



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CAMBIOS DE pH INTRACELULAR DURANTE LA CAPACITACIÓN DE
ESPERMATOZOIDES HUMANOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

José Arturo Matamoros Volante

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Adán Guerrero Cárdenas
(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Carlos Muñoz Garay
(Instituto de Ciencias Físicas, UNAM)

Cuernavaca, Morelos, Octubre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 (Consortio de la Fisiología del Espermatozoide) del Departamento de Biología de Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México), bajo la supervisión de la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz.

FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis contó con los siguientes aportes económicos:

- Beca de manutención por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), No. de CVU: 700334. No. de apoyo: 416400.
- Apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) para la asistencia a congreso internacional y una estancia de investigación.
- Beca mixta del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de una estancia de investigación en la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- A la Red de Macrouniversidades de América Latina y el Caribe (RED MACRO) para realizar una estancia de investigación en la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Se recibió financiamiento de CONACyT-Fronteras de la ciencia 71 y DGAPA/UNAM (IN203116 para Claudia Treviño).

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A mi tutora la **Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz** por sus conocimientos, guía, consejos y apoyo fueron esenciales para el desarrollo de este trabajo.
- A los doctores miembros del consorcio de fisiología del espermatozoide: **Alberto Darszon, Takuya Nishigaki, Carmen Beltrán, Julio Cesar Chávez, Ignacio López**, por sus conocimientos, apoyo y retroalimentación fueron primordiales para la realización de esta tesis, así como en mi entrenamiento científico.
- A los miembros de mi comité tutor: **Dr. Adán Guerrero Cárdenas** y **Dr. Carlos Muñoz Garay** por haber sido parte fundamental durante estos dos años, los consejos recibidos se ven reflejados en la calidad del trabajo.
- A los miembros de mi comité revisor, doctores **Liliana Pardo, Denhi Schnabel, Arturo Pimentel, Ricardo Félix** y **Mayel Chirinos** por sus valiosos comentarios y aportaciones a este proyecto.
- A la asesoría técnica de los miembros del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide: **M. en C. Paulina Torres Rodríguez, Biol. José Luis de la Vega Beltrán** y **M. en C. Fabio Francisco Herrera Rodríguez** por su invaluable participación en múltiples aspectos claves para la realización del proyecto.
- A la asesoría técnica de los miembros del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LMNA, UNAM): **M. en C. Andrés Saralegui Amaro, Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera, Q.F.B. Xóchitl Alvarado Affantranger, Dr. Adán Guerrero Cárdenas**. Por su excepcional ayuda y disposición para la utilización de los equipos de microscopía que fueron cruciales para el desarrollo del trabajo.
- A la **B.A. Dip. Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth** por su invaluable labor y asesoría en servicios bibliotecarios.
- A los miembros del Servicio de Computo del Instituto de Biotecnología, UNAM: **Juan Manuel Hurtado, Roberto Rodríguez** y **Arturo Ocádiz** por su ayuda en el mantenimiento de los servicios computacionales requeridos en las labores diarias.

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia, porque todo su esfuerzo también está plasmado en este nuevo logro. A mi madre Herlinda quien con su cariño, fortaleza y apoyo me han guiado a ser la persona que soy ahora. A mi padre Arturo, quien siempre me ha apoyado, motivado y guiado a seguir mi propio camino. A mi hermana Karla, porque a pesar de no entender nada de la vida, siempre me ha apoyado incondicionalmente. No puedo ser más feliz por tenerlos en mi vida.
- A mi tutora Claudia Treviño por que la entrega, dedicación, pasión y sobre todo la enorme calidad humana han sido indispensables para mi desarrollo profesional. Por abrirme las puertas de su laboratorio, por confiar en mí, por todas las oportunidades que me brindó, por ser una excelente tutora y científica. Me siento sumamente orgulloso de estar bajo su tutela y de poder seguir trabajando juntos.
- A mis buenos amigos y compañeros del laboratorio: Joseph, Gaby A., Pau, Gaby C., Olga, Fabio, Alberto, Josué, Julio, Sandra, Francisco, Yolo, Ahiezer, por los momentos tan geniales que hemos pasado. A las personas geniales que conocí cuando vinieron de visita, Ana, Aideé, Ayelen, y a mi argentina favorita Lis.
- Al pueblo mexicano, quienes son nuestros patronos, quienes con su esfuerzo diario nos permite hacer este trabajo. Confío que algún día, mi trabajo pueda hacer un poco de retribución a todos ellos.

CONTENIDO

1. RESUMEN	8
2. SUMMARY	9
3. INTRODUCCIÓN	10
3.1. Fecundación	10
3.2. El espermatozoide	10
3.3. Procesos implicados en la fecundación: la capacitación	12
3.4. El pH_i durante el proceso de capacitación	13
3.5. Mecanismos de regulación del pH intracelular en el espermatozoide	13
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVOS	22
6.1. General	22
6.2. Particulares	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1. Materiales	22
7.2. Medios de Cultivo	23
7.3. Obtención de las muestras	23
7.4. Incorporación de colorantes	23
7.5. Protocolo de evaluación de cambios de pH_i durante capacitación	24
7.6. Medición de PY y el pH_i mediante microscopía de flujo	24
7.7. Procesamiento de imágenes obtenidas mediante microscopía de flujo	25
7.8. Evaluación del perfil farmacológico de la regulación del pH_i	26
7.9. Análisis de movilidad	26
7.10. Análisis estadístico	27
8. RESULTADOS	29
8.1. Segmentación de las imágenes para medir regiones subcelulares en el espermatozoide	29
8.2. Selección de poblaciones	30
8.3. Comprobación del proceso de segmentación: fosforilación de residuos de tirosinas asociado a capacitación	34
8.4. Microscopía de flujo para evaluar cambios en el pH intracelular	35
8.5. Incubación en medio no capacitante no induce cambios en el pH_i	36
8.6. Cambios de pH_i asociados a la capacitación	37

8.7.	La entrada de bicarbonato es indispensable para producir el aumento de pH_i asociado a capacitación.....	40
8.8.	Participación del canal Hv1 en la regulación del pH_i	42
8.9.	Las entidades moleculares que participan en la regulación del pH_i están involucradas en el control de la movilidad hiperactivada.....	43
8.10.	Correlación entre el aumento de células con pH_i alto y las células hiperactivadas....	45
9.	DISCUSIÓN	46
10.	CONCLUSIONES	52
11.	PERSPECTIVAS	52
12.	REFERENCIAS	52
13.	APÉNDICES	61
13.1.	Análisis de imágenes obtenidas por microscopía de flujo (AMNIS).....	61
13.2.	Análisis espermático asistido por computadora (CASA).....	64

1. RESUMEN

Los espermatozoides de mamíferos deben pasar cierto tiempo dentro del tracto genital femenino con el fin de adquirir la capacidad de fecundar al ovocito. A este proceso se le conoce como capacitación e involucra diversos cambios morfo-fisiológicos en el espermatozoide, que incluye la elevación del pH intracelular. Muchas de las proteínas y vías de señalización esenciales para la fecundación son pH-dependientes. No obstante, se desconoce a detalle los mecanismos moleculares que controlan el pH en los espermatozoides. En el presente trabajo se desarrolló una novedosa estrategia utilizando citometría de flujo basada en imágenes para evaluar los cambios de pH durante capacitación con resolución espacio-temporal a nivel de célula única y poblacional en espermatozoides humanos. Utilizando una molécula fluorescente sensible a pH se compararon espermatozoides incubados en medio no capacitante con células incubadas en medio suplementado con albúmina y bicarbonato (capacitante) en diferentes tiempos. Se encontró que el pH aumenta en una subpoblación de espermatozoides (~ 15 %) desde el primer contacto con el medio capacitante. A los 30 minutos se alcanza el máximo de la población con pH más alcalino (~ 20 %), y después de ese momento decrece hasta llegar a ~ 10 % la cual se mantiene prácticamente constante hasta las 6 h. En contraposición, espermatozoides incubados por 6 h en medio no capacitante no presentaron dicho aumento. Se encontró que este aumento de pH se da de manera diferencial en espacio ya que este solo ocurre en la región de la cabeza y la pieza principal, mientras que en la pieza media se mantiene constante durante todo el tiempo de capacitación. Se utilizaron herramientas farmacológicas para dilucidar los procesos y las entidades moleculares que participan en la regulación del pH. Se encontró que la entrada de bicarbonato es esencial para que se dé la alcalinización durante capacitación. Asimismo, al bloquear el canal CFTR se abole dicha alcalinización pero solamente después de 1 h de incubación con el fármaco. Por otro lado, se obtuvo la primera evidencia de la participación del canal de protones Hv1 en el control del pH en espermatozoides humanos. Al bloquear este canal no se presentó la alcalinización asociada a capacitación. Adicionalmente, mediciones de movilidad revelaron que el tanto el bloqueo del CFRT como del Hv1 impide que se desarrolle la movilidad hiperactivada. Estos resultados sugieren la existencia de una regulación fina y altamente compartimentada del pH intracelular durante la capacitación que es regulada por múltiples entidades moleculares que está directamente relacionada con la hiperactivación.

2. SUMMARY

Mammalian sperm cells must spend some time inside the female reproductive tract to gain the ability to fertilize. This process is known as capacitation and involves several morphophysiological changes including intracellular alkalization. Some of the main proteins and signaling pathways involved in fertilization are pH-dependent; nevertheless, there is not a complete knowledge about the molecular mechanisms that control intracellular pH in spermatozoa. In this work we developed a novel strategy using image-based flow cytometry to evaluate intracellular pH changes in a large population of cells, at subcellular level in different stages of capacitation. Using human spermatozoa loaded with a pH-sensitive fluorescent molecule we compared the intracellular pH levels of cells incubated in non-capacitating media with cells incubated in capacitation conditions (supplemented with albumin and bicarbonate) from 0 to 6 h. We found a small spermatozoa population (~15%) that becomes more alkaline since the first moment of incubation with capacitation media. This alkaline population reaches its maximum at 30 min (~20%), followed by a reduction of this population reaching the minimum at 60 min (~10%) which remains constant until the sixth hour of capacitation. The increase in pH was regionalized since only the head and principal piece regions showed this alkalization, but not the midpiece where the pH remained constant during all the capacitation time. We tried to distinguish the proteins and processes involved in this capacitation-associated alkalization, and we found that the presence of bicarbonate is essential for the pH increase. Using a specific inhibitor for CFTR we abolished the capacitation-associated alkalization after >1 h of blocking, and the effect of CFTR blocking was observed mainly in the head. We provide evidence for the first time that the Hv1 proton channel is involved in this capacitation-associated pH increase. The effect of antagonist against Hv1 only had effect in the flagellum region. We also performed motility measurements, and found that bicarbonate transport, CFTR and Hv1 activities are necessary for develop hyperactivated motility. These results indicate the existence of highly compartmentalized and regulated processes during capacitation, and suggest a functional relationship between pH regulation and motility.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Fecundación

La fecundación es un proceso crucial para todos los organismos de reproducción sexual. La unión del gameto femenino (ovocito) y el masculino (espermatozoide) permite la combinación de dos genomas, dando origen a un nuevo organismo con características genéticas únicas, que sirven como fuente de variación para asegurar la preservación de la especie (Okabe, 2013).

El diálogo entre ambos gametos es de vital importancia, no obstante, el presente trabajo se enfocará principalmente en estudiar algunos de los mecanismos que permiten el funcionamiento adecuado de los espermatozoides.

3.2. El espermatozoide

Los espermatozoides se originan en los túbulos seminíferos dentro del testículo durante el proceso de espermatogénesis. Durante éste, las células pluripotenciales llamadas espermatogonias proliferan y se diferencian, dando origen a células haploides altamente especializadas, las cuales una vez diferenciadas salen de los túbulos y se dirigen al epidídimo en donde maduran (Darszon *et al.*, 2011).

Los espermatozoides maduros presentan una estructura compleja, que usualmente se divide en dos regiones, la cabeza y el flagelo. En seguida se discutirá en detalle las diferencias morfológicas y funcionales que ambas poseen.

3.2.1. Cabeza

La cabeza de los espermatozoides humanos tiene una forma ovoide y aplanada, con una longitud de alrededor de 4 μm . En su interior se localizan el acrosoma, el núcleo y la envoltura nuclear redundante (Pesch y Bergmann, 2006) (Fig. 1).

El acrosoma es un tipo de vesícula especial que contiene, entre otros componentes, enzimas hidrolíticas, cuya liberación es indispensable para que ocurra la fecundación (Darszon *et al.*, 2011). El núcleo almacena el material genético haploide, el cual se encuentra altamente compactado debido a que las histonas se han sustituido en su mayoría por protaminas (Balhorn, 2007). Finalmente, se encuentra una reminiscencia de la envoltura nuclear formada durante el

proceso de espermatogénesis, cuya función propuesta es como un reservorio de calcio (Ho y Suarez, 2003).

3.2.2. Flagelo

La función primordial del flagelo es generar el movimiento que le permitirá al espermatozoide desplazarse para alcanzar el sitio donde se encuentra el ovocito y así poder fusionarse para entregar el material genético contenido en el núcleo. En espermatozoides humanos, el flagelo se encuentra contiguo a la envoltura nuclear redundante, mide entre 40 y 50 μm de longitud, y se divide en tres piezas: media, principal y final (Pesch y Bergmann, 2006) (Fig. 1).

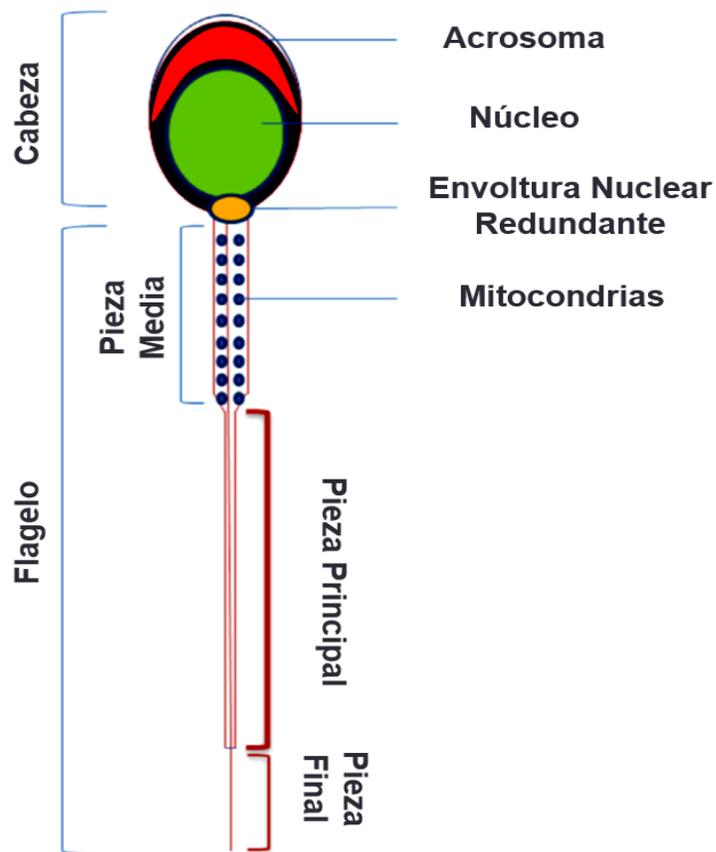


Figura 1. Esquema de la morfología y regiones presentes en el espermatozoide humano. En la cabeza se ilustran el núcleo, el acrosoma y la envoltura nuclear redundante. En el flagelo se identifican la pieza media (donde se encuentran las mitocondrias), principal y final. Modificado de (Singh y Rajender, 2015)

La pieza media es la porción más cercana a la cabeza, en ella se localizan entre 25 y 100 mitocondrias ordenadas de forma helicoidal de tal manera que rodean al axonema (Bahr y Engler, 1970; John *et al.*, 2000). Este último está conformado por una estructura de 9 pares de

microtúbulos rodeando a un par central (estructura 9 + 2) que continua hasta el final de la pieza principal. En la pieza final, la estructura tipo 9 + 2 se pierde y en su lugar se encuentran 18 microtúbulos simples (Pesch y Bergmann, 2006; Inaba, 2011).

El movimiento del flagelo depende de la unión de los compoentes del axonema con las dinein-ATPasas (Mohri *et al.*, 2012). Para que se genere el movimiento flagelar, se requiere de una regulación fina del estado de fosforilación de las proteínas del axonema, así como de las concentraciones de iones como Ca^{2+} y H^+ (Mohri *et al.*, 2012).

3.3. Procesos implicados en la fecundación: la capacitación

En 1951 los trabajos de Austin *et al.* y Chang, demostraron que para que los espermatozoides sean capaces de fecundar deben de pasar por un proceso denominado capacitación. Este proceso se lleva a cabo en el tracto genital femenino (TGF) e implica una serie de cambios bioquímicos y estructurales (Austin y Sakkas, 1951; Chang, 1951). Tras años de estudio, se ha determinado que durante este proceso ocurren fenómenos como: remoción del colesterol en la membrana plasmática (Gadella y Leahy, 2015), aumento de las concentraciones de HCO_3^- , Ca^{2+} , y pH intracelular (Darszon *et al.*, 2011), activación de múltiples vías de señalización que incluyen la fosforilación de diferentes proteínas, especialmente en residuos de tirosina (Ickowicz *et al.*, 2012), hiperpolarización de la membrana plasmática (Lopez-Gonzalez *et al.*, 2014), entre otros.

Durante la capacitación los cambios morfofisiológicos tienen como consecuencia, entre otros, dos procesos muy importantes sin los cuales no ocurriría la fecundación *in vivo*: la movilidad hiperactivada (HA), y la reacción acrosomal (RA). La HA se caracteriza por mostrar un patrón de nado que presenta un batido flagelar asimétrico de gran amplitud que permite a los espermatozoides tener un mayor desplazamiento en el ambiente viscoso del oviducto, desanclarse del epitelio de la zona del istmo, para para pasar a través del cúmulo oóforo que rodea al ovocito, entre otras cosas (Suarez, 2008a; Darszon *et al.*, 2011). Asimismo, la RA consiste en la exocitosis del acrosoma, en donde quedan expuestas proteínas receptoras y fusogénicas, que permiten el reconocimiento y unión especie específico con el ovocito (Darszon *et al.*, 2011).

3.4. El pHi durante el proceso de capacitación

El control del pH intracelular (pHi) en el espermatozoide tiene una gran relevancia para que la capacitación ocurra de una manera adecuada, e inclusive, se considera que la alcalinización intracelular es un indicador del estado de capacitación (Nishigaki *et al.*, 2014). En las secciones siguientes, se comentan evidencias que se tienen con respecto a la participación del pHi en el proceso de fecundación o capacitación, así como una breve descripción de las proteínas que pueden participar en el control del pHi.

Existen pocos reportes en donde se compare el pHi en espermatozoides humanos capacitados contra aquellos directo del plasma seminal o incubados en medio no capacitante. Cross y Razy-Faulkner, midieron el pHi a nivel poblacional mediante espectrofotometría utilizando la sonda fluorescente sensible a pH BCECF y reportaron que existe un aumento de pHi en espermatozoides capacitados durante 24 h (Cross y Razy-Faulkner, 1997). Años más tarde, se demostró mediante citometría de flujo, y utilizando la misma sonda (BCECF), que existe un aumento en el pHi en una población de espermatozoides capacitados durante 13 h en comparación con células incubadas en medio que no promueve la capacitación (Lopez-Gonzalez *et al.*, 2014).

Aunque se ha demostrado la presencia de un aumento del pHi durante la capacitación de espermatozoides humanos, la función fisiológica así como los mecanismos moleculares que la controlan aún no han sido del todo descritos. En las siguientes secciones se provee evidencia y se discute la importancia de la alcalinización como factor necesario para modular la actividad de diferentes canales iónicos (tanto de Ca^{+2} o K^{+}) que son indispensables para la fecundación, de igual manera, la ausencia de algunas de las proteínas que podrían participar en el control del pHi produce infertilidad.

3.5. Mecanismos de regulación del pH intracelular en el espermatozoide

De acuerdo a la literatura, es posible que la homeóstasis del pH intracelular en los espermatozoides esté controlada por dos procesos: 1) el metabolismo del bicarbonato, y 2) acarreamiento de protones. A continuación, se hace un resumen de los mecanismos de regulación que se han reportado para humano, así como algunos ejemplos en otras especies.

