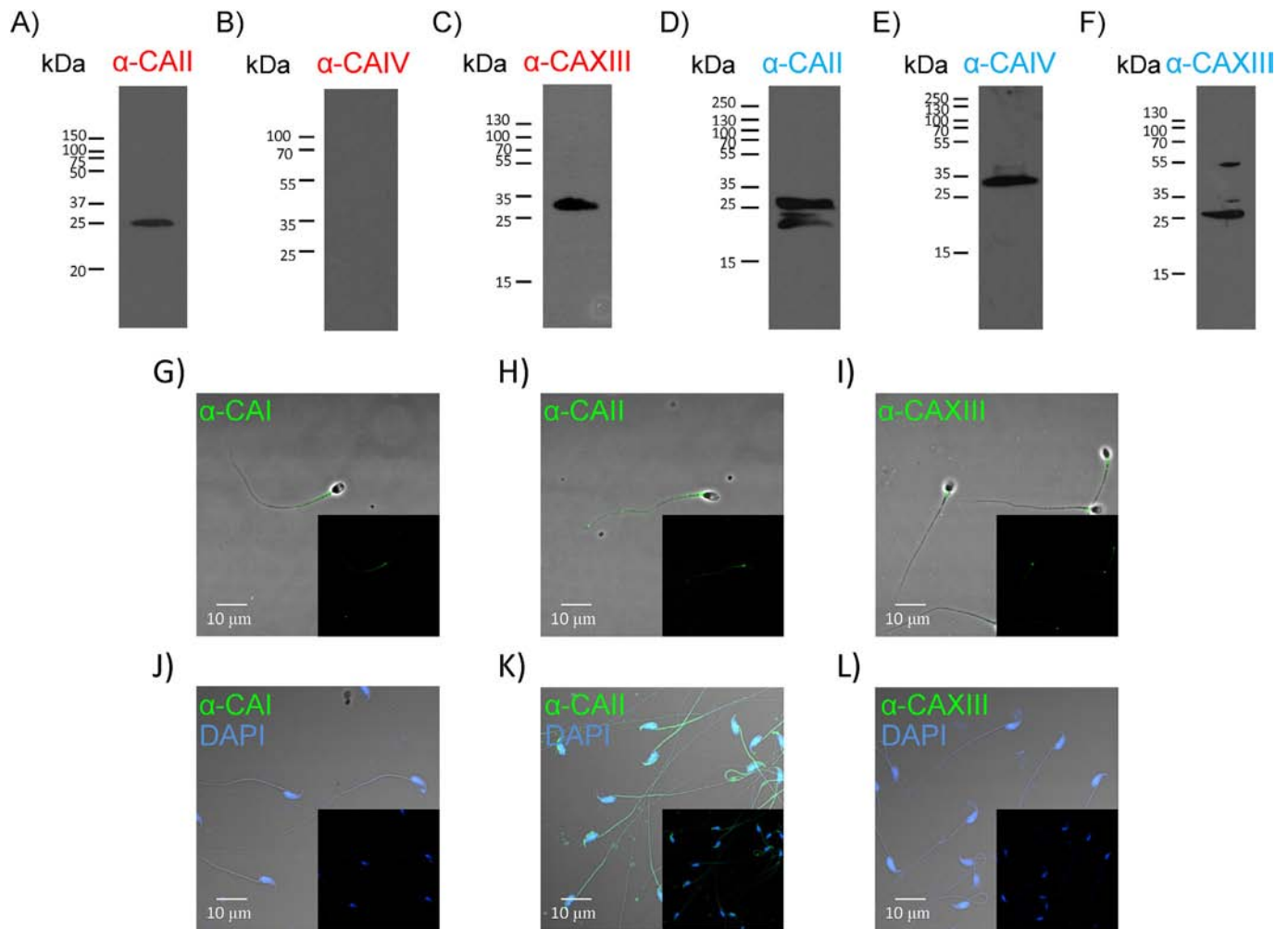


Fig. 1. Different α -CA isoforms are expressed in human and mouse sperm. Solubilized total protein of human and mouse sperm were used for western blot assays and primary antibodies against different α -CAs were tested. A) CAII and C) CAXIII were detected in human sperm, while B) CAIV was not. On the other hand, D) CAII, E) CAIV and F) CAXIII are present in mouse sperm. Immunocytochemistry assays were also performed in sperm from both species. In human sperm G) CAI, H) CAII and I) CAXIII localized to the flagella, and for mouse sperm, only K) CAII was detected in the flagellum as well as in the acrosomal region. Neither J) CAI nor L) CAXII were detected in these cells. The fluorescent dye DAPI stains the nuclei (blue) in mouse sperm only. Images are representative of at least 3 experiments.