3.5.1. Metabolismo de bicarbonato: transportadores de bicarbonato y anhidrasas carbónicas

Los cambios en la $[\text{HCO}_3^-]_i$ pueden causar una alcalinización intracelular debido al equilibrio de la siguiente reacción: $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, la cual es catalizada por enzimas denominadas anhidrasas carbónicas (CAs por sus siglas en inglés). De acuerdo al principio de Le Chatelier, la dirección de la reacción depende de las concentraciones de los sustratos. Un aumento en la $[\text{HCO}_3^-]_i$, produciría una alcalinización intracelular, al utilizar los protones para generar CO_2 y agua. Dicho aumento puede ser causado por la acción de transportadores localizados en la membrana plasmática, o bien, el CO_2 que difunde libremente puede ser transformado a HCO_3^- por acción de las CAs, y dependiendo de las concentraciones puede ser utilizado nuevamente como sustrato de la reacción (Casey, 2006; Liu *et al.*, 2012).

Para el caso de las anhidrasas carbónicas, se ha reportado la expresión de algunas de ellas en espermatozoides de humano y ratón, incluidas la CAI en la pieza media (Ali Akbar *et al.*, 1998; José *et al.*, 2015), y CAII en la cabeza y pieza media (Parkkila *et al.*, 1991; Mezquita, 1999; José *et al.*, 2015). Mientras que en ratones se ha encontrado la expresión de la CAIV en las tres diferentes regiones del espermatozoide (Wandernoth *et al.*, 2010), la CAXII (Halmi *et al.*, 2004) y la CAXIII en la cabeza y la pieza media (Lehtonen *et al.*, 2004). Su función exacta aún no se conoce totalmente, pero el uso de bloqueadores generales contra estas enzimas generan efectos negativos en la movilidad en espermatozoides humanos (José *et al.*, 2015).

Nuestro grupo de trabajo ha identificado la expresión de algunas proteínas transportadoras de HCO_3^- para el caso del espermatozoide de humano, como el canal CFTR que participa activamente en el control del pH_i y el potencial de membrana en espermatozoides humanos durante la capacitación (Puga-Molina *et al.*, 2016), así como del intercambiador SLC26A3 y el SLC26A6 (Puga-Molina, datos no publicados). Por su parte, en otras especies se han identificado la expresión y participación tanto del CFTR y los transportadores SLC26A3 y SLC26A6 en el control del pH_i , y el potencial de membrana (Hernández-González *et al.*, 2007; Chávez *et al.*, 2012). Cabe destacar que estudios de inmunolocalización han detectado la presencia de estas proteínas únicamente en la zona de cabeza y la pieza media (Chávez *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha detectado la expresión del transportador SLC26A8 en la región del *annulus* (región conectora entre la pieza media y la pieza principal), ratones que carecen de este transportador son infértiles debido a la falta de movilidad y deficiencias morfológicas en el

espermatozoide (Touré *et al.*, 2007). De igual manera, se ha detectado expresión del intercambiador aniónico SLC4A2/AE2 en la región de la cabeza, no obstante, la función exacta en el espermatozoide aún no se ha determinado (Parkkila *et al.*, 1993; Medina *et al.*, 2003). También, se ha reportado la presencia del co-transportador sodio bicarbonato (NBC), cuya activación está involucrada en la hiperpolarización, y la fosforilación de proteínas durante la capacitación y posiblemente en el control del pH_i (Demarco *et al.*, 2003a), aunque su localización aún no se ha determinado.

3.5.2. Acarreadores de protones

En el caso de las proteínas acarreadoras de protones, se ha demostrado la expresión del canal de protones Hv1 restringida en la pieza principal de espermatozoides humanos. De manera interesante, los espermatozoides capacitados presentaron una mayor corriente saliente de protones, en comparación con aquellos incubados en medio no capacitante (Lishko *et al.*, 2010). Lishko y colaboradores postulan que los bajos niveles de movilidad que presentan los espermatozoides dentro del epidídimo y post-eyaculación se deben, entre otras cosas, a la alta concentración de zinc en este órgano y en plasma seminal, lo que contribuiría a reducir o inactivar al canal Hv1, lo que produciría una disminución del pH_i . Una vez que el espermatozoide se encuentra en el TGF la concentración de zinc disminuye, lo que removería el bloqueo del canal produciendo una salida de protones y una alcalinización intracelular que podría estar relacionada con la vía de señalización que culmina con la activación de la movilidad (Lishko y Kirichok, 2010; Lishko *et al.*, 2010).

En espermatozoides de ratón se ha encontrado la expresión de proteínas pertenecientes a la familia de intercambiadores Na^+/H^+ (NHEs). La activación de estos intercambiadores implica que por cada ion de Na^+ que entra a la célula, un protón se libera al espacio extracelular, generando así una alcalinización. Se ha reportado la expresión del NHA1 (Liu *et al.*, 2010) específica en testículo, y el NHA2, (Liu *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2016) ambos localizados en la región del flagelo. Cabe destacar que ratones que carecen de ambos intercambiadores son infértiles (Chen *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha encontrado la expresión de otro miembro de esta familia, llamado Intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE) cuya localización también está restringida al flagelo, y su ausencia genera infertilidad (Wang *et al.*, 2003). Por lo anterior, se ha postulado que el sNHE es la entidad principal que controla el pH_i durante la capacitación en espermatozoides de ratón, mientras que en humanos no se ha

detectado su participación por lo que se postula que el canal Hv1 es el principal responsable (Miller *et al.*, 2015).

Otras proteínas acarreadoras de protones que pueden participar en el control del pH_i son algunas bombas como la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA4). Esta proteína tiene como función mantener el balance de calcio intracelular mediante el bombeo de este ion hacia el espacio extracelular (Singh y Rajender, 2015). Se ha demostrado que tras la hidrólisis de ATP, la PMCA permite el ingreso de dos protones por cada ion de calcio liberado hacia el exterior celular (Niggli *et al.*, 1982), por lo cual puede participar como un mecanismo de acidificación celular. Su localización es únicamente en la región de la pieza principal, y así como el sNHE y otras proteínas, su ausencia genera infertilidad en ratones (Okunade *et al.*, 2004; Schuh *et al.*, 2004; Al-Dossary *et al.*, 2015; Andrews *et al.*, 2015). Asimismo, se ha reportado la expresión de la bomba de protones vacuolar (V-ATPasa), la cual se postula como un importante regulador del pH en el interior del acrosoma en espermatozoides de ratón (Sun-Wada *et al.*, 2002), su activación provocaría una acidificación intra-acrosomal, y la consiguiente alcalinización citoplasmática.

3.5.3. Localización diferencial de las proteínas reguladoras del pH_i

Como se mencionó anteriormente, los patrones de expresión de las proteínas reguladoras del pH intracelular exhiben una localización diferencial, es decir, los transportadores de HCO_3^- en conjunto con las anhidrasas carbónicas, se localizan principalmente en la cabeza y pieza media; mientras que, los acarreadores de protones se localizan preferentemente en la pieza principal (Fig. 2, Tabla 1, revisado en Liu *et al.*, 2012). Aunado a la heterogeneidad funcional de todas estas proteínas, su localización diferencial sugiere que existe una regulación heterogénea del pH_i a nivel espacial. No obstante, lo anterior, aún no ha sido comprobado.

Tabla 1. Posibles reguladores del pH_i en el espermatozoide de mamífero

Proteína	Sp	Loc.	Función	Referencias
SLC26A3	R, H	PM, RA	Al bloquearlo se impide la hiperpolarización, así como el aumento de [Cl ⁻] _i y pH _i asociados a la capacitación.	(Chávez <i>et al.</i> , 2012), Puga, <i>et al.</i> , (NP)
SLC26A6	R, H	PM, C	No participa en el aumento de [Cl ⁻] _i ni la hiperpolarización. Al bloquearlo no hay aumento de pH _i .	(Chávez <i>et al.</i> , 2012), Puga, <i>et al.</i> , (NP)
SLC26A8	R	An	Ratones mutantes son estériles debido a defectos morfológicos y en la movilidad.	(Touré <i>et al.</i> , 2007)
SLC4A2	Rt, H	SE	N.D.	(Parkkila <i>et al.</i> , 1993)
NBC	R	ND	Participa en la hiperpolarización y en la fosforilación de proteínas, asociadas a la capacitación.	(Demarco <i>et al.</i> , 2003b)
CFTR	R, H	SE, PM	Al bloquearlo se observan los mismos efectos que se presentan al bloquear al SCL26A3.	(Hernández-González <i>et al.</i> , 2007), (Xu <i>et al.</i> , 2007), (Chávez <i>et al.</i> , 2012), (Puga Molina <i>et al.</i> , 2017)
CA I	R, H	MP	Posible participación en movilidad.	(Ali Akbar <i>et al.</i> , 1998; José <i>et al.</i> , 2015)
CA II	R, H	MP, RA	Genera más de la mitad de la actividad de las CAs. Posible participación en movilidad.	(Parkkila <i>et al.</i> , 1991; José <i>et al.</i> , 2015)
CA IV	R	SE, RA, PP	Posible participación en la movilidad y en la respuesta a CO ₂ extracelular.	(Wandernoth <i>et al.</i> , 2010)
CA XII	R	RA	N.D.	(Halmi <i>et al.</i> , 2004)
CA XIII	R, H	PM	Posible participación en movilidad.	(Lehtonen <i>et al.</i> , 2004; José <i>et al.</i> , 2015)
sNHE	R	PP	Posible regulador del pH _i la capacitación. Ratones carentes de esta proteína son estériles.	(Wang <i>et al.</i> , 2003)
Hv1	H	PP	Posible regulador del pH _i en la capacitación	(Lishko <i>et al.</i> , 2010)
PMCA4	R, H	C, RA, MP, PP	Participa en la regulación de la homeostasis de calcio intracelular. Su ausencia genera infertilidad debido a problemas de movilidad.	(Okunade <i>et al.</i> , 2004; Schuh <i>et al.</i> , 2004), (Andrews <i>et al.</i> , 2015) (Al-Dossary <i>et al.</i> , 2015)
V-ATPasa	R	RA	Principal regulador del pH acrosomal.	(Sun-Wada <i>et al.</i> , 2002)

Tabla 1. Especie (Sp): R=ratón, H=humano, Rt=rata. Localización (Loc.): RA=región acrosomal, SE=segmento ecuatorial, PM=pieza media, An=*Annulus* C=Cabeza, PP=pieza principal. N.D.=no determinado. Referencias: NP=datos no publicados.

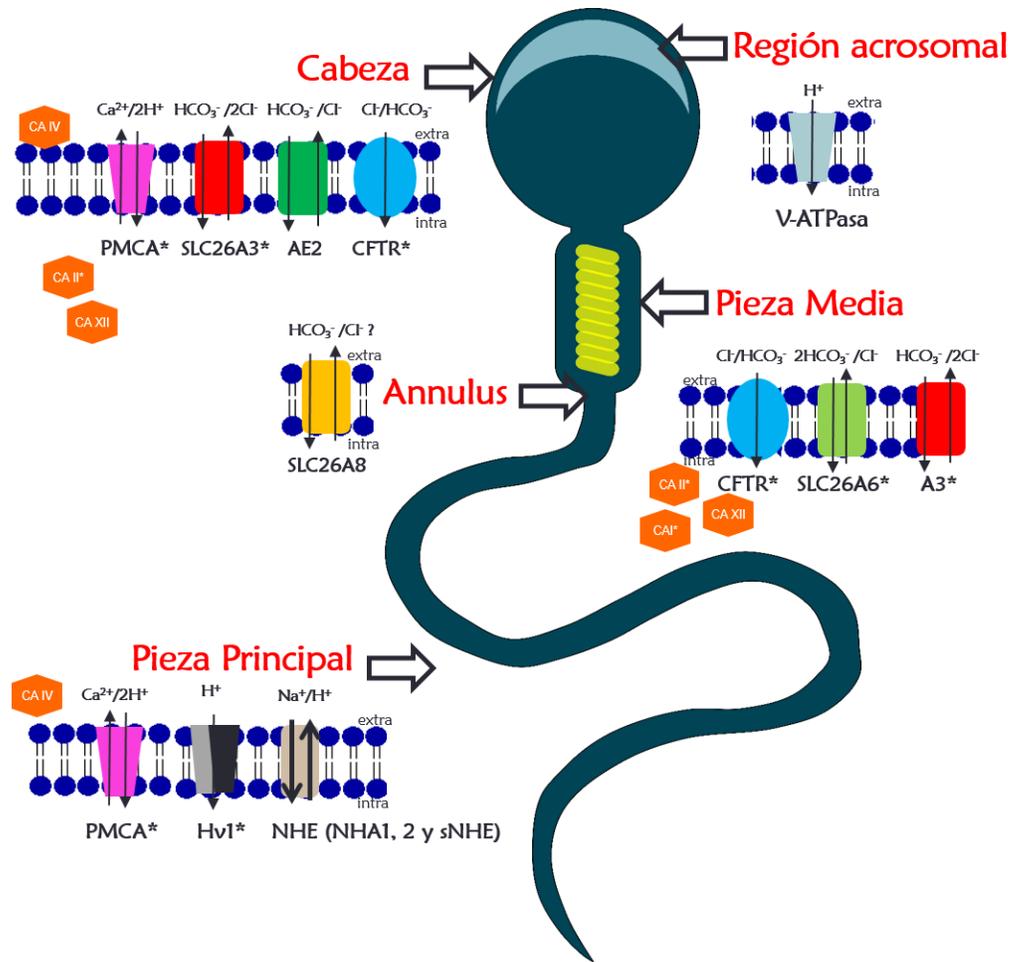


Figura 2. Localización diferencial de las proteínas que participan en la regulación del pH_i . Se observa que las proteínas relacionadas con el transporte de HCO_3^{-} se localizan principalmente en la zona de la cabeza o de la pieza media. A su vez, los acarreadores de protones tienen una localización en la región de la pieza principal. Para más detalles y referencias ver texto y Tabla 1. *Indica expresión reportada en humanos (modificado de Liu *et al.*, 2012).

Al ser una célula prácticamente carente de actividad transcripcional, la mayoría de las funciones en el espermatozoide están gobernadas por vías de transducción de señales dependientes de los flujos iónicos (Darszon *et al.*, 2011). La homeostasis del pH_i es sumamente importante ya que la actividad de muchas de las proteínas que participan en estas vías de señalización son pH -dependientes (Nishigaki *et al.*, 2014).

3.5.4. El calcio y el pH_i

El calcio es uno de los principales iones que gobiernan el comportamiento del espermatozoide, ya que participa en el control de la movilidad, y de la RA. Se ha descrito que el

canal de calcio específico del espermatozoide (CatSper) como el principal regulador de la $[Ca^{2+}]_i$ (Darszon *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2017). Cabe destacar que la expresión de las diferentes subunidades que conforman al canal CatSper son exclusivas del espermatozoide y que ratones que carecen de estas proteínas son infértiles (Ren *et al.*, 2001; Qi *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2017), mientras que en humanos una mutación por inserción en el gen *Catsper1* produce infertilidad (Avenarius *et al.*, 2009). De manera interesante, la conductancia del canal CatSper aumenta considerablemente tras una alcalinización intracelular (Kirichok *et al.*, 2006), lo que refleja la importancia de la regulación de la $[H^+]_i$ en la función espermática.

La reacción acrosomal es un proceso muy importante en la funcionalidad espermática, el cual es dependiente del flujo de calcio hacia el interior del espermatozoide (Darszon *et al.*, 2011). Reportes obtenidos por nuestro grupo de trabajo demuestran que en el caso de espermatozoides humanos, la RA está precedida de una alcalinización del acrosoma. Adicionalmente, al incubar a los espermatozoides en presencia de bases débiles con capacidad de acumularse en el acrosoma, se produce una alcalinización intra-acrosomal que tiene como consecuencia la RA (datos no publicados).

3.5.5. El potencial de membrana y el pH_i

La alcalinización durante capacitación no solo activa a los canales CatSper, sino también afecta drásticamente a los canales que contribuyen al control del potencial de membrana. Una alcalinización produce una rápida hiperpolarización (en ratón) que es mediada por una corriente saliente de potasio ($I_{K_{Sper}}$) que se origina en la pieza principal (Navarro *et al.*, 2007). Las evidencias sugieren que miembros de la familia de canales de potasio Slo, como Slo1 (Mannowetz *et al.*, 2013) y/o Slo3 (Brenker *et al.*, 2014; Lopez-Gonzalez *et al.*, 2014), como posibles responsables de dicha hiperpolarización en espermatozoides humanos. Al igual que CatSper, la expresión de Slo3 es exclusiva de los espermatozoides, de igual manera su ausencia causa infertilidad en ratones, y es activado por una alcalinización intracelular (Santi *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011, 2013). Experimentos realizados por nuestro grupo de trabajo, utilizando espermatozoides de ratón, demostraron que la hiperpolarización de la membrana plasmática es necesaria y suficiente para producir la RA (De La Vega-Beltran *et al.*, 2012). Asimismo, ratones nulos para Slo3 no muestran la hiperpolarización de la membrana asociada a la capacitación, y no llevan a cabo la RA (Santi *et al.*, 2010; Escoffier *et al.*, 2015) y solamente al inducir una

hiperpolarización artificial con valinomicina, se recuperan los niveles de RA inducida por el ionóforo de calcio (A23187) en dichos ratones (Santi *et al.*, 2010).

En ratones, estos dos eventos (aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, y la hiperpolarización de la membrana plasmática) están funcionalmente relacionados (Chávez *et al.*, 2014). Es posible que la regulación de ambos, dependa de un control fino del pH_i . Sin embargo, se desconoce si esto ocurre igual en otros mamíferos.

3.5.6. Regulación temporal de los eventos de la capacitación

Lo anterior sugiere que la regulación del flujo de calcio y el potencial de membrana, dependen de una regulación adecuada del pH_i . Sin embargo, aún no se comprende por completo cómo el pH_i se relaciona con estos fenómenos. De igual manera, se desconoce si existe una secuencia temporal o una diferencia espacial en la que ocurren estos cambios durante el contexto de capacitación en espermatozoides humanos.

Dados los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, se ha propuesto que la alta concentración de (HCO_3^-) que existe en el TGF (o en el medio capacitante en experimentos *in vitro*) produce un primer aumento del pH_i . Esta alcalinización provocaría la activación del canal Slo3, lo que generaría una hiperpolarización de la membrana plasmática. Esto estimularía el flujo de protones mediante el sNHE promoviendo una segunda alcalinización, la cual impulsaría el funcionamiento de CatSper aumentando la $[Ca^{2+}]_i$, dando como resultado el desarrollo de la HA (Chávez *et al.*, 2014) (Fig. 3).

Por su parte, Miller y colaboradores (2015) proponen que existe una entidad aun no descrita que provoca una despolarización en la membrana plasmática que activa al canal Hv1 alcalizando el interior celular, lo que conlleva a la activación de CatSper produciendo un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, la cual estimula al canal sensible a calcio Slo1 dando como resultado la hiperpolarización de la membrana plasmática (Miller *et al.*, 2015).

Una tercera hipótesis sugerida por Singh y Rajender (2015) propone que el aumento en el bicarbonato intracelular estimula a la sAC aumentando los niveles de AMPc, lo que estimula al intercambiador sodio protón específico del espermatozoide (sNHE), incrementando el pH_i , lo que impulsaría el funcionamiento de Catsper; mientras que, una $Ca^{2+}/ATPasa$ remueve iones de calcio del interior celular, provocando una disminución del pH_i debido al co-transporte de protones. Estos autores indican que el canal Slo3 solamente está involucrado en regular el

potencial de membrana para mantenerlo en potenciales hiperpolarizantes (Singh y Rajender, 2015).

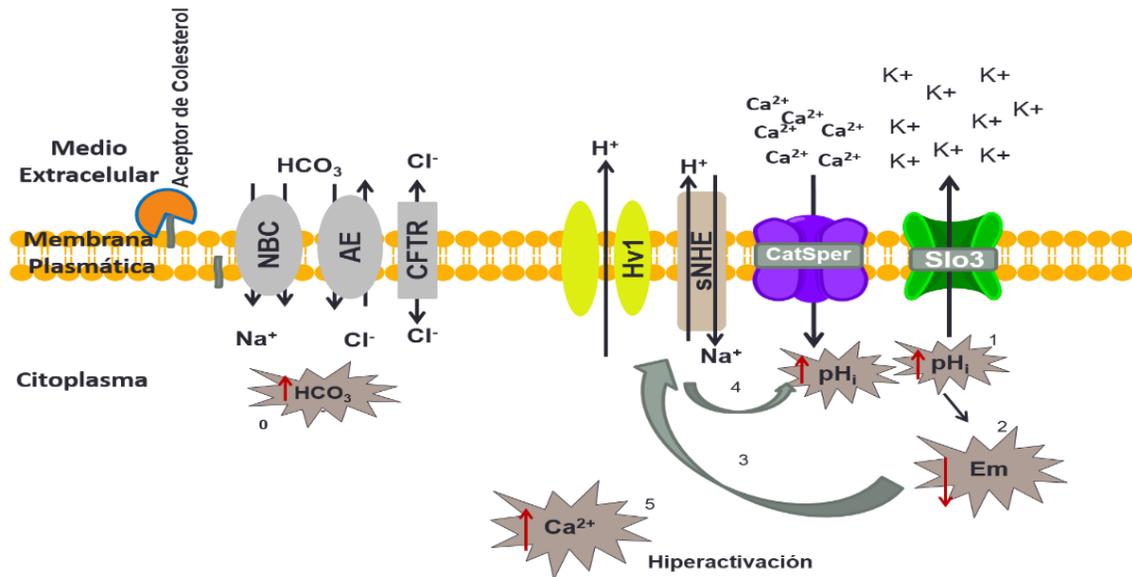


Figura 3. Eventos moleculares durante la capacitación. **0.** Primer aumento de bicarbonato controlado por transportadores. **1.** Primer aumento en el pH_i que provoca la activación del canal Slo3. **2.** La salida de K⁺ provoca la hiperpolarización de la membrana. **3.** El sNHE se activa por la hiperpolarización promoviendo una nueva alcalinización intracelular. **4.** Este segundo aumento en el pH_i activa al canal Catsper, **5.** Lo que da como resultado un aumento en el calcio intracelular, que favorece el desarrollo de la movilidad hiperactivada. Basado en (Chávez *et al.*, 2014).

4. JUSTIFICACIÓN

Es necesario obtener evidencia en espermatozoides humanos con respecto a cómo se regula el pH_i durante la capacitación *in vitro*. El determinar si existen cambios a nivel espacio-temporal tanto a nivel poblacional como individual, permitirá comprender de una mejor manera cómo es que ocurre un fenómeno tan complejo como es la capacitación, y su papel en la fecundación. .

5. HIPÓTESIS

Los cambios de pH_i durante la capacitación ocurren de manera diferencial tanto en el espacio como en el tiempo en el espermatozoide de humano y están regulados por más de una entidad molecular.

6. OBJETIVOS

6.1. General

- Analizar los cambios de pH_i que ocurren en el proceso de capacitación de los espermatozoides humanos.

6.2. Particulares

- Estandarizar la técnica de microscopía de flujo para medir parámetros intracelulares a nivel regional en espermatozoides de humano.
- Determinar la cinética de los cambios de pH_i en el proceso de capacitación de los espermatozoides humanos.
- Analizar la localización espacial de los cambios de pH_i .
- Evaluar farmacológicamente las posibles entidades moleculares que los participan cambios de pH_i durante capacitación.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Materiales

El fosfato dibásico de potasio (KH_2PO_4) y la glucosa se obtuvieron de J.T. Baker (USA), albúmina sérica de bovino (BSA por sus siglas en inglés) se compró de US Biological (USA). El 2',7'-Bis-

(2-Carboxietil)-5-(y-6)-Carboxifluoresceína Acetoximetil Ester (BCECF-am, en adelante nombrado solo como BCECF), y el Ioduro de Propidio (IP) se obtuvieron de Invitrogen (USA). El Inh-172 se obtuvo de Calbiochem (USA). Todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (USA).

7.2. Medios de Cultivo

Se utilizó el medio modificado *Human Tubal Fluid* (HTF) por Puga-Molina y col. (2014). El medio HTF para condiciones en donde no se promueve la capacitación, el cual contenía (en mM): NaCl 90.69, KCl 4.67, CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 0.314, Glucosa 2.78, Na-Piruvato 3.38, Na-lactato 60, Hepes 23.8. Para generar un medio que promoviera la capacitación, se suplementó con: NaHCO₃ 25 mM, y BSA 0.5% (p/v). Ambos medios se ajustaron a un pH 7.4

7.3. Obtención de las muestras

Los espermatozoides se obtuvieron de donadores sanos con al menos dos días de abstinencia, cuya muestra cumpliera con los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization., 2010) para ser considerada como normozoospermica. Las muestras de semen se colocaron a 37 °C y una atmosfera de 5% de CO₂ durante 30 min para favorecer la licuefacción. Las células se seleccionaron mediante una modificación de la técnica de *Swim-up* o nado ascendente reportada por Mata-Martínez y colaboradores (2013), para lo cual se colocaron 400 µL de semen en un tubo de ensayo, el cual se colocó en una gradilla en ángulo de 30°, y se le añadió por goteo 1 mL de medio HTF no capacitante. Se incubaron durante 1 h a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente se colectó la fase superior con los espermatozoides móviles para realizar la determinación de la concentración celular tomando 10 µL y colocándolos en una cámara Makler (Sefi-Medical Instruments, Israel).

7.4. Incorporación de colorantes

La carga única de BCECF se realizó a una concentración de 250 nM/mL por cada ~8x10⁶ células incubadas en condiciones no capacitantes durante 7 min a 37 °C y en oscuridad. El exceso de colorante se retiró mediante centrifugación (300 g durante 3 min). Por cada condición se utilizó un mínimo de 2x10⁶ espermatozoides. Previo a la medición, las células se concentraron por centrifugación (300 g x 3 min) en un volumen de ~30 µl, y se añadió IP (200 nM final) para evaluar la viabilidad de la población.

7.5. Protocolo de evaluación de cambios de pH_i durante capacitación

Para evaluar la temporalidad en la que ocurren los cambios de pH_i intracelular en el espermatozoide humano, se realizaron mediciones en condiciones no capacitantes (No Cap) inmediatamente después del *Swim-up*, y para evaluar el estatus del pH_i en condiciones capacitantes, a las células en estado *No Cap* se les añadió medio que promueve la capacitación (Cap) y en ese instante se realizó la primera medición (tiempo 0 min). Después de esto, se realizaron mediciones cada 15 min durante las tres primeras h de capacitación. Posterior a las 3 h de medición, se realizaron mediciones a cada hora, hasta completar el tiempo final de 6 h (Fig. 4).

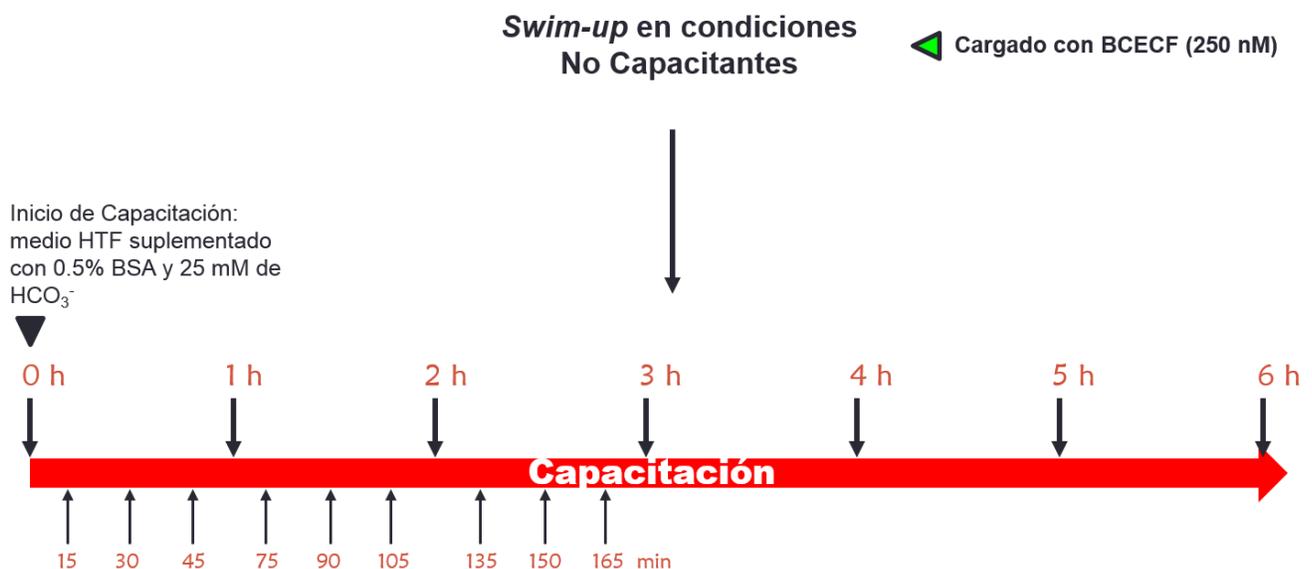


Figura 4. Protocolo de evaluación de pH_i intracelular. Se realizó el *Swim-up* en condiciones no capacitantes, posteriormente se cargaron células con el colorante (cabeza de flecha verde) y se midió la fluorescencia (condiciones No Cap). A las células ya cargadas se les añadió medio Cap (cabeza de flecha negra) y se realizó la primera medición (tiempo 0 h). Se hicieron mediciones cada 15 min, hasta completar 3 h. Posteriormente se hicieron mediciones cada 60 min hasta completar 6 h de incubación (flechas negras). Antes de cada medición se añadió IP para evaluar la viabilidad celular.

7.6. Medición en microscopía de flujo

Se empleó la técnica de microscopía de flujo, la cual combina la microscopía de fluorescencia (técnica comúnmente utilizada para evaluar parámetros intracelulares en células individuales) y la citometría de flujo (técnica que permite medir un gran número de células). Esta metodología se basa en los mismos principios que un citómetro de flujo, pero acopla un sistema de adquisición

de imágenes (objetivos, cámaras CCD, etc.) que permite la adquisición de imágenes de campo claro y fluorescencia de cada célula que pasa a través del flujo.

Se empleó el citómetro de flujo con imágenes Image Stream Mark II (Amnis, USA). Para la adquisición se utilizó el objetivo de 60x, un láser de estado sólido de 488 nm para excitar ambos colorantes (IP y BCECF). La potencia del láser se ajustó durante cada adquisición (entre 50 y 100 mW) con el fin de reducir los niveles de autofluorescencia, (la cual se obtuvo evaluando espermatozoides sin ningún colorante) al mínimo posible. Para la detección de fluorescencia se emplearon los detectores espectrales: *Ch 02* (480-560 nm) para BCECF, *Ch 05* (595-660 nm) para IP, así como el *Ch 01* para campo claro. La adquisición de datos se llevó a cabo utilizando el *software* INSPIRE (Amnis, USA). Durante el momento de la adquisición se utilizaron distintos parámetros para excluir células que morfológicamente no correspondieran a espermatozoides, para ello se fijó un área de $\geq 50 - \leq 200 \mu\text{m}^2$, y un valor de *Aspect Ratio* ≤ 0.3 . Adicionalmente, se estableció un umbral para el gradiente cuadrático medio (*Gradient RMS*) entre 1 y 60 para excluir eventos fuera de foco (utilizando el *Ch 01* para campo claro). Tomando en cuenta estas discriminaciones durante la adquisición, la tasa de captura de imágenes adecuadas fue de $\sim 1000-2000$ células/min. Se colectó un mínimo de 10000 células por cada condición. Debido a que las células se cargaron con más de un colorante, se utilizaron controles con células teñidas con cada fluoróforo de manera individual con el fin de generar una matriz de compensación que permitiera calcular y eliminar la proporción de sangrado de un colorante en otro canal.

7.7. Procesamiento de imágenes obtenidas mediante microscopía de flujo

7.7.1. Generación de máscaras para análisis

Para analizar las imágenes obtenidas, se creó una serie de máscaras en el *software* de análisis IDEAS versión 6.2 (Amnis, USA). Las máscaras tienen como función delimitar la región que contiene los píxeles de interés (es decir los contornos de la célula, regiones específicas). Existen varias opciones para generar máscaras, las cuales identifican diferentes características de los píxeles de una imagen como intensidad, forma, etc. El *software* utiliza este conjunto de píxeles para obtener los parámetros morfológicos, y de intensidad de fluorescencia (Fig. 5). Las diferentes máscaras generadas pueden combinarse utilizando operadores Booleanos con el fin de generar máscaras que abarquen diferentes regiones celulares (Fig. 5B, 5C). De esta manera

se crearon 4 diferentes máscaras con el fin de identificar: la célula completa, la cabeza, la pieza media, y la pieza principal (ver sección 6.1 y 6.2).

7.8. Evaluación del perfil farmacológico de la regulación del pH_i

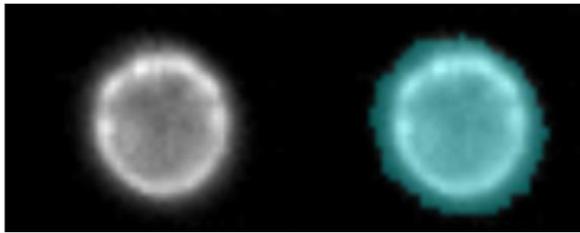
Se realizó una pre-incubación durante 10 min con las distintas drogas en células en condiciones que no promueven la capacitación previamente cargadas con BCECF. Transcurrido ese tiempo, se evaluó el estatus del pH_i (sección 6.6) en estas condiciones (No Cap). Para evaluar el efecto en capacitación, se añadió medio capacitante suplementado con las drogas de interés. Se evaluaron tres puntos en el tiempo: 0, 1 y 4 h de capacitación. Los fármacos utilizados fueron: bloqueador específico del canal CFTR (Inh-172, 10 μM), inhibidor del canal Hv1 5-Cloro-2-Guanidinobenzimidazol (Cl-GBI) a una concentración de 200 μM, así como un análogo no permeable del compuesto anterior 2-Guanidinobenzimidazol (2-GBI) a la misma concentración como control negativo. Por último, se realizaron ensayos para determinar la participación del ion HCO₃⁻ en el control del pH_i, para ello se incubaron células en un medio capacitante incompleto, es decir solamente suplementado con BSA 0.5% (p/v) sin HCO₃⁻ (denominado HCO₃⁻ Ø). Las células se analizaron en los tiempos anteriormente mencionados.

7.9. Análisis de movilidad

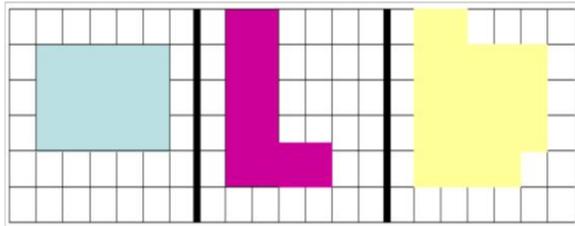
Se realizaron ensayos de movilidad espermática empleando el sistema Sperm Class Analyzer (SCA, Microptics, Barcelona, España). Las condiciones a probar fueron las anteriormente descritas (sección 6.7). Se colocaron ~5x10⁶ espermatozoides en un portaobjetos precalentado a 37° C, cubiertas con un cubreobjetos y revisadas al microscopio utilizando un objetivo con 10x de amplificación y contraste de fases negativo (Nikon, Japón). Se capturaron al menos 500 células por condición a una frecuencia de 50 Hz. Los parámetros de movilidad se calcularon usando el *software* SCA. Se reportó el porcentaje de espermatozoides móviles, así como de hiperactivados. Se consideró como un espermatozoide hiperactivado cuando cumplía las siguientes características: velocidad curvilínea (VCL) > 150 μm/s de, linealidad (LIN) < 50%, y una amplitud lateral media de la cabeza (ALH_{1/2}) > 3.5 μm (ver Mortimer, 2000). En el apéndice 2 se da una descripción de la manera en que se calculan dichos parámetros con el equipo SCA.

7.10. Análisis estadístico

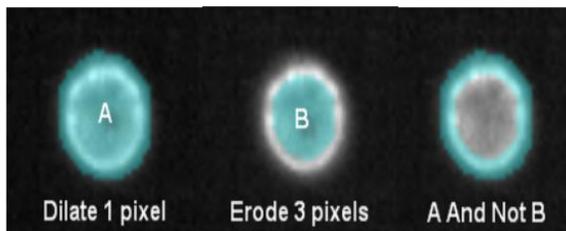
Los datos se analizaron utilizando el *software* R versión 3.3.1 (R Core Team, 2016) y la paquetería ggplot2. Se utilizaron histogramas para definir el comportamiento de la población durante la capacitación. En las figuras 8 y 9, los valores de fluorescencia fueron normalizados dividiendo cada dato entre la mediana de fluorescencia de la condición *No Cap*, y después se obtuvo su logaritmo base 2. En la figura 11 se emplearon graficas de caja para representar la dispersión de la fluorescencia de BCECF en la población. En este tipo de gráficos, cuando las muescas de dos cajas no se superponen entre sí se considera que existen una probabilidad del 95% de que dos poblaciones sean diferentes entre sí (ver Krzywinski y Altman, 2014). Adicionalmente, se calculó el número de células que sobrepasa el nivel de fluorescencia correspondiente al tercer cuartil de las células en condiciones *No Cap* control, empleando las distintas máscaras de segmentación. Se utilizó el *software* Prism 6 (versión 6.01, GraphPad, USA), se graficaron los datos de la cuantificación antes mencionada como promedios y error estándar de la media (SEM). Se realizó una comparación de dichos datos utilizando una prueba de ANOVA, y una prueba *pos hoc* de Holm-Sidak para determinar diferencias entre tratamientos, se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$.

A

Máscara: Conjunto de píxeles que contiene la información de interés

B

Generación de nuevas máscaras: Uso de operadores Booleanos para combinar (o no) dos o más máscaras al mismo tiempo

C

Ejemplo de máscara de membrana plasmática

Figura 5. Proceso de generación de una máscara en el *software* IDEAS. **A.** Una vez generada la imagen de la célula de interés, el *software* detecta los bordes de esta dada la diferencia de los niveles de intensidad de gris con respecto al fondo (máscara *Morphology*). **B.** Ejemplo de cómo dos máscaras pueden ser combinadas mediante el operador *AND* para generar una tercera. **C.** Ejemplo de la creación de una máscara de membrana plasmática, para lo cual, partiendo de la máscara A y utilizando el operador *NOT* para no incluir la máscara B.

8. RESULTADOS

8.1. Segmentación de las imágenes para medir regiones subcelulares en el espermatozoide

En el presente trabajo se planteó desarrollar una estrategia que permitiera evaluar parámetros en las distintas regiones del espermatozoide de manera individual y posteriormente aplicar este análisis a todos los elementos de la población. Para ello, se crearon máscaras para segmentación que permitiesen analizar de manera independiente el parámetro de interés en cada región del espermatozoide (cabeza, pieza media, y pieza principal). A continuación, se describen los pasos a seguir para llevar a cabo el proceso de segmentación (en el apéndice 1 se describen con mayor detalle las máscaras, parámetros, y funciones de análisis de imágenes empleadas para realizar la segmentación):

1. **Máscara de espermatozoide completo:** Esta máscara permite la medición de los píxeles que corresponden a toda la célula. Aplicando la función *morphology*, se creó una máscara que reconoce prácticamente todos los píxeles que corresponden a la imagen de interés al diferenciarlos del fondo utilizando la imagen en campo claro. A dicha máscara se le aplicó un proceso de *erosión* de un píxel para delimitar mejor el contorno del espermatozoide (Fig. 6A).
2. **Máscara de cabeza.** Para reconocer la región de la cabeza se utilizó la función *adaptive erode* con un coeficiente de 52, la cual es útil para identificar regiones circulares en la imagen (Fig. 6B). La máscara obtenida se sometió a un proceso de *dilatación* de dos píxeles para asegurar que todos los píxeles de la cabeza fuesen incluidos (Fig. 6C).
3. **Máscara de pieza principal.** Partiendo de la máscara de cabeza (Fig. 6D) se realizó una dilatación de 13 píxeles (Fig. 6E) para incluir todos los píxeles tanto de la cabeza como de la pieza media. Posteriormente, a la máscara del espermatozoide completo, se le sustrajo la máscara creada anteriormente con el fin de solamente obtener los píxeles correspondientes a la pieza principal (Fig. 6F).
4. **Máscara de pieza media.** En primer lugar, se sustrajo la máscara de pieza principal, a la máscara de espermatozoide completo para obtener una máscara intermedia que contiene tanto la cabeza como la pieza media (Fig. 6G). Posteriormente, la máscara de cabeza fue dilatada un píxel y sustraída a la máscara intermedia anteriormente creada (Fig. 6H). Finalmente, la máscara anterior se erosionó un píxel para remover píxeles sin continuidad

(Fig. 6I), seguido de un proceso de dilatación de dos píxeles para rellenar los huecos e incluir toda la pieza media (Fig. 6J).