progesterone is known to activate CatSper directly in human sperm [22,23] and promote hyperactivated motility, but so far it is unknown whether this activation of CatSper is somehow related to the AR. Presumably, CA inhibition increases the pH_i enough to

activate CatSper, and this in turn allows enough Ca²⁺ to enter the cells, inducing the AR. On the other hand, previous exposure of capacitated mouse cells to EZA 30 μ M did not change the level of the AR induced by zona pellucida (Fig. 4B). Although we detected

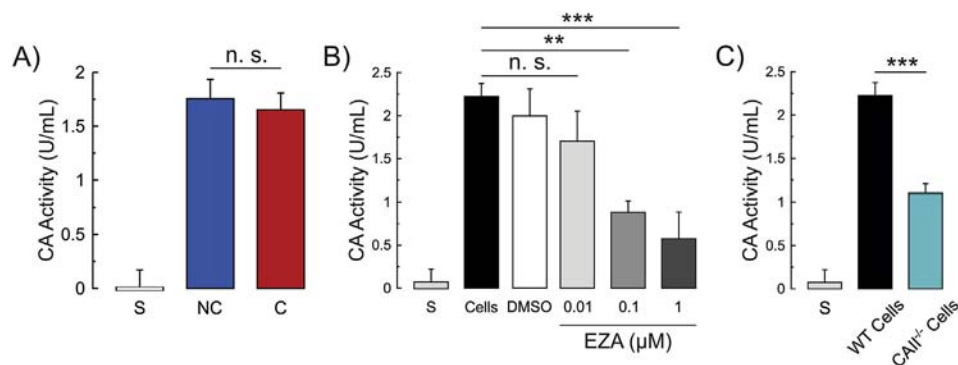


Fig. 2. Capacitated mouse sperm possess CA activity. Motile mouse sperm were obtained by the swim-up technique and CA activity was measured in a quadrupole mass spectrometer in non-capacitated (NC) or capacitated (C) cells. In all the experiments, substrate alone (S), vehicle (DMSO) or both, are shown as controls. A) Non-capacitated and capacitated mouse sperm present CA activity of the same magnitude. B) CA activity decreases in a dose-dependent manner in capacitated mouse sperm when exposed to increasing concentrations of the general CA inhibitor ethoxzolamide (EZA). C) CAII contributes to half of the global CA activity in capacitated mouse sperm. All values shown are mean \pm S.E.M. of at least 3 experiments.