8.2. Selección de poblaciones

Una vez creadas las máscaras para poder segmentar las imágenes, se evaluó la eficiencia del procesamiento desarrollado. Para ello se crearon parámetros específicos para cada máscara (por ejemplo área, longitud, etc.), así como criterios de exclusión que permitieron discriminar aquellas imágenes que no presentaran las características deseadas. En primer lugar, se excluyeron las imágenes que presentaron píxeles saturados en el canal de interés (*Ch 02*, señal de BCECF). Se utilizó la máscara de espermatozoide completo y se graficó en un histograma el número de píxeles saturados para el canal 2 (Fig. 7A *i*, población cian).

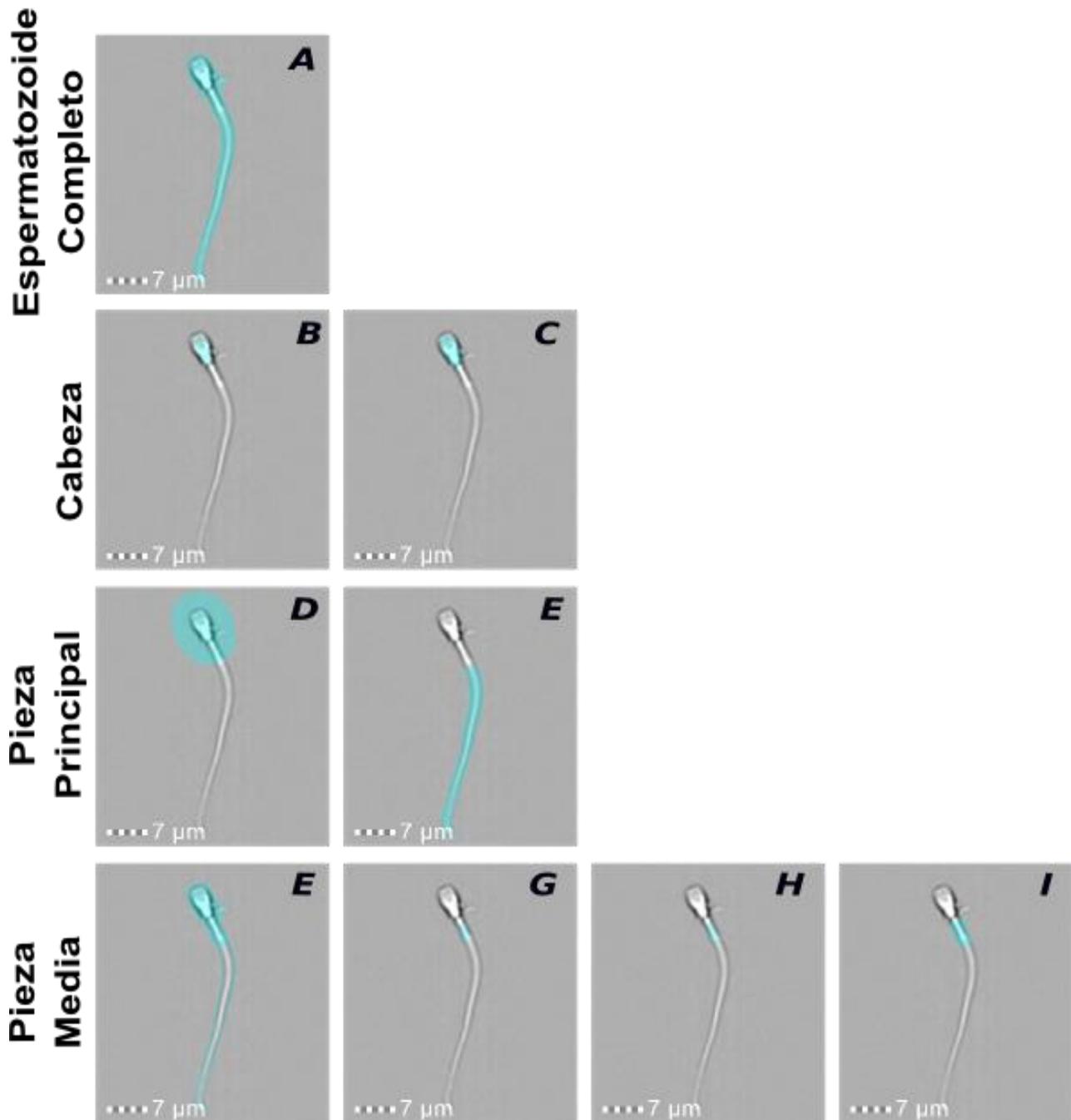


Figura 6. Segmentación de imágenes. Pasos a seguir para obtener las máscaras de cada una de las regiones del espermatozoide. Espermatozoide completo, **A**. erosión de un píxel a la máscara obtenida mediante la función *morphology*. Cabeza **B**. detección de regiones circulares, **C**. dilatación para obtener la máscara final. Pieza principal, **D**. dilatación de 13 píxeles, **E** y sustracción de la máscara en D a la máscara en A para obtener la pieza principal. Pieza media, **F**. Sustracción de la máscara en E a la máscara A, **G**. posterior eliminación de la máscara en C a la máscara en E, **H**. erosión de un píxel de G, y finalmente **I**. dilatación de dos píxeles para obtener la máscara final de pieza media

A partir de las imágenes sin saturación, se seleccionaron aquellas que tuvieran el contraste y nitidez suficiente para considerarlas como enfocadas (ver Apéndice 1), a pesar que dicho procesamiento se aplicó desde la adquisición, no todas las células adquiridas cumplieron con dicha selección. Para ello se utilizó el parámetro *Gradient RMS*. Todas las células con un valor de gradiente a partir de 62 se consideraron como enfocadas (Fig. 7A *ii*, población verde). El siguiente paso consistió en excluir imágenes con dobletes, agregados, detritos celulares, etc. Para esto, se utilizaron parámetros correspondientes a la máscara de espermatozoide completo, se consideraron como verdaderos espermatozoides a todos aquellos eventos que presentaron un área entre 50 y 200 μm^2 , y un valor de *Aspect Ratio* mayor a 0.3 (Fig. 7A *iii*, población amarilla). Posteriormente, se procedió a seleccionar a las imágenes cuyo proceso de segmentación haya sido exitoso, los pasos a seguir se describen a continuación:

- 1) Cabezas segmentadas: tomando como base la máscara de esta región, se excluyeron las imágenes que presentaron un valor de *Aspect Ratio* menor a 0.4 y una longitud mayor a 10 μm (Fig. 7A *iv*, población anaranjada).
- 2) Pieza principal segmentada: de la población seleccionada en el punto anterior, se consideró como piezas principales a aquellas imágenes cuya longitud de la máscara de esta región fuera mayor a 20 μm , y el *Aspect Ratio* menor a 0.3 (Fig. 7A *v*, población azul claro).
- 3) Pieza media: para seleccionar las imágenes correctamente segmentadas se excluyeron aquellas con una longitud mayor a 8 μm y un valor de *Aspect Ratio* menor a 0.35 (Fig. 7A *vi*, población roja). Dicha población se consideró como la población final.

En la figura 7B se observan ejemplos de células representativas que corresponden a esta población final. Después de las discriminaciones, se obtuvieron entre 1000 y 2000 imágenes, sobre las cuales se hicieron los análisis posteriores. Es importante mencionar que todo el procesamiento antes mencionado, se guarda como un templado para análisis, el cual se aplica a un archivo sin procesar obtenido del citómetro de imágenes Image Stream Mark II, el *software* IDEAS realiza todos los procedimientos anteriores de manera automatizada, lo cual permite ahorrar una cantidad considerable de tiempo.

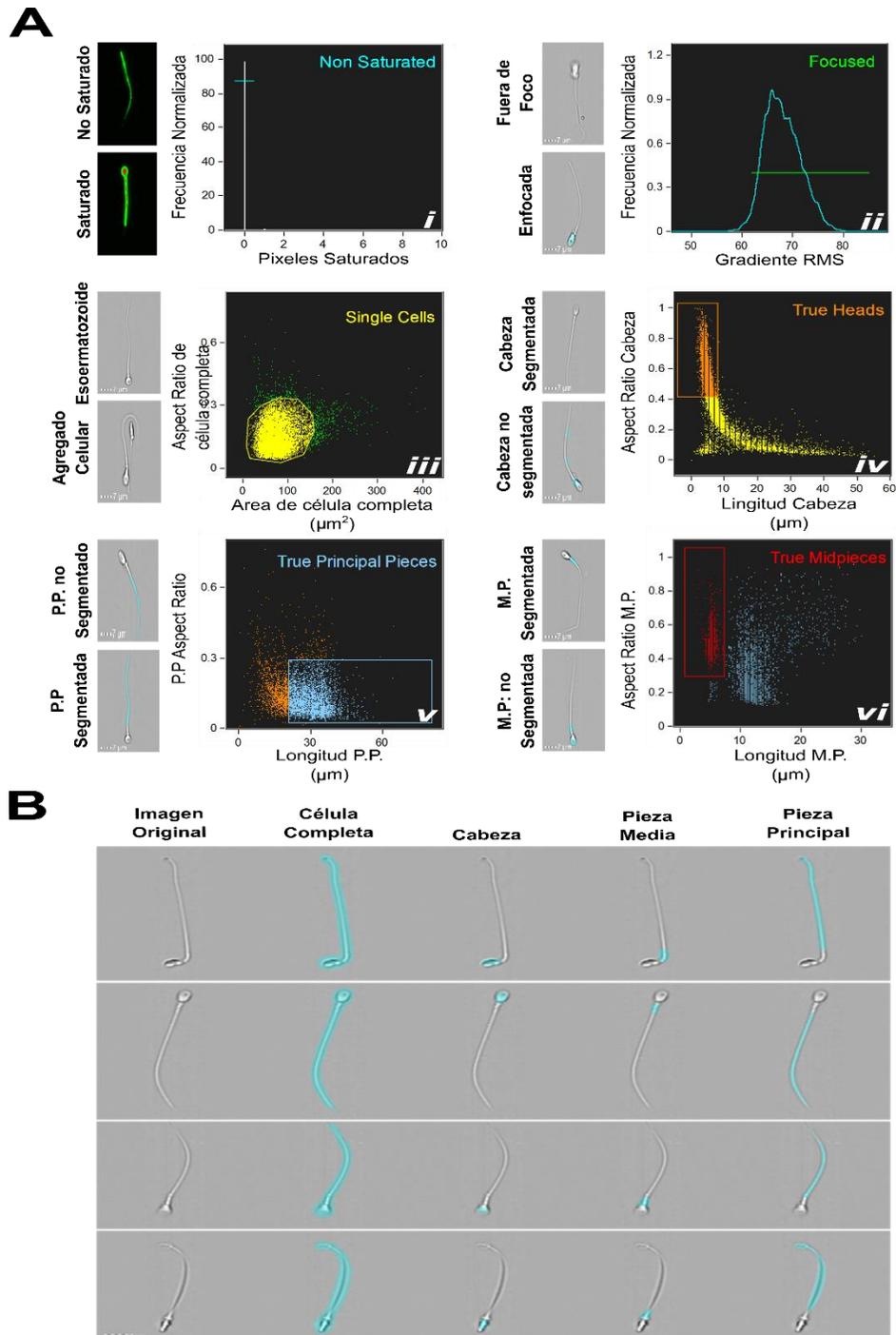


Figura 7. Selección de poblaciones de interés. **A** Diferentes gráficos utilizados para seleccionar a las poblaciones de estudio, (i) Histograma que permite seleccionar a la población sin saturación en el canal de BCECF. (ii) Histograma de gradiente RMS para el *Ch 01* para eliminar células sin enfocar. (iii). Gráfica de puntos del área vs el *Aspect Ratio* (célula completa) para eliminar imágenes que no correspondan a espermatozoides individuales (iv-vi). Gráficos correspondientes para seleccionar las poblaciones correctamente segmentadas cabeza (iv), pieza principal (v), y pieza media (vi). **B.** Imágenes representativas del proceso de segmentación

8.3. Comprobación del proceso de segmentación: fosforilación de residuos de tirosinas asociado a capacitación

Para evaluar el funcionamiento de los algoritmos de segmentación, se analizó una población de espermatozoides sujetos a una condición experimental que induce cambios de fluorescencia localizados en una región específica. Para ello, se hicieron ensayos inmunocitoquímicos para detectar proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas (PY). Se sabe que hay un aumento de PY durante la capacitación. Este aumento ocurre de manera diferencial espacial y temporalmente hablando, lo que quiere decir que el incremento de PY es dependiente del tiempo de capacitación, y este ocurre principalmente en la región del flagelo, tanto en humano como en otras especies (Carrera *et al.*, 1996; Petrunkina *et al.*, 2003; Battistone *et al.*, 2013).

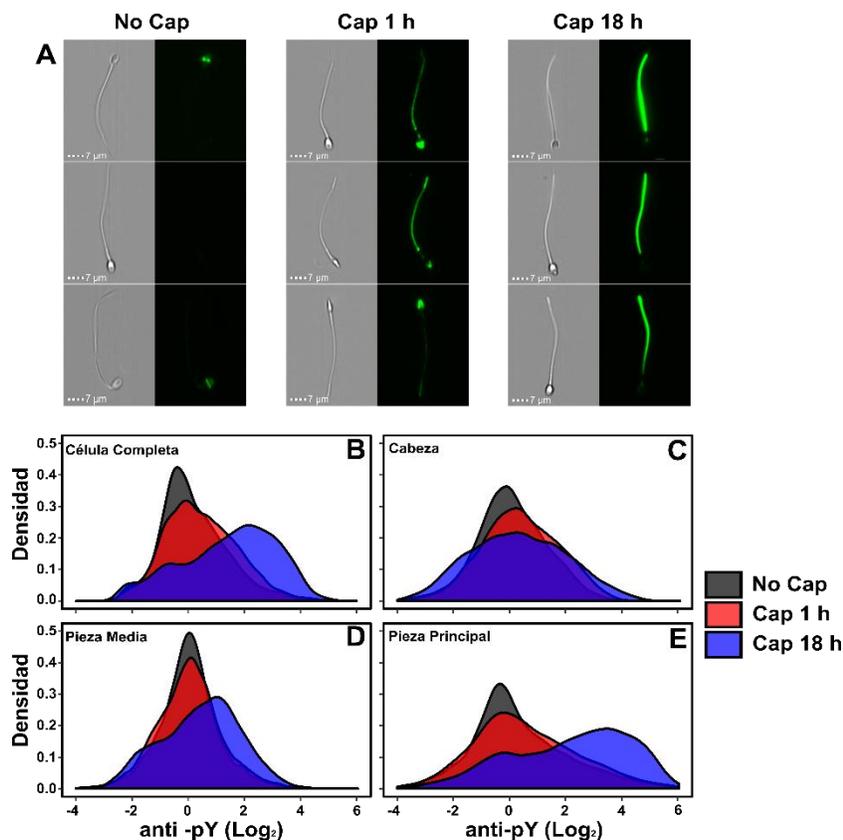


Figura 8. Aumento de PY durante capacitación ocurre de manera diferencial. **A.** imágenes representativas de espermatozoides incubados en medio no capacitante, y en medio capacitante durante 1 y 18 h. **B.** Histograma con la cuantificación de la distribución de los niveles de fluorescencia (nivel de PY) de la célula completa; y de cada región cada región del espermatozoide: **C.** cabeza, **D.** pieza media, **E.** pieza principal. Cada curva incluye los datos provenientes de siete experimentos independientes (~14000 células, 2000 por cada donador).

Para evaluar el aumento de PY se emplearon tres diferentes condiciones: células incubadas en medio no capacitante (No Cap), y células incubadas en medio capacitante durante 1 o 18 h (Cap 1 h y Cap 18 h), ya que resultados obtenidos por nuestro grupo indican que existen mayores niveles de fosforilación en residuos de tirosina después de 18 h de capacitación (datos no publicados). En la figura 8A se muestran imágenes representativas de espermatozoides incubados en las condiciones indicadas. En el panel B de la misma figura se muestra un histograma con la distribución de los niveles de fluorescencia del anticuerpo anti-pY utilizando la máscara de célula completa. Se observa que durante la capacitación, hay un mayor número de células con mayores niveles de fosforilación, siendo mucho más marcado tras 18 h de capacitación. Dicho aumento ocurre principalmente en el flagelo (Fig. 8D y E), especialmente en la región de la pieza principal, mientras que en la región de la cabeza prácticamente no se presentan cambios durante el tiempo de capacitación (Fig. 8C).

8.4. Microscopía de flujo para evaluar cambios en el pH intracelular

Se realizaron pruebas para discernir si esta técnica puede ser utilizada para medir cambios en el pHi a nivel subcelular en el espermatozoide humano. Para ello, a espermatozoides en medio no capacitante se les añadió 10 mM de trimetilamonio (TMA), compuesto que provoca un aumento sostenido del pHi de alrededor de 0.4 unidades (Alasmari *et al.*, 2013).

Tras el estímulo con TMA gran parte de la población aumentó su fluorescencia con respecto a la condición control, lo que indica un aumento del pHi. Este aumento ocurre de manera general en todas las regiones del espermatozoide (Fig. 9B-E), siendo más pronunciado en la región de la cabeza (Fig. 9C). Lo anterior indica que esta técnica puede ser utilizada para medir pHi en el espermatozoide de humano.

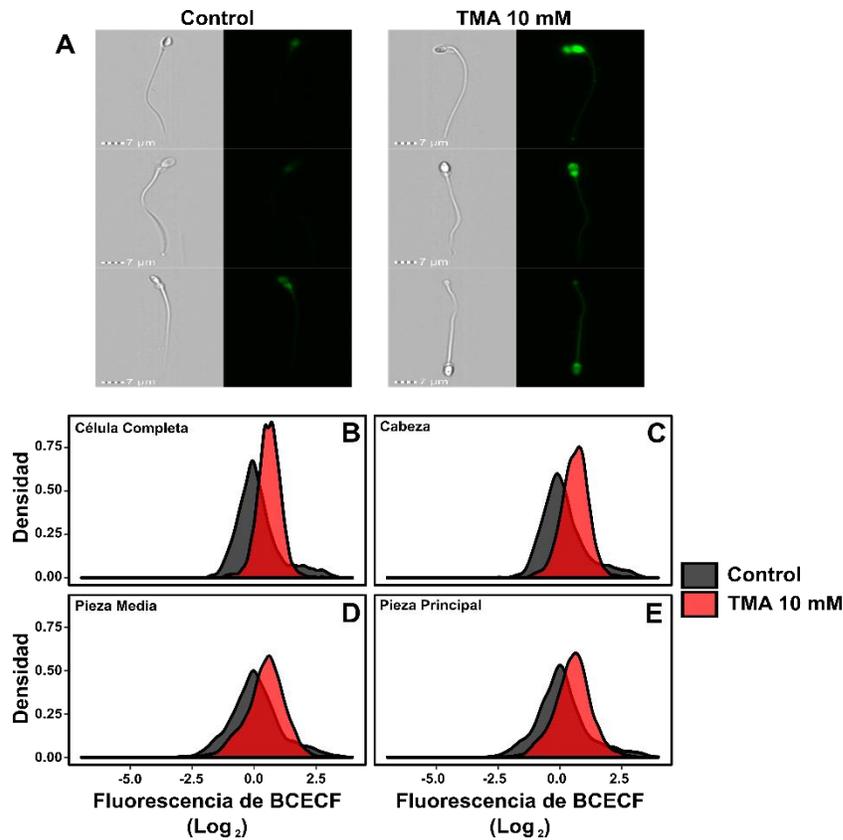


Figura 9. Alcalinización intracelular por TMA. **A.** Imágenes representativas de campo claro (der.) y fluorescencia (izq.) de espermatozoides teñidos con BCECF tratados, o no, con 10 mM de TMA **B.** Cuantificación de la fluorescencia obtenida de la célula completa incubados (rojo), o no (negro), con TMA 10 mM. **C.** Histograma con la cuantificación de la de fluorescencia de la cabeza, **D.** pieza media, y **E.** pieza principal. Cada curva incluye los datos provenientes de cuatro experimentos independientes (~14000 células, 2000 por cada donador).

8.5. Incubación en medio no capacitante no induce cambios en el pH_i

Se realizó un control para determinar si un cambio en la fluorescencia del colorante y por tanto un cambio de pH_i solo como consecuencia del tiempo de incubación. Para ello, las células se incubaron durante seis h en condiciones que no promueven la capacitación (*No Cap f*), y se compararon con células que se analizaron justo después de la colección por *Swim-up* (*No Cap i*). No se observaron diferencias entre la fluorescencia de BCECF entre ambas condiciones (Fig. 10). Lo anterior sugiere que no existen cambios de fluorescencia debido al tiempo de incubación, descartando cambios en la concentración de colorante o alguna situación similar.

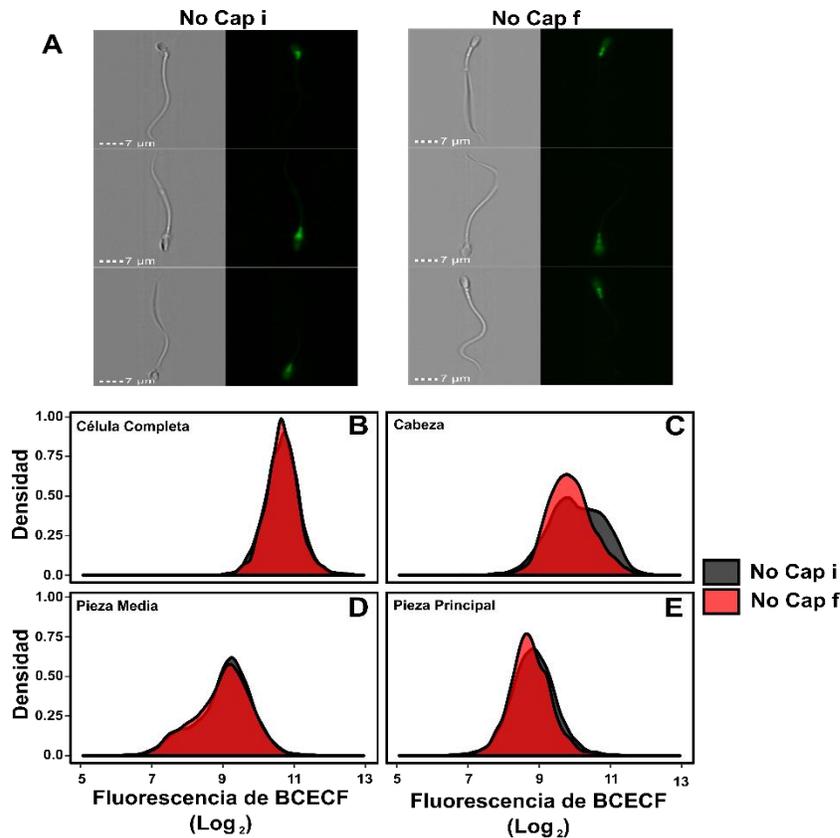


Figura 10. No existen cambios en el pH_i tras la incubación en medio no capacitante. **A.** Imágenes representativas de espermatozoides incubados en medio no capacitante por ~1 h (negro) y 6 h (rojo). **B.** Histograma con la cuantificación de la fluorescencia obtenida de imágenes de la célula completa incubados durante ~1 hora (negro) y 6 h (rojo) en condiciones que no promueven la capacitación. Cuantificación de la fluorescencia en las diferentes regiones: **C.** cabeza, **D.** pieza media, **E.** pieza principal. Cada curva incluye los datos provenientes de cinco experimentos independientes (~10000 células, ~2000 por cada donador).

8.6. Cambios de pH_i asociados a la capacitación

Después de comprobar que la fluorescencia del BCECF no aumenta al incubar a los espermatozoides en condiciones que no promueven la capacitación, se procedió a evaluar si existen cambios en el pH_i durante la capacitación.

En la figura 11A se muestran imágenes representativas de células teñidas con BCECF en los tiempos de incubación indicados. Las células incubadas en condiciones capacitantes muestran mayor intensidad de fluorescencia en comparación de aquellas incubadas en medio no capacitante. Se realizó la cuantificación correspondiente de las imágenes utilizando gráficas de caja para representar la distribución de la intensidad de fluorescencia. En la figura 11B se observa la cuantificación utilizando la máscara de célula completa. Se corroboró la observación antes

mencionada, al añadir medio capacitante existe un aumento en el número de células que presentan mayor fluorescencia de BCECF, mientras que en los min subsecuentes se sigue manteniendo la tendencia al aumento, llegando a su máximo entre los 15 y 30 min de incubación. Las células que muestran mayor fluorescencia tienden a disminuir ligeramente hasta llegar a los primeros 60 min. A partir de ahí, el comportamiento parece mantenerse estable hasta la cuarta hora de capacitación, disminuyendo ligeramente tras cinco y seis h de incubación. Cabe destacar que el número de células con alta fluorescencia en espermatozoides incubados en medio capacitante, sigue siendo más alto en comparación con las células incubadas en medio no capacitante.

Utilizando las máscaras de segmentación se analizó la fluorescencia del BCECF en las diferentes regiones del espermatozoide. Se observó que el comportamiento antes descrito ocurre tanto en la cabeza (Fig. 11C), como en la pieza principal (Fig. 11E); mientras que en la región de la pieza media (Fig. 11D) se observó un comportamiento interesante, ya que en esta zona la fluorescencia de BCECF se mantiene prácticamente constante, mostrando un ligero descenso a partir de las cuatro h de incubación.

Con el fin de realizar una cuantificación más detallada del número de células que aumentan su fluorescencia tras la capacitación se empleó la siguiente estrategia: tomando como referencia el valor que representa el tercer cuartil o el 75° percentil (límite superior de la caja) de la condición de no capacitación (Fig. 11B-E, línea negra punteada), se cuantificó el porcentaje de células que se encontraba por encima de dicho valor. Se excluyeron del análisis aquellos valores por encima del límite que indica el inicio de los *outliers* (extremo de la línea que sobresale de la caja), es decir, aproximadamente un 5% de los datos (a partir de ahora nombrada como población por encima del tercer cuartil). A estas células se les consideró como la subpoblación de espermatozoides con mayor fluorescencia de BCECF, es decir, mayor pH_i. En la figura 11F se observa que tras el estímulo con medio capacitante el número de células que cumple la definición anterior aumenta alrededor del 20 %, y alcanza su máximo a los 30 min de capacitación (~37% de la población). Posteriormente desciende un poco (~5%), y tras una hora de capacitación, llega a un porcentaje de células con alta fluorescencia (~33%) que se mantiene prácticamente constante hasta la tercera hora de capacitación (~30%). De manera interesante, a la cuarta hora hay un nuevo aumento (~34%), pero a la quinta y sexta vuelve a disminuir (~29%) (Fig. 11F). Cuando se utilizó la misma estrategia para determinar el comportamiento a nivel subcelular,

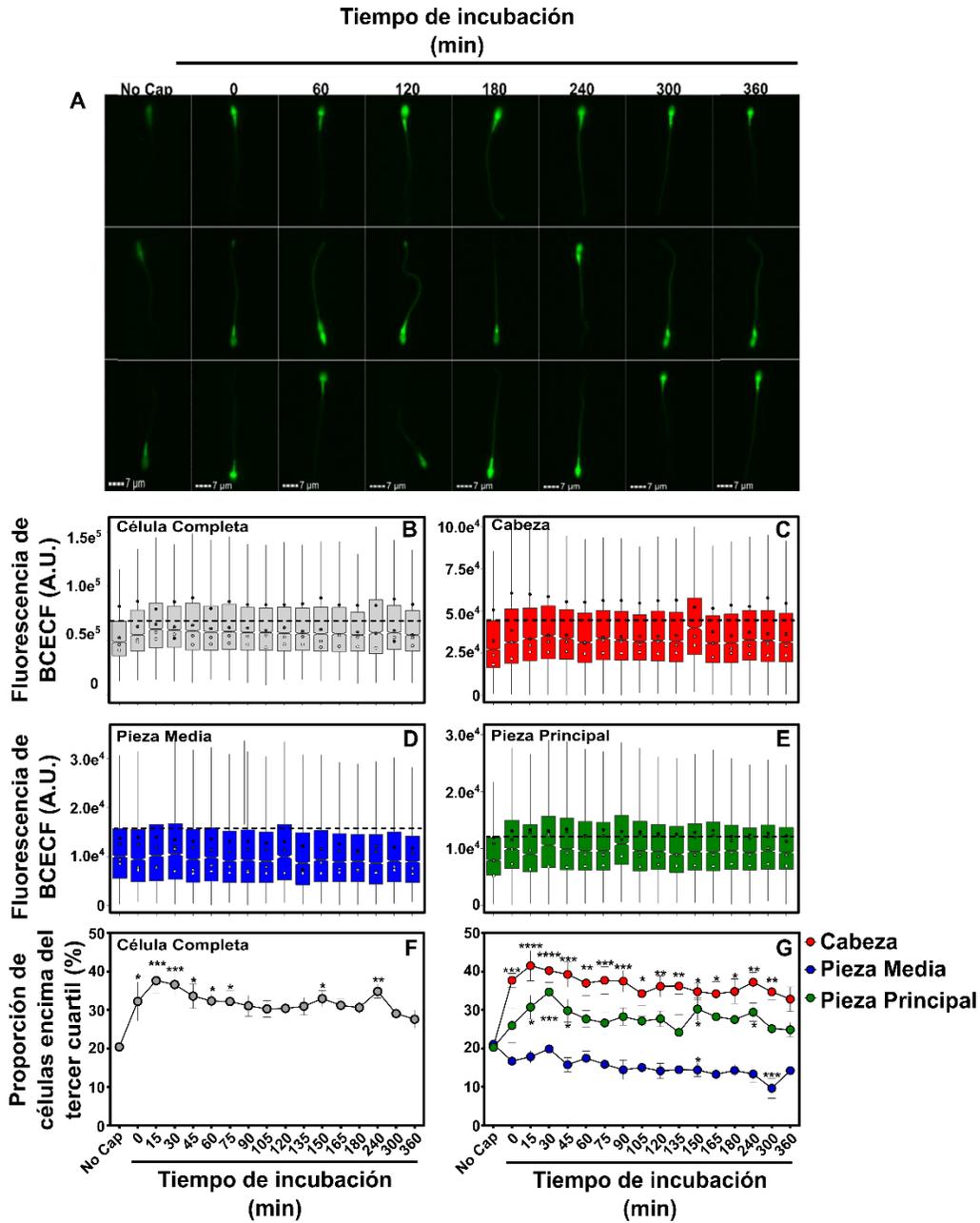


Figura 11. Cambios de pHi asociados a capacitación. **A.** Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con BCECF e incubados en las condiciones y tiempos indicados. Gráficas de caja en donde se cuantifica la distribución de los niveles de fluorescencia de BCECF en las diferentes regiones del espermatozoide: **B.** célula completa, **C.** cabeza, **D.** pieza media, **E.** pieza principal. La línea punteada ejemplifica el tercer cuartil a partir del cual se obtuvieron los datos de **F** y **G**. Los puntos de colores dentro de las cajas representan la mediana de fluorescencia de cada donador en cada condición. **F.** Cambios en la proporción de espermatozoides por encima del tercer cuartil en célula completa, en **G.** regiones subcelulares. Los datos representan la media y el error estándar de la media (ESM), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto a la condición No Cap, $n = 4$.

se observó una concordancia con lo descrito anteriormente (Fig. 11B-E), en donde el aumento de la población por encima del tercer cuartil ocurre a los primeros minutos tanto en cabeza como en pieza principal, y se mantiene estable durante el resto de la capacitación, mientras que en la pieza media hay una tendencia a mantener el mismo nivel de fluorescencia (Fig. 11 G).

8.7. La entrada de bicarbonato es indispensable para producir el aumento de pH_i asociado a capacitación

Una vez comprobado que existe un aumento del pH_i a nivel temporal y regional en espermatozoides capacitados, la siguiente pregunta a responder fue: ¿Qué entidades moleculares participan en la regulación espacial y temporal del pH_i ? En la figura 11 se observa que el cambiar a un medio que promueve la capacitación es suficiente para aumentar la población con fluorescencia por encima del tercer cuartil (con mayor pH_i). Se intentó determinar si la entrada de HCO_3^- es la responsable del incremento inmediato, o de su mantenimiento a tiempos más largos. Se analizaron espermatozoides incubados a tiempo inicial (0 min), o tras 1 y 4 h en medio capacitante incompleto sin el HCO_3^- ($HCO_3^- \emptyset$), o bien, incubando con un bloqueador específico del canal CFTR (Inh-172, 10 mM), para demostrar si la participación de este ion es debido a su ingreso a través de transportadores, o bien en forma de CO_2 .

Al incubar a los espermatozoides en un medio sin HCO_3^- (Fig. 12, rojo) se observó que aunque en un porcentaje ligeramente menor, el comportamiento del pH_i analizando la célula completa es muy parecido a las condiciones control (Fig. 12, negro), es decir, existe un aumento de células por encima del tercer cuartil desde el momento de la adición de medio, que se mantiene durante el tiempo de incubación. No obstante, cuando se analiza el comportamiento a nivel subcelular, el porcentaje de células por arriba del tercer del cuartil no aumenta si se analiza la cabeza o la pieza principal, pero el aumento es muy claro y sostenido en el tiempo cuando se analiza la pieza media. Esto indica la importancia del bicarbonato en el control del pH_i e indica la relevancia de la pieza media como una zona de control de este parámetro.

Por otro lado, al bloquear al canal CFTR en condiciones que no promueven la capacitación (Fig. 12, azul), se observa que hay una reducción del número de células con alta fluorescencia en comparación de la condición control (20 y 15% respectivamente). Esta reducción es clara cuando se analiza la región de la cabeza pero no para el flagelo. Sin embargo, bloquear a este canal no evita el aumento de la población con alta fluorescencia tras el estímulo con el medio

capacitante (tiempo 0 h). Aunque el número de células es menor, la proporción del cambio se mantiene constante ($\Delta \sim 15\%$). A tiempos más largos (>1 h) el número de células por encima del tercer cuartil se asemeja al número en condiciones no capacitantes, es decir, aun cuando existe el primer aumento al añadir medio capacitante (0 h) hay una reducción a tiempos largos. De manera interesante, el efecto del antagonista específico del canal CFTR se observa principalmente en la región de la cabeza (Fig. 12). Lo anterior sugiere la participación de este canal en el mantenimiento del pH intracelular durante la capacitación, pero no durante el aumento observado al instante de la adición de medio capacitante (ver discusión).

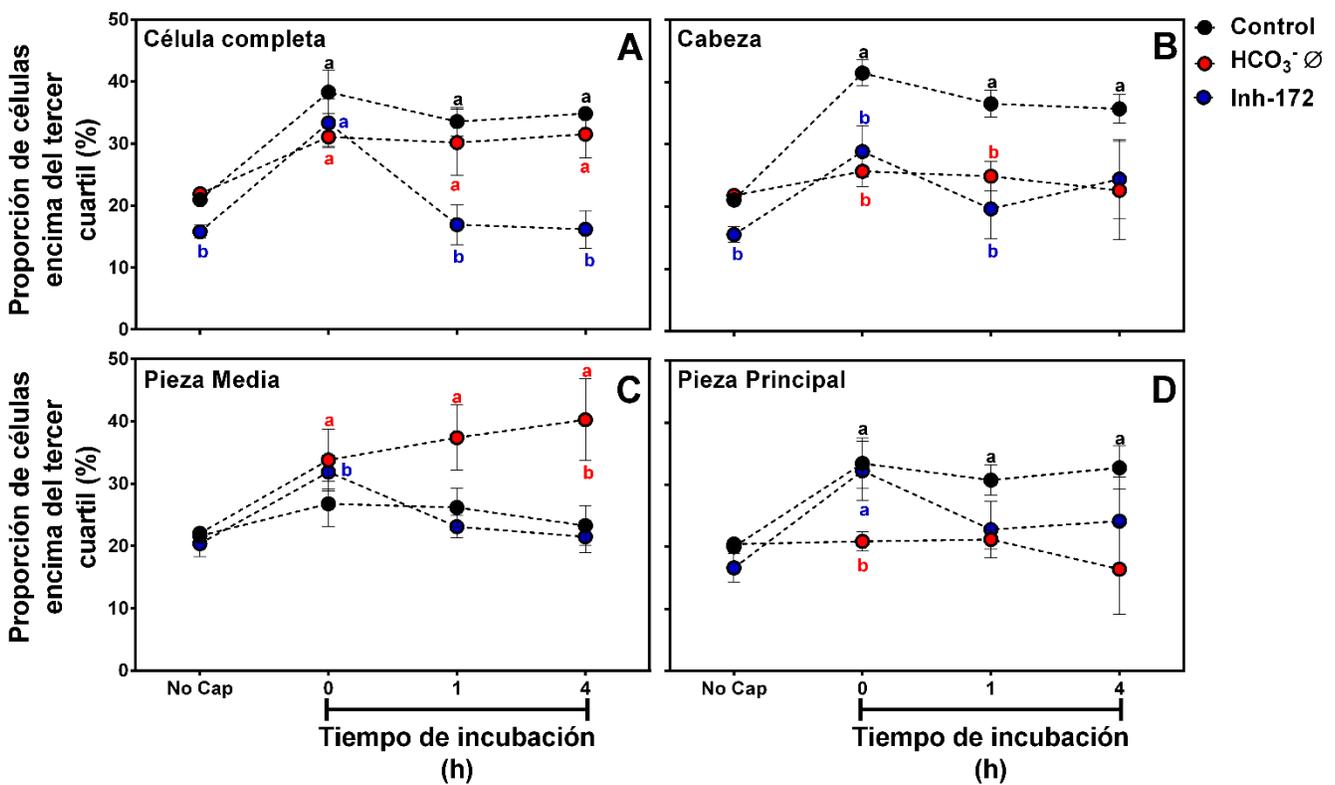


Figura 12. El transporte de bicarbonato es esencial para el control del pH_i. **A.** Proporción de células por encima del tercer cuartil durante diferentes tiempos de incubación (tiempo 0,1 y 4 h) en condiciones control (negro), en ausencia de bicarbonato (medio solo con BSA, rojo) y presencia de Inh-172 10 μM (azul). Se muestran los resultados de las diferentes regiones del espermatozoide: **B.** cabeza, **C.** pieza media y **D.** pieza principal. La letra **a** indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la condición *No Cap* control y los diferentes puntos en el tiempo de los tratamientos. La letra **b** indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre condiciones con su respectivo control a determinado tiempo (por ejemplo Control-Cap 0 h Vs tratamiento-Cap 0 h). Los colores de las letras se refieren a diferencias entre el control indicado y el tratamiento, $n = 4$.

8.8. Participación del canal Hv1 en la regulación del pH_i

Se realizaron ensayos para determinar si el canal de protones Hv1 está involucrado en la regulación del pH_i durante la capacitación como ha sido propuesto anteriormente (Lishko y Kirichok, 2010; Lishko *et al.*, 2010). Para ello se siguieron las mismas condiciones anteriormente explicadas, pero empleando un antagonista específico (CI-GBI, 200 μM) y un análogo no permeable (2-GBI, 200 μM) como control negativo.