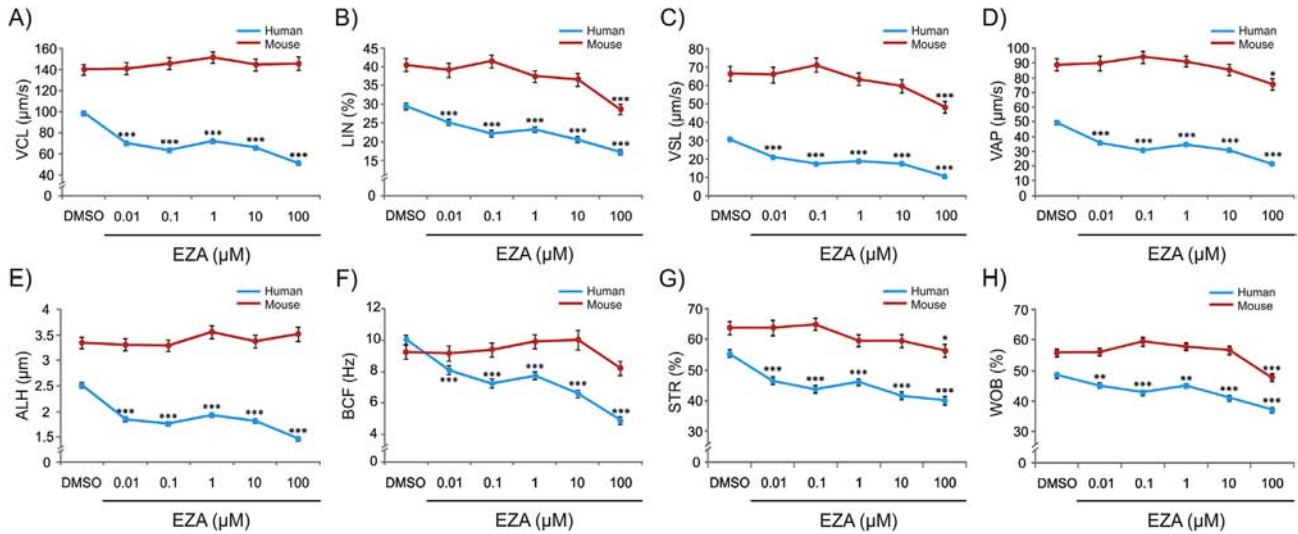


Fig. 3. Motility is affected differentially in capacitated human and mouse sperm by the general CA inhibitor EZA. Motile human and mouse sperm were recovered by the swim-up technique and capacitation was promoted as described previously. Capacitated cells from both species were incubated during 30 min with increasing concentrations of the general CA inhibitor ethoxzolamide (EZA) or vehicle (DMSO) as control. Motility was measured in a Sperm Class Analyzer. Capacitated human sperm showed a potent decrease in the presence of EZA (from 10 nM) of the eight parameters analyzed: A) Curvilinear velocity (VCL), B) Linearity (LIN), C) Straight line velocity (VSL), D) Average path velocity (VAP), E) Lateral head displacement (ALH), F) Beat cross frequency (BCF), G) Straightness (STR) and H) Wobble (WOB). On the other hand, only the highest concentration of EZA (100 μM) had an inhibitory effect in five of the parameters measured in capacitated mouse sperm (Fig. 3B–D, G and H). All values shown are mean ± S. E. M of at least 3 experiments.

Table 1

Mean values for motility parameters in capacitated human and mouse sperm. All values represent the mean ± S.E.M. of at least 3 experiments (at least 200 cells per experiment) after being exposed during 30 min to vehicle (DMSO) or EZA 100 μM. Significant differences are represented in the table as: **P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01 and ****P* ≤ 0.001.

Motility parameter	Capacitated human sperm		Capacitated mouse sperm	
	DMSO	EZA 100 μM	DMSO	EZA 100 μM
VCL	98.65 ± 2.34 μm/s	50.78 ± 1.58 μm/s***	140.19 ± 4.96 μm/s	145.85 ± 6.30 μm/s
VSL	30.84 ± 1.03 μm/s	10.55 ± 0.61 μm/s***	66.63 ± 3.98 μm/s	48.61 ± 3.25 μm/s***
VAP	49.67 ± 1.24 μm/s	21.69 ± 0.84 μm/s***	88.85 ± 4.11 μm/s	75.81 ± 3.77 μm/s*
LIN	29.51 ± 0.84%	17.24 ± 0.75%***	40.53 ± 1.78%	28.65 ± 1.39%***
STR	55.40 ± 1.15%	40.09 ± 1.31%***	63.78 ± 2.14%	56.33 ± 2.06%*
WOB	48.46 ± 0.76%	37.21 ± 0.92%***	55.90 ± 1.13%	47.43 ± 1.30%***
ALH	2.52 ± 0.05 μm	1.46 ± 0.04 μm***	3.35 ± 0.11 μm	3.52 ± 0.14 μm
BCF	10.03 ± 0.27 Hz	4.90 ± 0.23 Hz***	9.25 ± 0.43 Hz	8.23 ± 0.44 Hz