Considerando el análisis a nivel de célula completa, el bloqueo del canal con CI-GBI, reduce en un 8% el número de células por encima del tercer cuartil en condiciones de no capacitación (Fig. 13A, anaranjado). Después de la adición de medio capacitante, las células tratadas con CI-GBI siguen presentando el aumento en dicha población descrito anteriormente pero en una menor proporción con respecto a las condiciones control (Δ 10, y Δ 15% respectivamente). Tras 1 y 4 h de capacitación el efecto del bloqueo del canal se hace más evidente, ya que el número de células por encima del tercer cuartil es equivalente a las células no capacitadas en condiciones control. Al analizar el bloqueo del canal Hv1 a nivel subcelular, se encontró que el efecto ocurre principalmente al nivel del flagelo (Fig. 13D). La proporción de células por encima del tercer cuartil se ve disminuida aun en condiciones de no capacitación tanto en la pieza media como en la principal (Fig. 13C y D). Tras añadir el medio capacitante, no se observan cambios en ninguna de estas dos regiones, ni tampoco durante el tiempo de capacitación en comparación con las condiciones control de no capacitación ($p < 0.05$). Por otro lado, la zona de la cabeza en presencia del inhibidor tiene un comportamiento similar al de las condiciones control, no obstante, tras 1 y 4 de capacitación el número de células con alta fluorescencia disminuye en comparación de las condiciones control (Fig. 13B).

Como control negativo se utilizó un compuesto análogo denominado 2-GBI, el cual funciona como bloqueador al canal, pero al ser impermeable a la membrana lo hace prácticamente inactivo en células vivas, debido a que el sitio de unión de estos compuestos se encuentra en la región citoplasmática del canal (Hong *et al.*, 2014). Se encontró que las células tratadas con 2-GBI (Fig. 13, cian) presentaron niveles similares a las condiciones control en el tiempo, a excepción de la región de la pieza media tras 4 h de capacitación en donde se observa una reducción ($p < 0.05$, Fig. 13C). Mientras que en la región de la cabeza se observó que se no produce una reducción en el número de células con alta fluorescencia en condiciones control

de no capacitación, y el comportamiento durante la incubación con medio capacitante es similar a las condiciones control (Fig. 13B).

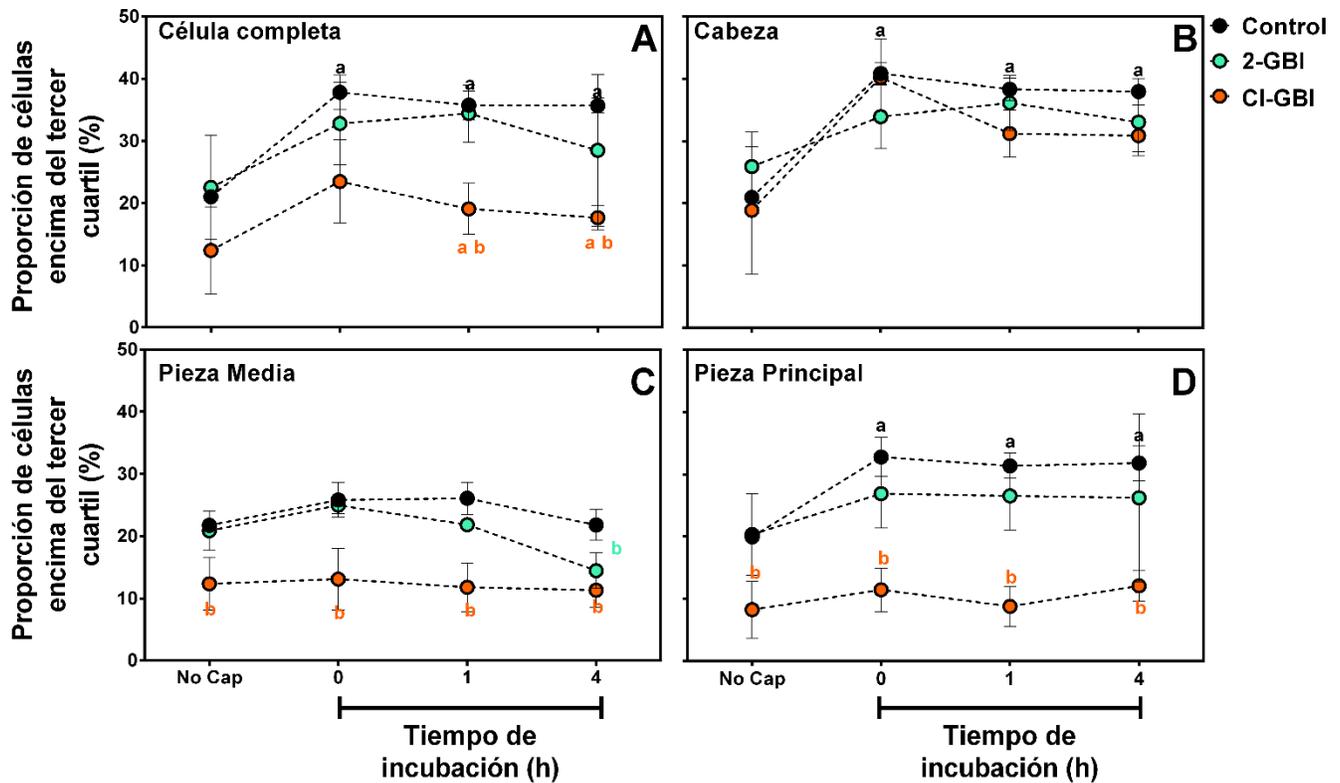


Figura 13. El canal Hv1 participa en el control del pH_i . **A.** Proporción de células con alta fluorescencia durante diferentes tiempos de incubación (tiempo 0,1 y 4 h) en condiciones control (negro), con 2-GBI 200 μM (cian), o CI-GBI 200 μM (anaranjado), empleando la máscara de espermatozoide completo. Se muestran los resultados de las diferentes regiones del espermatozoide: **B.** cabeza, **C.** pieza media y **D.** pieza principal. La letra **a** indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la condición *No Cap* control y los diferentes puntos en el tiempo de los tratamientos. La letra **b** indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre condiciones con su respectivo control a determinado tiempo (por ejemplo Control-Cap 0 h Vs tratamiento-Cap 0 h). Los colores de las letras se refieren a diferencias entre el control indicado y el tratamiento, $n = 4$.

8.9. Las entidades moleculares que participan en la regulación del pH_i están involucradas en el control de la movilidad hiperactivada

Se realizaron ensayos para evaluar la movilidad con el equipo CSA, en espermatozoides incubados en las condiciones descritas en la sección 6.6 y 6.7. Con el fin de determinar si la regulación del pH_i mediada por las condiciones antes descritas está relacionada con la movilidad.

De los fármacos utilizados, ninguno mostró una reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de células móviles con respecto a la condición control. Mientras que en ausencia de HCO_3^- se produce una reducción no significativa del 12% en la cantidad de células móviles tras cuatro h de incubación. (Fig. 14A, rojo). Por otro lado, en condiciones control se observó un aumento en el número de células hiperactivadas desde el momento de incubar a los espermatozoides en medio capacitante tiempo inicial (Fig. 14B, negro). De manera interesante, células incubadas en condiciones de ausencia de HCO_3^- , así como los tratamientos con Inh-172 o CI-GBI no fueron capaces de desarrollar el movimiento hiperactivado (Fig. 14B, azul y anaranjado) en ninguno de los puntos temporales evaluados ($p < 0.05$).

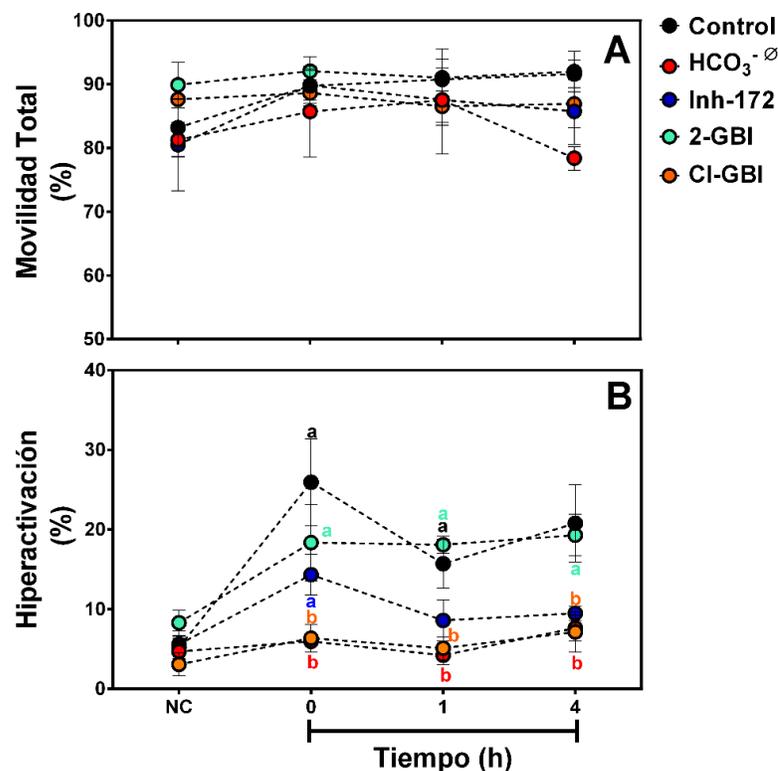


Figura 14. El transporte de bicarbonato y la activación del canal Hv1 son necesarios para el desarrollo de la hiperactivación. **A.** Movilidad total durante diferentes tiempos de incubación en condiciones control (negro), en ausencia de bicarbonato (rojo), presencia de Inh-172 10 μM (azul), 2-GBI 200 μM (cian), o CI-GBI 200 μM (anaranjado). **B.** Proporción de células hiperactivadas en las mismas condiciones de A. Los datos representan la media y el ESM de cuatro experimentos diferentes. Las letra **a** indican diferencias significativas con respecto a la condición *No Cap* control, mientras que **b** indica diferencias estadísticamente significativas con la condición control en los diferentes tiempos de capacitación ($p < 0.05$). $n = 4$.

8.10. Correlación entre el aumento de células con pH_i alto y las células hiperactivadas

Como se mencionó anteriormente, se ha sugerido que existe una relación (funcional) entre el aumento de calcio dependiente de alcalinización y el desarrollo de la HA (Lishko y Kirichok, 2010). Los resultados mostrados en las secciones 6.7-6.9 demuestran que la presencia de HCO_3^- y la actividad del canal Hv1, son necesarias para que ocurra la alcalinización asociada a la capacitación, y el desarrollo de la HA. Por lo anterior, se realizó un análisis para determinar si las células con mayor alcalinización en la región de la pieza principal correlaciona con el porcentaje de HA, con el fin de tener una aproximación sobre la posible relación entre la alcalinización y la movilidad. Se encontró que existe una correlación positiva (coeficiente de correlación de Pearson = 0.76) entre los niveles de células HA y el número de células con alcalinización en la pieza principal (Fig. 15). Los tratamientos con bajos niveles de alcalinización son los que mostraron muy baja HA (HCO_3^- , rojo, y Cl-GBI anaranjado), mientras que los tratamientos que mostraron una alcalinización normal son los que muestran altos niveles de HA (control, negro, 2-GBI, cian).

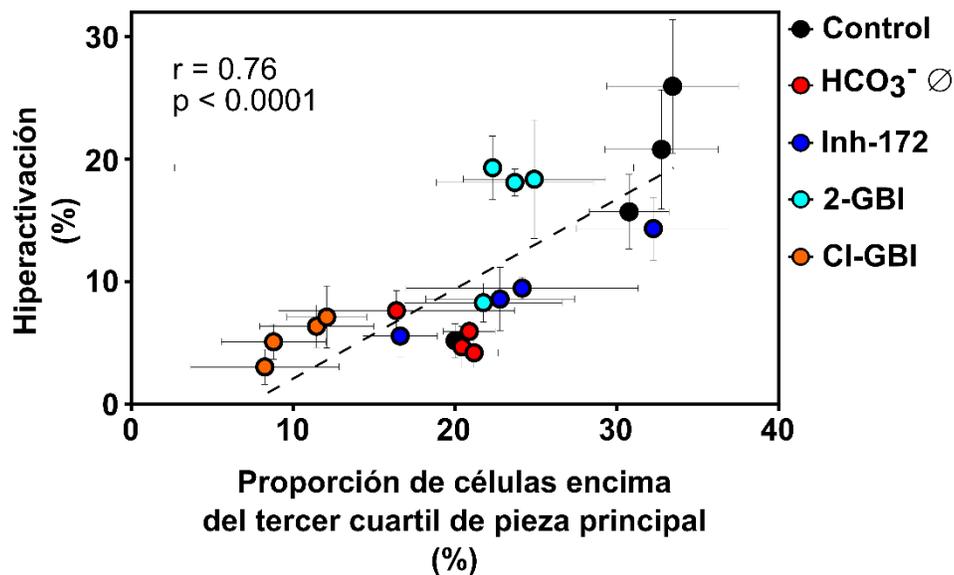


Figura 15. Correlación entre el porcentaje de células con la pieza media alcalina y la HA. Relación entre la proporción de piezas principales con mayor nivel de fluorescencia y la HA en las diferentes condiciones y tiempos de incubación: control (negro), en ausencia de bicarbonato (rojo), presencia de Inh-172 10 μM (azul), 2-GBI 200 μM (cian), o Cl-GBI 200 μM (anaranjado). Los datos representan la media y el ESM de cuatro experimentos diferentes. (Coeficiente de correlación de Pearson $r = 0.76$, $p < 0.0001$).

9. DISCUSIÓN

El pH es un regulador importante de algunos de los procesos fisiológicos del espermatozoide durante capacitación: hiperactivación, y reacción acrosomal. Lo anterior destaca la relevancia de estudiar este parámetro para tener un mejor entendimiento del proceso de capacitación. No obstante, la morfología particular, su capacidad de movimiento, la gran cantidad de células presentes así como la heterogeneidad en la población por eyaculado, complican enormemente su estudio. En el presente se plantea una estrategia experimental y de análisis que permite estudiar el cambio que el pH_i presenta en las diferentes regiones del espermatozoide durante distintas etapas del proceso de capacitación. Si bien, esta técnica ha sido empleado de manera superficial en espermatozoides de otras especies para evaluar algunos parámetros espermatozoides de alpaca (Santiani *et al.*, 2016), aunque en este trabajo no se explotó el potencial del equipo ni de la plataforma de análisis, ya que las imágenes tomadas no fueron depuradas para obtener las de mejor calidad, ni se realizó procesamiento alguno que permitiera evaluar regiones subcelulares, con lo que pareció que la técnica no aportó un avance con respecto a las técnicas de estudio del espermatozoide. En el presente trabajo se desarrolló una estrategia de adquisición, procesamiento y segmentación que permitió no solo trabajar con imágenes con la mayor calidad posible, sino medir parámetros celulares en una región tan minúscula como lo es el flagelo del espermatozoide humano (Fig. 8-13). Esta estrategia tiene la ventaja que es de simple aplicación, ya que puede ser fácilmente automatizada dadas las funciones del *software* IDEAS, lo cual ahorra tiempo de análisis, y procesamiento computacional. Otra ventaja es que todo el procesamiento se realiza sobre imágenes en campo claro, por lo que no se requiere de ningún tipo de tinción o marcaje lo cual permite utilizar al máximo los canales de fluorescencia disponibles (9 en total en el Image Stream Mark II). Asimismo, funciona tanto en células fijadas (Fig. 8) como en células vivas (Fig. 9-13), lo que permite realizar diversos tipos de mediciones. Lo anterior es de gran importancia ya que la estrategia desarrollada en el presente trabajo puede ser utilizada en el campo de la fisiología espermática para obtener información multiparamétrica, a nivel subcelular y poblacional, lo que puede ser una técnica poderosa para realizar ensayos de cribado de alto rendimiento para el desarrollo de fármacos, complementaria para el diagnóstico de problemas de fertilidad masculina, o bien, para investigar vías de transducción de señales.

Las observaciones hechas por nuestro grupo (Lopez-Gonzalez *et al.*, 2014) y por otros (Cross y Razy-Faulkner, 1997) muestran que existe una alcalinización intracelular asociada al proceso de capacitación (revisado en Nishigaki *et al.*, 2014). Los resultados aquí obtenidos, indican que existe un comportamiento tiempo dependiente en el proceso de alcalinización, ya que desde el contacto con el medio capacitante las células experimentan una alcalinización que va aumentando hasta los primeros 30 min, seguida de una disminución que alcanza una fase estacionaria tras la primera hora, la cual se mantiene durante el resto de la capacitación (Fig. 11 A y B). En la cabeza y en la pieza principal se observa claramente este aumento tiempo dependiente, mientras que en la zona de la pieza media se observa un comportamiento constante en el tiempo. La estabilidad del pH_i en la pieza media quizá se deba a que esta región funciona como una zona de amortiguación del pH, ya que al ser el sitio de localización de las mitocondrias el equilibrio de la concentración de protones en la vecindad de este organelo debe estar finamente regulado. Es probable que una alcalinización en el citoplasma que rodea a las mitocondrias sea rápidamente contrarrestado con un aumento en la concentración de protones (provenientes de las propias mitocondrias, o del espacio extracelular) manteniendo el pH invariable. Experimentos utilizando desacoplantes de los sistemas de transporte de electrones mitocondriales podrían ayudar a corroborar lo anterior.

Los resultados obtenidos sugieren que el transporte de HCO_3^- es esencial para que ocurra la alcalinización asociada a la capacitación, ya que al realizar mediciones en ausencia de este ion ($HCO_3^- \emptyset$) no se observa ningún cambio de pH_i en la cabeza ni en el flagelo, aunque de manera interesante, esta condición produce un aumento continuo del pH_i en la región de pieza media (Fig. 12, rojo). Lo que sugiere que el otro componente del medio capacitante, la BSA, por un mecanismo no esclarecido, es capaz de desencadenar una vía de señalización que produce una alcalinización a nivel de la pieza media, que de alguna manera, en presencia de HCO_3^- es contrarrestada. Adicionalmente, la ausencia de HCO_3^- impide el desarrollo de la movilidad hiperactivada. Como ya se ha reportado, el bicarbonato es necesario y suficiente para que se desarrolle la HA (Suarez, 2008a; Hereng *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se empleó un antagonista específico del canal CFTR con el fin de determinar su participación en el control del pH_i a nivel regional y temporal. Se encontró que el CFTR es relevante para mantener las condiciones de alcalinización durante la capacitación a tiempos largos, pero no es responsable del aumento inicial (Fig. 12). Evidencia obtenida por

nuestro grupo de trabajo sugiere que la inhibición del CFTR produce una alcalinización intracelular debido a la modulación de la entrada de HCO_3^- por transportadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Chávez *et al.*, 2012; Puga Molina *et al.*, 2017). Los resultados aquí presentados, al igual que en otros previos, sugieren que otra u otras proteínas como las responsables del aumento rápido del HCO_3^- . Como se mencionó, en el ratón, el co-transportador Na-HCO_3^- (NBC) es el responsable del rápido aumento de la $[\text{HCO}_3^-]_i$ (Demarco *et al.*, 2003b). En humanos, no se ha determinado completamente la participación del NBC, no obstante, experimentos realizados por nuestro grupo, demostraron que al incubar a espermatozoides capacitados por >2 h en presencia de un antagonista del NBC se previene el aumento de pH intracelular asociado a capacitación (Puga-Molina, datos no publicados). Más experimentos son necesarios para determinar si el NBC participa en el transporte de HCO_3^- responsable del primer aumento de pH_i aquí reportado. Por otra parte, bloquear el canal no presenta efecto alguno sobre la movilidad general, pero si para el desarrollo de la HA, como había sido reportado anteriormente (Puga Molina *et al.*, 2017) (ver abajo para más detalles).

Se determinó la participación del Hv1 durante la capacitación, utilizando un antagonista específico (Cl-GBI) y un análogo no permeable en células vivas (2-GBI) (Hong *et al.*, 2014). El Cl-GBI reduce la cantidad de células con alto pH_i , pero este efecto solo ocurre únicamente en el flagelo (Fig. 13), lo que concuerda con la localización subcelular del canal (Lishko *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos sugieren que el canal se encuentra activo en condiciones de no capacitación, ya que al bloquearlo, se reduce el número de células que presentan una alcalinización. No obstante, se sigue observando el aumento inicial anteriormente mencionado, pero solo en la región de la cabeza, indicando que quizá, el aumento se debe a otros mecanismos, como el transporte de HCO_3^- como se postuló anteriormente. Adicionalmente, en este trabajo representa el primer reporte de la participación en la hiperactivación del canal Hv1 en el espermatozoide humano. El antagonista específico del canal Hv1 bloquea completamente el desarrollo de la HA, aun en presencia de medio capacitante (Fig. 14B).

Los mecanismos de activación del canal Hv1 durante capacitación no se han explorado completamente. Dado que, tanto el transporte de HCO_3^- es esencial para el desarrollo de la HA, la evidencia aquí obtenida sugiere que la actividad del canal Hv1 este regulada río abajo de la entrada de HCO_3^- . Con respecto a lo anterior, se ha reportado que la fosforilación de un residuo de treonina en la posición 29 estimula al Hv1 en leucocitos, dicha fosforilación puede ser

dependiente de PKC (Musset *et al.*, 2010). En espermatozoides humanos la vía HCO_3^- /cAMP/PKA está relacionada funcionalmente de manera negativa con la vía PKC/ERK1-2, (Rahamim Ben-Navi *et al.*, 2016), lo que sugiere que quizá, en el contexto de la capacitación en espermatozoides humanos, el canal Hv1 no sea regulado por fosforilación mediada por PKC, no obstante, se requieren de más estudios para comprobarlo. Por otro lado, se ha descrito que el Hv1 requiere de una fuerte despolarización para poder abrirse (Takeshita *et al.*, 2014; De-la-Rosa *et al.*, 2016), sin embargo el potencial de membrana de los espermatozoides humanos capacitados tiende a estar hiperpolarizado durante la capacitación (Lopez-Gonzalez *et al.*, 2014), sugiriendo que otros mecanismos independientes al potencial de membrana influyen en la activación del canal. Recientemente se reportó que al aplicar un estímulo mecánico (es decir presión positiva en la membrana) en combinación con un gradiente de pH ($\text{pH}_e=7.5$; $\text{pH}_i=6$) el canal Hv1 se activa a potenciales (-20 mV) que en condiciones estándar (sin estímulo mecánico y sin gradiente) permanecería totalmente cerrado (Pathak *et al.*, 2016). De igual manera, se demostró que existen variantes específicas de testículo del canal Hv1 denominadas Hv1Sper, las cuales son producto de un corte proteolítico en la región N-terminal (R68). Cuando son expresados heterológicamente, estas variantes se activan a potenciales menos despolarizantes en condiciones simétricas de pH ($\text{pH}_e = \text{pH}_i$), mientras que en condiciones con un gradiente de pH ($\text{pH}_e/\text{pH}_i > 0$) se requieren potenciales aún menos positivos (Berger *et al.*, 2017). Estos dos reportes indican una situación muy interesante, que podría ocurrir en el contexto del espermatozoide humano, dado que durante su trayecto por el TGF el espermatozoide experimenta numerosos estímulos que pueden cambiar las propiedades biofísicas de la membrana plasmática que podrían estar involucrados en la modulación de la actividad del canal: el contraflujo producido por los fluidos del propio TGF (Miki y Clapham, 2013; Kantsler *et al.*, 2014); el proceso de anclaje/desanclaje en las paredes del epitelio (Suarez, 2008b, 2016); o los cambios en la fluidez de la membrana producto del eflujo del colesterol durante capacitación (Buffone *et al.*, 2009; Gadella y Leahy, 2015). De igual manera, el gradiente de pH entre el interior y el exterior (Liu *et al.*, 2012; Nishigaki *et al.*, 2014) podrían intervenir en la modulación de la apertura y/o potenciación de la actividad del canal Hv1; son necesarios experimentos adicionales para comprobar estas ideas son necesarios. Considerando lo anterior, Cross y Razy-Faulkner (1997), encontraron que al capacitar a los espermatozoides en presencia de colesterol extracelular, impidiendo su remoción de la membrana, no se observa la alcalinización asociada a capacitación. Además, Buffone y colaboradores reportaron que al incubar espermatozoides

capacitados con alto colesterol extracelular se reduce la proporción de espermatozoides hiperactivados (Buffone *et al.*, 2009). Todo lo anterior sugiere que las variante Hv1Sper, así como el cambio de la fluidez de membrana producto del eflujo de colesterol, faciliten la activación del canal durante capacitación, lo que produciría una alcalinización en la región de la pieza principal necesaria para activar una cascada de señalización que permite el desarrollo de la HA.

El presente trabajo representa el primer estudio de la regulación del pH_i en diferentes regiones del espermatozoide humano y durante distintas etapas del proceso de capacitación.. Dentro de nuestro conocimiento, los resultados obtenidos sugieren la presencia de un sistema de compartimentación intracelular que participa en la regulación de pH_i , e interviene en otros procesos asociados a capacitación como la HA. Los cambios de pH_i asociados a la entrada de HCO_3^- ocurren principalmente en la región de la cabeza (Fig. 11, 12), lo que concuerda con que ninguna proteína transportadora de HCO_3^- se ha detectado en la región de la pieza principal (ver Tabla 1, Fig. 2). Posteriormente, la entrada de HCO_3^- estimularía a la sAC, como se ha reportado previamente (Hess *et al.*, 2005; Buffone *et al.*, 2014). De manera interesante, la localización de esta proteína (en ratón) se ha detectado únicamente en la región de la pieza media y el *annulus* (Hess *et al.*, 2005). La activación de ésta produciría un aumento de AMPc, lo que conllevaría a la activación de PKA (Ickowicz *et al.*, 2012; Battistone *et al.*, 2013), cuya localización (en ratón) se ha detectado únicamente en flagelo (Wertheimer *et al.*, 2013), sugiriendo la existencia de un sistema de compartimentación altamente regulado. La activación de PKA conllevaría a la fosforilación de CFTR lo que estimularía su actividad y permitiría el mantenimiento del pH alcalino durante capacitación (Puga Molina *et al.*, 2017). Adicionalmente, tanto la entrada de HCO_3^- como la activación de Hv1 son esenciales para que se produzca la alcalinización asociada a capacitación y la HA (Fig. 12-14), por lo que debe existir un sistema de comunicación que converge en la activación del canal, cuya localización está restringida al flagelo (Lishko *et al.*, 2010). La salida de protones mediada por Hv1 produce una alcalinización a nivel del flagelo (Fig. 13), la cual podría activar al canal CatSper produciendo un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el flagelo, donde se ha localizado (Kirichok *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2014), así como estimular a las dinein-ATPasas componentes esenciales del axonema móvil (Inaba, 2011; Mohri *et al.*, 2012). Tanto la entrada de calcio, como la activación de las dinein-ATPasas son necesarias para el desarrollo de la HA (Ho *et al.*, 2002). En la figura 15 se observa que existe una correlación positiva entre el porcentaje de células que presentan valores elevados de fluorescencia (mayor pH_i) en la pieza media y el porcentaje de HA, lo que sugiere que existe una relación funcional entre la

alcalinización y la hiperactivación. Finalmente, en la figura 16 se presenta un modelo que resume los resultados y propuestas del presente trabajo.

Todo lo previamente mencionado indica que existen cambios diferenciales del pH_i tanto en tiempo como en espacio en espermatozoides humanos durante capacitación, cuya regulación está controlada por diversas entidades moleculares. Los resultados aquí presentes implican que la compartimentación, y la intercomunicación entre los diferentes procesos y regiones esta finamente controlada espacial y temporalmente. Investigación adicional se requiere para conocer como es la comunicación, y la regulación de la señalización entre las regiones del espermatozoide, y como es la relación entre el pH_i , los flujos de calcio, y la hiperactivación.

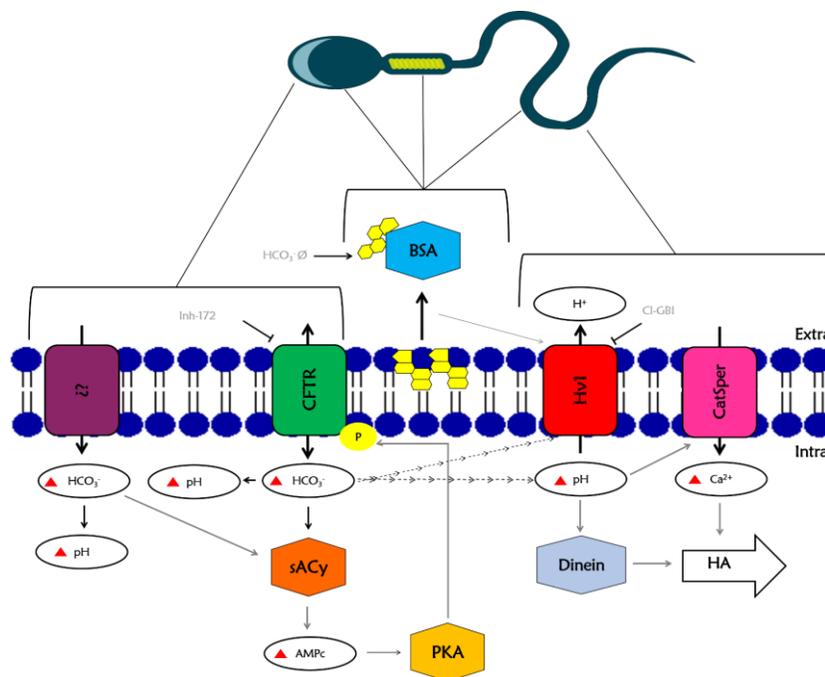


Figura 16. Modelo propuesto del control del pH_i durante capacitación y las vías de señalización indicadas en el presente trabajo. Un aumento inmediato de pH ocurre cuando las células se exponen a una alta concentración de HCO_3^- . Este aumento puede estimular la vía AMPc/PKA provocando la fosforilación del CFTR estimulando su actividad, contribuyendo a mantener alta la concentración de HCO_3^- y promoviendo una retroalimentación que mantiene la alcalinización durante capacitación. La entrada de HCO_3^- así como la extrusión de colesterol de la membrana plasmática podrían estimular la activación del canal Hv1, generando una alcalinización a nivel de la pieza media, lo que podría activar a mecanismos que permiten la activación de CatSper que aumentaría la concentración de calcio, y la activación de las dinein-ATPasas, lo que culmina con el desarrollo de la HA (las flechas negras indican lo reportado en este trabajo, las grises lo reportado en otros trabajos, y las flechas discontinuas indican lo propuesto en este trabajo pero no comprobado).

10. CONCLUSIONES

- La técnica de microscopía de flujo permite medir la fluorescencia del colorante BCECF en poblaciones de espermatozoides.
- Las máscaras generadas permiten realizar la segmentación de las imágenes de espermatozoides para evaluar regiones independientes.
- Se observa que existe un aumento diferencial a nivel temporal y espacial del pH_i durante capacitación, dicha alcalinización ocurre de manera similar en la región de la cabeza y la pieza principal pero no en la pieza media.
- La entrada de bicarbonato es esencial para el aumento del pH_i y el desarrollo de la hiperactivación.
- El canal CFTR no participa en el primer aumento de pH , pero si en el mantenimiento del estado alcalino durante la capacitación, y es necesario para el desarrollo de la hiperactivación.
- El canal de protones Hv1 es el regulador principal del pH en el flagelo pero no en la cabeza, su actividad es esencial para el desarrollo de la hiperactivación.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar la participación del NBC en el primer aumento de pH .
- Estudiar la regulación molecular del canal Hv1 durante capacitación.
- Determinar la vía de señalización que conecta la alcalinización intracelular y la hiperactivación
- Analizar la relación de la alcalinización con otros aspectos funcionales en el espermatozoide: reacción acrosomal, capacidad de fecundación.

12. REFERENCIAS

- Al-Dossary AA, Bathala P, Caplan JL, Martin-DeLeon PA. Oviductosome-Sperm Membrane Interaction in Cargo Delivery. *J Biol Chem* 2015;**290**:17710–17723.
- Alasmari W, Costello S, Correia J, Oxenham SK, Morris J, Fernandes L, Ramalho-Santos J, Kirkman-Brown J, Michelangeli F, Publicover S, *et al.* Ca^{2+} Signals Generated by CatSper and Ca^{2+} Stores Regulate Different Behaviors in Human Sperm. *J Biol Chem* 2013;**288**:6248–6258.

- Ali Akbar S, Nicolaidis K., Brown P. Carbonic anhydrase isoenzymes CAI and CAII in semen, decidua, chorionic villi and various fetal tissues. *Early Hum Dev* 1998;**51**:205–211.
- Andrews RE, Galileo DS, Martin-DeLeon PA. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4: interaction with constitutive nitric oxide synthases in human sperm and prostasomes which carry Ca²⁺/CaM-dependent serine kinase. *Mol Hum Reprod* 2015;**21**:832–843.
- Austin CR, Sakkas D. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res* 1951;**8**:581–596.
- Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith LLH, Kahrizi K, Najmabadi H, Smith RJH. Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *Am J Hum Genet* 2009;**84**:505–510. The American Society of Human Genetics.
- Bahr GF, Engler WF. Considerations of volume, mass, DNA, and arrangement of mitochondria in the midpiece of bull spermatozoa. *Exp Cell Res* 1970;**60**:338–340.
- Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 2007;**8**:227. BioMed Central.
- Battistone MA, Ros VG Da, Salicioni AM, Navarrete FA, Krapf D, Visconti PE, Cuasnicú PS. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Mol Hum Reprod* 2013;**19**:.
- Berger TK, Fußhöller DM, Goodwin N, Bönigk W, Müller A, Dokani Khesroshahi N, Brenker C, Wachten D, Krause E, Kaupp UB, *et al.* Post-translational cleavage of Hv1 in human sperm tunes pH- and voltage-dependent gating. *J Physiol* 2017;**0**:1–14.
- Brenker C, Zhou Y, Müller A, Echeverry FA, Trötschel C, Poetsch A, Xia X-M, Bönigk W, Lingle CJ, Kaupp UB, *et al.* The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3. *Elife* 2014;**3**:e01438.
- Buffone MG, Verstraeten S V, Calamera JC, Doncel GF. High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *J Androl* 2009;**30**:552–558.
- Buffone MG, Wertheimer E V, Visconti PE, Krapf D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim Biophys Acta* 2014;**1842**:2610–2620.

- Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB. Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Human Sperm by a Calcium/Calmodulin-Dependent Mechanism: Identification of A Kinase Anchor Proteins as Major Substrates for Tyrosine Phosphorylation. *Dev Biol* 1996;**180**:284–296.
- Casey JR. Why bicarbonate? *Biochem Cell Biol* 2006;**84**:930–939.
- Chang M. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature* 1951;**168**:697–698.
- Chávez JC, Ferreira JJ, Butler A, La Vega Beltrán JL De, Treviño CL, Darszon A, Salkoff L, Santi CM. SLO3 K⁺ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *J Biol Chem* 2014;**289**:32266–32275.
- Chávez JC, Hernández-González EO, Wertheimer E, Visconti PE, Darszon A, Treviño CL. Participation of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl⁻ channel CFTR, and the regulatory factor SLC9A3R1 in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 2012;**86**:1–14.
- Chen S-R, Chen M, Deng S-L, Hao X-X, Wang X-X, Liu Y-X. Sodium–hydrogen exchanger NHA1 and NHA2 control sperm motility and male fertility. *Cell Death Dis* 2016;**7**:e2152. Nature Publishing Group.
- Chung J-JJ, Shim S-HH, Everley RA, Gygi SP, Zhuang X, Clapham DE. Structurally distinct Ca²⁺ signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell* 2014;**157**:808–822.
- Cross NL, Razy-Faulkner P. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod* 1997;**56**:1169–1174.
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Trevino CL. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol Rev* 2011;**91**:1305–1355.
- De-la-Rosa V, Suárez-Delgado E, Rangel-Yescas GE, Islas LD. Currents through Hv1 channels deplete protons in their vicinity. *J Gen Physiol* 2016;**147**:127–136.
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, la Vega-Beltrán JL de, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporter in Mouse Sperm

- Capacitation . *J Biol Chem* 2003a;**278**:7001–7009.
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, la Vega-Beltrán JL de, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE. Involvement of a Na⁺ /HCO⁻ Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation. *J Biol Chem* 2003b;**278**:7001–7009.
- Escoffier J, Navarrete F, Haddad D, Santi CM, Darszon A, Visconti PE. Flow Cytometry Analysis Reveals That Only a Subpopulation of Mouse Sperm Undergoes Hyperpolarization During Capacitation. *Biol Reprod* 2015;**92**:1–11.
- Gadella B, Leahy T. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian J Androl* 2015;**17**:561.
- Halmi P, Lehtonen J, Waheed A, Sly WS, Parkkila S. Expression of hypoxia-inducible, membrane-bound carbonic anhydrase isozyme XII in mouse tissues. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;**277**:171–177.
- Hereng TH, Elgstøen KBP, Eide L, Rosendal KR, Skålhegg BS. Serum albumin and HCO³⁻ regulate separate pools of ATP in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2014;**29**:918–930.
- Hernández-González EO, Treviño CL, Castellano LE, la Vega-Beltrán JL de, Ocampo AY, Wertheimer E, Visconti PE, Darszon A. Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 2007;**282**:24397–24406.
- Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, *et al.* The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 2005;**9**:249–259.
- Ho H-C, Granish KA, Suarez SS. Hyperactivated Motility of Bull Sperm Is Triggered at the Axoneme by Ca²⁺ and Not cAMP. *Dev Biol* 2002;**250**:208–217.
- Ho H-C, Suarez SS. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 2003;**68**:1590–1596.
- Hong L, Kim IH, Tombola F. Molecular determinants of Hv1 proton channel inhibition by guanidine derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;**111**:9971–9976.
- Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl* 2012;**14**:816–821.

- Inaba K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod* 2011;**17**:524–538.
- John JCST, Sakkas D, Barrat CLR. A Role for Mitochondrial DNA Review and Sperm Survival. *J Androl* 2000;**21**:189–199.
- José O, Torres-Rodríguez P, Forero-Quintero LS, Chávez JC, la Vega-Beltrán JL De, Carta F, Supuran CT, Deitmer JW, Treviño CL. Carbonic anhydrases and their functional differences in human and mouse sperm physiology. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;**468**:713–718.
- Kantsler V, Dunkel J, Blayney M, Goldstein RE. Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. *Elife* 2014;**3**:e02403.
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* 2006;**439**:737–740.
- Krzywinski M, Altman N. Visualizing samples with box plots. *Nat Methods* 2014;**11**:119–120.
- La Vega-Beltran JL De, Sánchez-Cárdenas C, Krapf D, Hernandez-González EO, Wertheimer E, Treviño CL, Visconti PE, Darszon A. Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *J Biol Chem* 2012;**287**:44384–44393.
- Lehtonen J, Shen B, Vihinen M, Casini A, Scozzafava A, Supuran CT, Parkkila A-K, Saarnio J, Kivelä AJ, Waheed A, *et al.* Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J Biol Chem* 2004;**279**:2719–2727.
- Lishko P V., Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. *Cell* 2010;**140**:327–337. Elsevier Ltd.
- Lishko P V., Kirichok Y. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol* 2010;**588**:4667–4672.
- Liu T, Huang J-C, Lu C-L, Yang J-L, Hu Z-Y, Gao F, Liu Y-X. Immunization with a DNA vaccine of testis-specific sodium-hydrogen exchanger by oral feeding or nasal instillation reduces fertility in female mice. *Fertil Steril* 2010;**93**:1556–1566.
- Liu Y, Wang D-KD-K, Chen L-M. The Physiology of Bicarbonate Transporters in Mammalian Reproduction. *Biol Reprod* 2012;**86**:99–99.