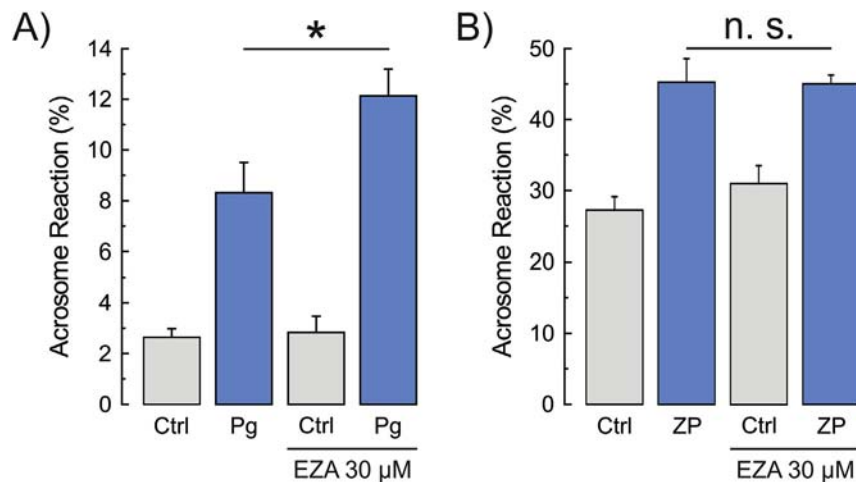


Fig. 4. Acrosome reaction is potentiated in capacitated human sperm through CA inhibition. Motile human and mouse sperm were obtained and capacitated as described previously and then incubated either with progesterone (Pg 10 μM) or 5 ZP equivalents/μL, respectively, during 30 min to promote the acrosome reaction (AR) with or without previous 15 min incubation with ethoxzolamide (EZA) 30 μM. Control (Ctrl) bar represents spontaneous AR. A) Progesterone 10 μM promoted the AR in human sperm, while the preincubation of capacitated cells with EZA increased the percentage of AR. On the other hand, although B) ZP induced the AR in mouse sperm, there was no difference when the cells were pre-incubated with EZA. All values shown are mean ± S.E.M. of at least 3 experiments.

CAII by immunocytochemistry at the acrosomal region of mouse sperm, these results rule out the possible participation of this isoform in the AR induced by ZP. Taken together, these results suggest that the AR signaling pathways are different in human and mouse sperm, although the differences may also be attributable to the different molecules used to induce the AR (a hormone *versus* proteins).

It is also important to mention that CAs can form either physical or functional metabolons with many different anion exchangers, which makes the effect of these enzymes in mammalian sperm physiology even more complex. Although mouse sperm are often used as an experimental model, and the information thus gathered is often extrapolated to human sperm physiology, our results highlight the importance of using both species as experimental models. Indeed, differences between the two species such as the ones we found in this work have also been recently reported elsewhere. Among them, the differential function of certain ion channels and transporters must be mentioned [1,5]. Finally, knowing that CAs play an important role in mammalian sperm physiology, further studies must be done to investigate the presence of others isoforms in sperm, to continue testing specific inhibitors for the different isoforms, and when possible, to elucidate their particular roles in sperm physiology with the use of KO mice.

Acknowledgments

We thank Xochitl Alvarado Affantranger, Holger M. Becker, Hans-Peter Schneider, Elizabeth Mata and Graciela Cabeza for their excellent technical assistance. Special thanks to Marcela B. Treviño for critically reviewing the final manuscript. This work was supported by the Alexander von Humboldt Foundation (Research Linkage Programme to CT), CONACYT-Mexico 128566 to CT and DGAPA/UNAM (IN202212-3 to CT).

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.021>.