- Lopez-Gonzalez I, Torres-Rodriguez P, Sanchez-Carranza O, Solis-Lopez A, Santi CM, Darszon A, Trevino CL. Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod* 2014;**20**:619–629.
- Mannowetz N, Naidoo NM, Choo S-AS, Smith JF, Lishko P V. Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *Elife* 2013;**2**:e01009.
- Mata-Martínez E, José O, Torres-Rodríguez P, Solís-López A, Sánchez-Tusie AA, Sánchez-Guevara Y, Treviño MB, Treviño CL. Measuring intracellular Ca²⁺ changes in human sperm using four techniques: conventional fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging. *J Vis Exp* 2013;e50344.
- Medina JF, Recalde S, Prieto J, Lecanda J, Saez E, Funk CD, Vecino P, Roon MA van, Ottenhoff R, Bosma PJ, *et al.* Anion exchanger 2 is essential for spermiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:15847–15852.
- Mezquita P. Novel transcripts of carbonic anhydrase II in mouse and human testis. *Mol Hum Reprod* 1999;**5**:199–205.
- Miki K, Clapham DE. Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr Biol* 2013;**23**:
- Miller MR, Mansell SA, Meyers SA, Lishko P V. Cell Calcium Flagellar ion channels of sperm : similarities and differences between species. *Cell Calcium* 2015;**58**:105–113. Elsevier Ltd.
- Mohri H, Inaba K, Ishijima S, A. BS. Tubulin-dynein system in flagellar and ciliary movement. *Proc Japan Acad Ser B* 2012;**88**:397–415.
- Mortimer ST. CASA—Practical Aspects. *J Androl* 2000;**21**:515–524.
- Musset B, Capasso M, Cherny V V., Morgan D, Bhamrah M, Dyer MJS, DeCoursey TE. Identification of Thr29 as a critical phosphorylation site that activates the human proton channel Hvcn1 in leukocytes. *J Biol Chem* 2010;**285**:5117–5121.
- Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE. KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:7688–7692.
- Niggli V, Sigel E, Carafoli E. The purified Ca²⁺ pump of human erythrocyte membranes catalyzes an electroneutral Ca²⁺-H⁺ exchange in reconstituted liposomal systems. *J Biol Chem* 1982;**257**:2350–2356.

- Nishigaki T, José O, González-Cota AL, Romero F, Treviño CL, Darszon A. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;**450**:1149–1158. Elsevier Inc.
- Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* 2013;**140**:4471–4479.
- Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, Miller DA, Prasad V, Doetschman T, *et al.* Targeted Ablation of Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 Indicates a Major Housekeeping Function for PMCA1 and a Critical Role in Hyperactivated Sperm Motility and Male Fertility for PMCA4. *J Biol Chem* 2004;**279**:33742–33750.
- Parkkila S, Kaunisto K, Kellokumpu S, Rajaniemi H. A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa. *Histochemistry* 1991;**95**:477–482.
- Parkkila S, Rajaniemi H, Kellokumpu S. Polarized expression of a band 3-related protein in mammalian sperm cells. *Biol Reprod* 1993;**49**:326–331.
- Pathak MM, Tran T, Hong L, Joós B, Morris CE, Tombola F. The Hv1 proton channel responds to mechanical stimuli. *J Gen Physiol* 2016;**148**:405–418.
- Pesch S, Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 2006;**37**:597–612.
- Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel A-R, Töpfer-Petersen E. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *J Androl* 2003;**24**:423–437.
- Puga Molina LC, Pinto NA, Torres Rodríguez P, Romarowski A, Vicens Sanchez A, Visconti PE, Darszon A, Treviño CL, Buffone MG. Essential Role of CFTR in PKA-Dependent Phosphorylation, Alkalinization, and Hyperpolarization During Human Sperm Capacitation. *J Cell Physiol* 2017;**232**:1404–1414.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill T a, Clapham DE. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:1219–1223.
- R Core Team. R project. *R A Lang enviroment Stat Comput* 2016; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.

- Rahamim Ben-Navi L, Almog T, Yao Z, Seger R, Naor Z. A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa. *Sci Rep* 2016;**6**:37922.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001;**413**:603–609.
- Santi CM, Martínez-López P, la Vega-Beltrán JL de, Butler A, Alisio A, Darszon A, Salkoff L. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* 2010;**584**:1041–1046.
- Santiani A, Ugarelli A, Evangelista-Vargas S. Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 2016;**173**:49–55. Elsevier B.V.
- Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, Armesilla AL, Emerson M, Oceandy D, Knobloch K-P, *et al.* Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase 4 Is Required for Sperm Motility and Male Fertility. *J Biol Chem* 2004;**279**:28220–28226.
- Singh AP, Rajender S. CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online* 2015;**30**:28–38. Reproductive Healthcare Ltd.
- Suarez SS. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* 2008a;**14**:647–657.
- Suarez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 2008b;**52**:455–462.
- Suarez SS. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 2016;**363**:185–194.
- Sun-Wada G-H, Imai-Senga Y, Yamamoto A, Murata Y, Hirata T, Wada Y, Futai M. A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. *J Biol Chem* 2002;**277**:18098–18105.
- Sun X, Zhu Y, Wang L, Liu H, Ling Y, Li Z, Sun L. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol* 2017;**15**:65. Reproductive Biology and Endocrinology.
- Takeshita K, Sakata S, Yamashita E, Fujiwara Y, Kawanabe A, Kurokawa T, Okochi Y, Matsuda M, Narita H, Okamura Y, *et al.* X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nat*

Struct Mol Biol 2014;**21**:352–357. Nature Publishing Group.

Touré A, Lhuillier P, Gossen JA, Kuil CW, Lhôte D, Jégou B, Escalier D, Gacon G. The testis anion transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse. *Hum Mol Genet* 2007;**16**:1783–1793.

Wandernoth PM, Raubuch M, Mannowetz N, Becker HM, Deitmer JW, Sly WS, Wennemuth G. Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. *PLoS One* 2010;**5**:e15061. Public Library of Science.

Wang D, King SM, Quill TA, Doolittle LK, Garbers DL. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ Exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol* 2003;**5**:1117–1122.

Wertheimer E, Krapf D, La Vega-Beltran JL De, Sánchez-Cárdenas C, Navarrete F, Haddad D, Escoffier J, Salicioni AM, Levin LR, Buck J, *et al.* Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J Biol Chem* 2013;**288**:35307–35320.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. *WHO Press* 2010;**FIFTH EDIT**:286.

Xu WM, Shi QX, Chen WY, Zhou CX, Ni Y, Rowlands DK, Yi Liu G, Zhu H, Ma ZG, Wang XF, *et al.* Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:9816–9821.

Zeng X-H, Navarro B, Xia X-M, Clapham DE, Lingle CJ. Simultaneous knockout of Slo3 and CatSper1 abolishes all alkalization- and voltage-activated current in mouse spermatozoa. *J Gen Physiol* 2013;**142**:305–313.

Zeng X-H, Yang C, Kim ST, Lingle CJ, Xia X-M. Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K⁺ current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:5879–5884.

13. APÉNDICES

13.1. Análisis de imágenes obtenidas por microscopía de flujo (AMNIS)

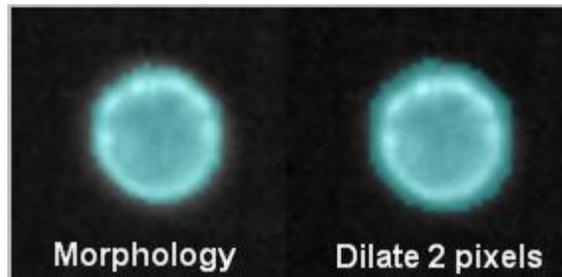
Para analizar las imágenes obtenidas durante el trabajo experimental se utilizó el *software* IDEAS (*Image Data Exploration and Analysis Software*) versión 6.2. Como se mencionó en la sección 7.7, el análisis de las imágenes se realiza creando máscaras que pueden adaptarse para distinguir las regiones de interés. A continuación se describen los detalles de los operadores utilizados y las características de las máscaras utilizadas para desarrollar las máscaras de segmentación y el procesamiento de evaluación de dichas mascararas (secciones 8.1 y 8.2, Fig. 6).

13.1.1. Máscaras

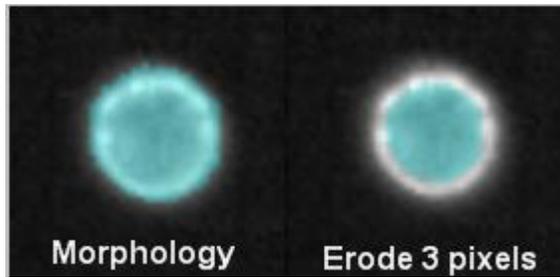
Máscara Morphology: Esta es la máscara elemental a partir de la cual se parte todos los análisis posteriores al permitir detectar la figura del espermatozoide. La función de esta máscara es incluir todos los píxeles dentro del contorno más exterior de la imagen. Se utiliza en las para calcular los valores de las características generales basadas en la forma. En la figura 5A se observa una célula con (izquierda) y con la máscara (derecha) *morphology*.

13.1.2. Funciones

Dilate: La función dilatar es lo opuesto a la erosión ya que agrega n píxeles sobre todos los bordes de la imagen. Dando como resultado una imagen de mayor tamaño. Esta función es en combinación de operaciones booleanas para delimitar regiones subcelulares (Fig. 5 y 6).

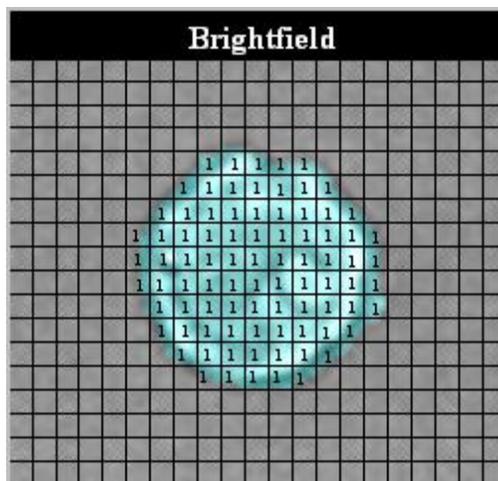


Erosion: La función erosionar consiste en remover n cantidad de píxeles de todos los bordes de la máscara inicial, lo que da como resultado una imagen de menor tamaño. Es útil para delimitar mejor el contorno de la célula, y en conjunto con la función dilatar se emplea para rellenar huecos en la imagen.

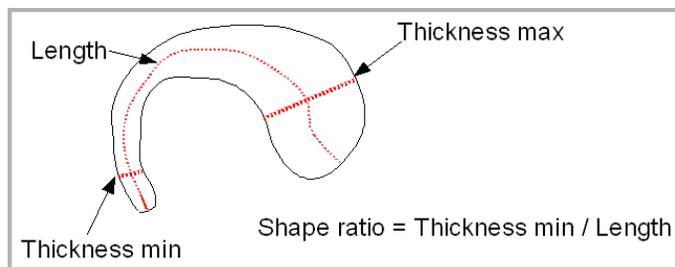


13.1.3. Características

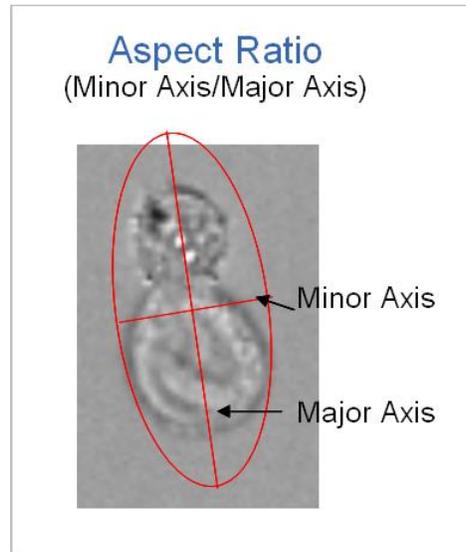
Área: Equivale al número de micrones cuadrados dentro de la máscara de trabajo. En la figura que se muestra a continuación cada pixel esta delineado con el número 1. El número de pixeles se convierte a μm^2 , en las imágenes captadas con el objetivo 60X un pixel equivale a $0.3 \mu\text{m}^2$, una imagen con 2000 pixeles equivale a $600 \mu\text{m}^2$.



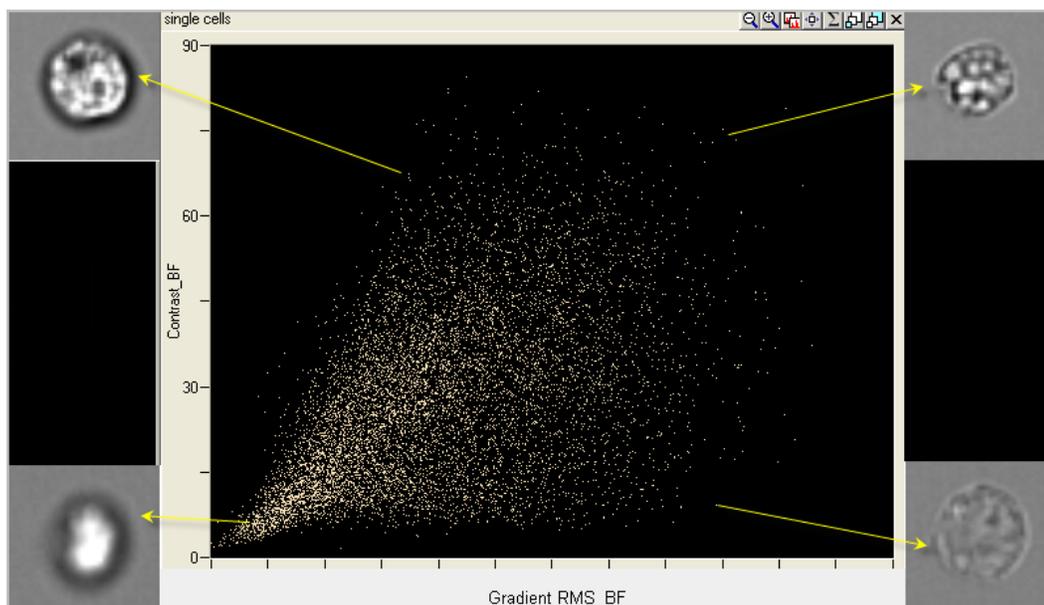
Longitud: Esta característica mide la parte más larga dentro de un objeto dentro de la máscara. Esta función es útil aun en imágenes con células como los espermatozoides que no son precisamente uniformes.



Aspect Ratio: Esta característica es el cociente de dividir el eje menor, entre el eje mayor y sirve para determinar qué tan redondo es un objeto. Los valores de esta relación van de 0 a 1, donde 0 es un objeto pobremente redondo, y 1 es un objeto completamente circular. Es especialmente útil para distinguir a los espermatozoides de celular con morfología redonda.

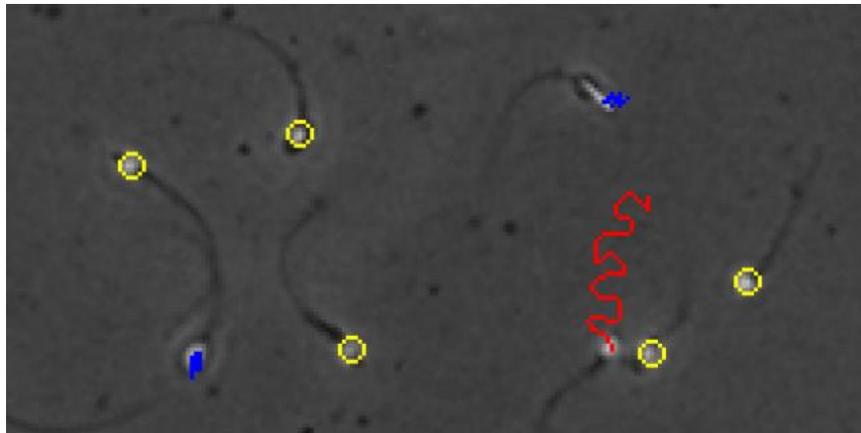


Gradient RMS: Esta característica mide la cantidad de nitidez de una imagen. Funciona detectando grandes cambios en valores de pixeles al calcular el gradiente cuadrático medio de un pixel en comparación con una matriz de pixeles de 3x3 que lo rodea. Mientras mayor sea el valor del gradiente mayor es su nivel de foco.

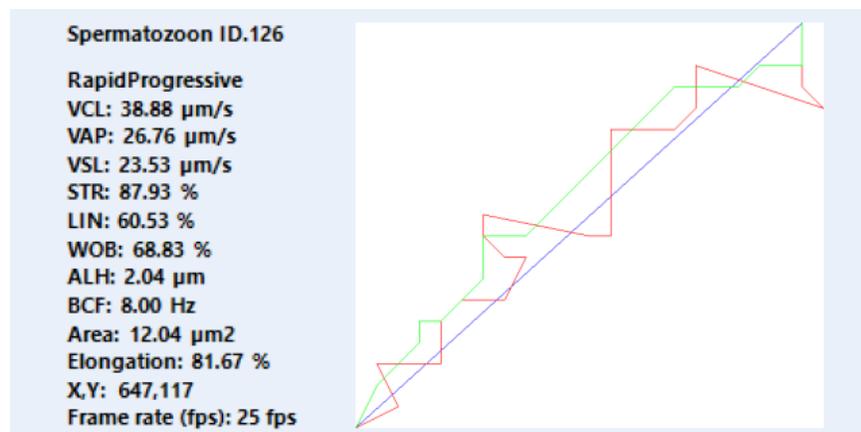


13.2. Análisis espermático asistido por computadora (CASA)

Se empleó el sistema *Sperm Class Analyzer* para medir la movilidad de los espermatozoides y evaluar el efecto de los tratamientos. Este sistema calcula los parámetros cinéticos de los espermatozoides de manera automática. Para ello, se realiza la captura de 25 imágenes de contraste de fases utilizando una magnificación de 10X a una frecuencia de 50 Hz (lo que toma 30 s). El *software* detecta la cabeza de la célula sobre la cual va calculando su trayectoria a lo largo de cada una de las 25 imágenes. En la imagen siguiente se observa un ejemplo de como el sistema detecta las células y un ejemplo de una de las trayectorias (en rojo), o de espermatozoides inmóviles (amarillo).



A partir de cada trayectoria se calculan los parámetros cinéticos de cada célula, como se observa en la siguiente figura



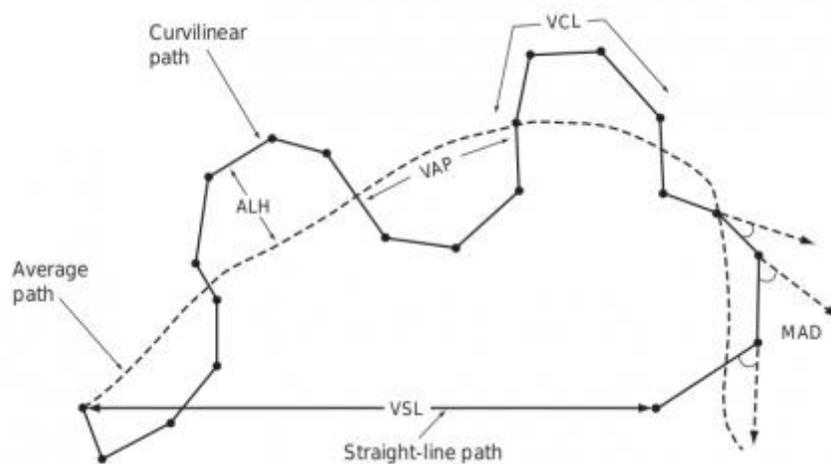
Para determinar si un espermatozoide se encontraba hiperactivado, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

Velocidad Curvilínea (VCL): indica la velocidad del espermatozoide en $\mu\text{m/s}$ considerando su trayectoria completa (línea roja en la imagen anterior)

Linealidad (LIN): Porcentaje de linealidad en la trayectoria del espermatozoide, se calcula dividiendo el valor de la velocidad lineal (línea azul en la imagen anterior) sobre el valor de la velocidad curvilínea (VSL/VCL). A mayor el porcentaje de LIN mas recto es el nado del espermatozoide.

Amplitud Lateral de la Cabeza (ALH): Medida de la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ($\mu\text{m/s}$).

En la figura siguiente se ilustran de mejor manera los parámetros antes mencionados.



Se consideró como un espermatozoide hiperactivado cuando cumplían con los siguientes valores: $VCL > 150 \mu\text{m/s}$, $LIN < 50\%$ y $ALH > 3.5 \mu\text{m/s}$ de acuerdo a Mortimer, 2000.