References

- [1] A. Darszon, T. Nishigaki, C. Beltran, C.L. Treviño, Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa, *Physiol. Rev.* 91 (2011) 1305–1355, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00028.2010>.
- [2] M.G. Buffone, E.V. Wertheimer, P.E. Visconti, D. Krapf, Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1842 (2014) 2610–2620, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.013>.
- [3] S. Ali Akbar, K.H. Nicolaides, P.R. Brown, Carbonic anhydrase isoenzymes CAI and CAII in semen, decidua, chorionic villi and various fetal tissues, *Early Hum. Dev.* 51 (1998) 205–211, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9692790>.
- [4] S. Del Prete, D. Vullo, G.M. Fisher, K.T. Andrews, S.-A. Poulsen, C. Capasso, et al., Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*—The η -carbonic anhydrases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 4389–4396, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.08.015>.
- [5] T. Nishigaki, O. José, A.L. González-Cota, F. Romero, C.L. Treviño, A. Darszon, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Intracellular pH in sperm physiology, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450 (2014) 1149–1158, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.100>.
- [6] S. Parkkila, K. Kaunisto, S. Kellokumpu, H. Rajaniemi, A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa, *Histochemistry* 95 (1991) 477–482, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1907954>.
- [7] J. Lehtonen, B. Shen, M. Vihinen, A. Casini, A. Scozzafava, C.T. Supuran, et al., Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 2719–2727, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M308984200>.
- [8] P. Mezquita, C. Mezquita, J. Mezquita, Novel transcripts of carbonic anhydrase II in mouse and human testis, *Mol. Hum. Reprod.* 5 (1999) 199–205.
- [9] E. Ekstedt, L. Holm, Y. Ridderstråle, Carbonic anhydrase in mouse testis and epididymis; transfer of isozyme IV to spermatozoa during passage, 2004, pp. 167–173.
- [10] S.B. Sleight, P.V. Miranda, N.-W. Plaskett, B. Maier, J. Lysiak, H. Scoble, et al., Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation, *Biol. Reprod.* 73 (2005) 721–729, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.105.041533>.
- [11] P.M. Wandernoth, M. Raubuch, N. Mannowetz, H.M. Becker, J.W. Deitmer, W.S. Sly, et al., Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm, *PLoS One* 5 (2010) e15061, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015061>.
- [12] P. Halmi, J. Lehtonen, A. Waheed, W.S. Sly, S. Parkkila, Expression of hypoxia-inducible, membrane-bound carbonic anhydrase isozyme XII in mouse tissues, *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 277 (2004) 171–177, <http://dx.doi.org/10.1002/ar.a.20001>.
- [13] N. Mannowetz, P.M. Wandernoth, G. Wennemuth, Glucose is a pH-dependent motor for sperm beat frequency during early activation, *PLoS One* 7 (2012) e41030, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041030>.
- [14] F.A. Navarrete, F.A. García-Vázquez, A. Alvau, J. Escoffier, D. Krapf, C. Sánchez-Cárdenas, et al., Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways, *J. Cell. Physiol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24873> n/a–n/a.
- [15] I. López-González, P. Torres-Rodríguez, O. Sánchez-Carranza, A. Solís-López, C.M. Santi, A. Darszon, et al., Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation, *Mol. Hum. Reprod.* 20 (2014) 619–629, <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gau029>.
- [16] M.R. Badger, G.D. Price, Carbonic anhydrase activity associated with the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942, *Plant Physiol.* 89 (1989) 51–60, <http://dx.doi.org/10.1104/pp.89.1.51>.
- [17] N.L. Cross, S. Meizel, Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm, *Biol. Reprod.* 41 (1989) 635–641, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod41.4.635>.
- [18] J.L. De La Vega-Beltran, C. Sánchez-Cárdenas, D. Krapf, E.O. Hernandez-González, E. Wertheimer, C.L. Treviño, et al., Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 44384–44393, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.393488>.
- [19] C.T. Supuran, Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 168–181, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2467>.
- [20] M. Bozdag, M. Pinard, F. Carta, E. Masini, A. Scozzafava, R. McKenna, et al., Class of 4-sulfamoylphenyl- ω -aminoalkyl ethers with effective carbonic anhydrase inhibitory action and antiglaucoma effects, 2014.
- [21] A. Calogero, γ -Aminobutyric acid (GABA) A and B receptors mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone, *Fertil. Steril.* 71 (1999) 930–936, [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00063-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00063-1).
- [22] P.V. Lishko, I.L. Botchkina, Y. Kirichok, Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm, *Nature* 471 (2011) 387–391, <http://dx.doi.org/10.1038/nature09767>.
- [23] T. Strünker, N. Goodwin, C. Brenker, N.D. Kashikar, I. Weyand, R. Seifert, et al., The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm, *Nature* 471 (2011) 382–386, <http://dx.doi.org/10.1038/nature09769>.

Apéndice B

Artículos, revisiones y capítulos en publicaciones internacionales

Nishigaki T., **José O.**, González-Cota A. L., Romero F., Treviño C. L. and Darszon A. (2014): Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Aug 1;450(3):1149-58.

Intracellular pH (pH_i) regulation is essential for cell function. Notably, several unique sperm ion transporters and enzymes whose elimination causes infertility are either pH_i dependent or somehow related to pH_i regulation. Amongst them are: CatSper, a Ca²⁺ channel; Slo3, a K⁺ channel; the sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger and the soluble adenylyl cyclase. It is thus clear that pH_i regulation is of the utmost importance for sperm physiology. This review briefly summarizes the key components involved in pH_i regulation, their characteristics and participation in fundamental sperm functions such as motility, maturation and the acrosome reaction.

Sánchez-Cárdenas C., Servín-Vences M. R., **José O.**, Treviño C. L., Hernández-Cruz A. and Darszon A. (2014): Acrosome reaction and Ca²⁺ imaging in single human spermatozoa: new regulatory roles of [Ca²⁺]_i. *Biology of Reproduction*. Sep;91(3):67.

The spermatozoa acrosome reaction (AR) is essential for mammalian fertilization. Few methods allow visualization of AR in real time together with Ca²⁺ imaging. Here, we show that FM4-64, a fluorescent dye used to follow exocytosis, reliably reports AR progression induced by ionomycin and progesterone in human spermatozoa. FM4-64 clearly delimits the spermatozoa contour and reports morphological cell changes before, during, and after AR. This strategy unveiled the formation of moving tubular appendages, emerging from acrosome-reacted spermatozoa, which was confirmed by scanning electron microscopy. Alternate wavelength illumination allowed concomitant imaging of FM4-64 and Fluo-4, a Ca²⁺ indicator. These AR and intracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) recordings revealed that the presence of [Ca²⁺]_i oscillations, both spontaneous and progesterone induced, prevents AR in human spermatozoa. Notably, the progesterone-induced AR is preceded by a second [Ca²⁺]_i peak and 40% of reacting spermatozoa also manifest a slow [Ca²⁺]_i rise 2 minutes before AR. Our findings uncover new AR features related to [Ca²⁺]_i.

Mata-Martínez E., **José O.**, Torres-Rodríguez P., Solís-López A., Sánchez-Tusie A., Sánchez Y., Treviño M. B. and Treviño C. L. (2013): Measuring intracellular Ca^{2+} changes in human sperm using four techniques: fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging. *Journal of Visualized Experiments*. May 24;(75):e50344.

Spermatozoa are male reproductive cells especially designed to reach, recognize and fuse with the egg. To perform these tasks, sperm cells must be prepared to face a constantly changing environment and to overcome several physical barriers. Being in essence transcriptionally and translationally silent, these motile cells rely profoundly on diverse signaling mechanisms to orient themselves and swim in a directed fashion, and to contend with challenging environmental conditions during their journey to find the egg. In particular, Ca^{2+} -mediated signaling is pivotal for several sperm functions: activation of motility, capacitation (a complex process that prepares sperm for the acrosome reaction) and the acrosome reaction (an exocytotic event that allows sperm-egg fusion). The use of fluorescent dyes to track intracellular fluctuations of this ion is of remarkable importance due to their ease of application, sensitivity, and versatility of detection. Using one single dye-loading protocol we utilize four different fluorometric techniques to monitor sperm Ca^{2+} dynamics. Each technique provides distinct information that enables spatial and/or temporal resolution, generating data both at single cell and cell population levels.

Treviño C. L., Orta G., Figueiras-Fierro D., De la Vega-Beltrán J. L., Ferreira G., Balderas E., **José O.** and Darszon A. (2013): Chapter 6: Cl^- Channels and Transporters in Sperm Physiology. H. Sawada, N. Inoue, M. Iwano (Eds.), *Sexual Reproduction in Animals and Plants* (pp. 59-84). Tokyo, Japan: Springer Open.

Spermatozoa must decode environmental and cellular cues to succeed in fertilization, and this process relies heavily on ion channels. New observations bring to light the relevant participation of Cl^- channels and anion transporters in some of the main sperm functions. Here we review the evidence that indicates the participation of Cl^- channels in motility, maturation, and the acrosome reaction (AR), and what is known about their molecular identity and regulation. Our better understanding of sperm anion transport will yield tools to handle some infertility problems, improve animal breeding and preserve biodiversity, and develop selective and secure male contraceptives.

Orta G., Ferreira G., **José O.**, Treviño C. L., Beltrán C. and Darszon A. (2012): Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that may participate in the acrosomal reaction. *Journal of Physiology*. 590(11):2659-75.

Motility, maturation and the acrosome reaction (AR) are fundamental functions of mammalian spermatozoa. While traveling through the female reproductive tract, spermatozoa must mature through a process named capacitation, so that they can reach the egg and undergo the AR, an exocytotic event necessary to fertilize the egg. Though Cl^- is important for sperm capacitation and for the AR, not much is known about the molecular identity of the Cl^- transporters involved in these processes. We implemented a modified perforated patch-clamp strategy to obtain whole cell recordings sealing on the head of mature human spermatozoa. Our whole cell recordings revealed the presence of a Ca^{2+} -dependent Cl^- current. The biophysical characteristics of this current and its sensitivity to niflumic acid (NFA) and 4,4-diisothiocyano-2,2-stilbene disulphonic acid (DIDS) are consistent with those displayed by the Ca^{2+} -dependent Cl^- channel from the anoctamin family (TMEM16). Whole cell patch clamp recordings in the cytoplasmic droplet of human spermatozoa corroborated the presence of these currents, which were sensitive to NFA and to a small molecule TMEM16A inhibitor (TMEM16A_{inh}, an aminophenylthiazole). Importantly, the human sperm AR induced by a recombinant human glycoprotein from the zona pellucida, rhZP3, displayed a similar sensitivity to NFA, DIDS and TMEM16A_{inh} as the sperm Ca^{2+} -dependent Cl^- currents. Our findings indicate the presence of Ca^{2+} -dependent Cl^- currents in human spermatozoa, that TMEM16A may contribute to these currents and also that sperm Ca^{2+} -dependent Cl^- currents may participate in the rhZP3-induced AR.

José O., Hernández-Hernández O., Chirinos M., González-González M. E., Larrea F., Almanza A., Felix R., Darszon A. and Trevino C. L. (2010): Recombinant human ZP3-induced sperm acrosome reaction: evidence for the involvement of T- and L-type voltage-gated calcium channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 395(4):530-4.

For successful fertilization mammalian spermatozoa must undergo the acrosome reaction (AR), an exocytotic event that allows this cell to penetrate the outer layer of the oocyte, the zona pellucida (ZP). Four glycoproteins (ZP1-ZP4) compose the human ZP, being ZP3 the physiological inductor of the AR. This process requires changes in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) involving not fully understood mechanisms. Even in mouse sperm, the pharmacologically documented participation of voltage-gated Ca^{2+} (Ca_V) channels and store-operated channels (SOCs) in the ZP-induced AR is being debated. The situation in human sperm is even less clear due to the limited availability of human ZP. Here, we used recombinant human ZP3 (rhZP3) produced in baculovirus-infected Sf9 cells to investigate the involvement of Ca_V channels in the human sperm AR. Our findings showed that Ni^{2+} and mibefradil at concentrations that block T-type or Ca_V3 channels, and nimodipine and diltiazem that block L-type or Ca_V1 channels, significantly inhibited the rhZP3-initiated AR. On the other hand, the AR was insensitive to concentrations of ω -Agatoxin IVA, ω -Conotoxin GVIA and SNX-482 that block P/Q, N and R-type channels, respectively (Ca_V2 channels). Our overall findings suggest that Ca_V1 and Ca_V3 channels participate in human sperm AR. Consistent with this, we detected in human sperm transcripts for the Ca_V1 auxiliary subunits, $\alpha_2\delta$, β_1 , β_2 and β_4 , but not the neuronal specific isoforms β_3 and γ_2 .