



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Dinámica del pH acrosomal en la
inducción de la reacción acrosomal en
espermatozoides de humano

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GABRIELA ÁLVAREZ GARCÍA

Directora de Tesis:

DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ

Ciudad Universitaria, CD. MX.
2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Álvarez
García
Gabriela
55-65-15-06-85
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308012646

2. Datos del Asesor.

Dra.
Claudia Lydia
Treviño
Santa Cruz

3. Datos del sinodal 1

Dra.
María de Lourdes
Segura
Valdez

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Olga Margarita
Echeverría
Martínez

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Claudia
Sánchez
Cárdenas

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Jorge Antonio
García
Álvarez

7. Datos de la tesis.

Dinámica del pH acrosomal en la inducción de la
reacción acrosomal en espermatozoides de humano
59 p.
2018

8. Palabras clave:

Espermatozoides, alcalinización, pH, acrosoma, reacción acrosomal.

Este trabajo se llevó a cabo en el Consorcio de la Fisiología del Espermatozoide (laboratorio 16) del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México) y fue dirigido por la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz.

Con el apoyo financiero de UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN203116 para Claudia Treviño).

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A mi tutora, la **Dra. Claudia L. Treviño Santa Cruz**, por la vocación que le caracteriza en el quehacer de la ciencia. Gracias por su tutela en el desarrollo de este proyecto y su apoyo incondicional.
- A los doctores que conforman el Consorcio de la Fisiología del Espermatozoide: **Alberto Darszon, Takuya Nishigaki, Carmen Beltrán, Julio Chávez e Ignacio López**, por compartir sus conocimientos y profesionalismo, por permitirme formar parte de un laboratorio de calidad que impulsa el desarrollo de la ciencia en México.
- A la asesoría técnica que me brindó la **M. en C. Paulina Torres Rodríguez**, por instruirme desde mis primeros minutos en el laboratorio. Gracias por hacer con amor y simpatía tu trabajo.
- A la asesoría y paciencia que me brindó la **Dra. Esperanza Mata Martínez** y el **Dr. Julio César Chávez Zamora**, quienes contribuyeron atentamente con sus conocimientos y sugerencias en el establecimiento del método experimental de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi querida UNAM, es una dicha haberme formado en la máxima casa de estudios... Gracias por alojarme y ser paciente en el camino de la titulación.

A mis padres, **Lucy y Jesús**, es difícil explicarle a quienes te dieron la vida... qué es la vida según la Biología, pero gracias por darme eso y por apoyarme en lo más significativo que he hecho en mi vida.

Mis pequeñas hermanitas: **Moni, Erika y Marce** (por orden de aparición) gracias por hacer su mayor esfuerzo en llevarnos bien y motivarnos. Gracias a **Dolly** por ser un perro fiel y desvelarse conmigo siempre.

Especialmente gracias a **Hugo Arzate y Moni Álvarez**, por confiar en mí y financiarme en los momentos más críticos, son personas con una calidad humana sublime, ojalá que en el mundo la gente como ustedes un día sea mayoría.

Es bello cuando hay alguien que confía en lo que puedes lograr, pese a lo desfavorable de las circunstancias, ese alguien para mí es la **Dra. Claudia Treviño**, una maravillosa mentora y guía no sólo en la tutela, de ella he aprendido tanto como ser humano. Aprecio la confianza que deposita en sus alumnos, cómo nos motiva e impulsa a superarnos profesional, social y personalmente; cuando sea grande (creo que ya) quiero ser como Claudia.

También gracias al **Dr. José Luis Puente** y al **Dr. Takuya Nishigaki**, quienes me abrieron las puertas del IBT, brindándome una de las maravillosas oportunidades que un estudiante puede tener, todos ellos hacen de la ciencia una labor ilustre.

Gracias a mi pequeña familia del IBT: A mis buenos compañeros Joseph Oviedo y Arturo Matamoros, así como a Pau Torres, Karlita Andrade, Inti y Noé Arroyo, Fabio Herrera, Olga Bondarenko, Nachito López, Julio Chávez, Espe Mata, Yolo Sánchez, José Luis de la Vega, Sand Hernández, Gaby Carrasquel, Hiram Pacheco, Héctor Ramírez, Francisco Romero, Josué Ocelotl, Karen Ameyally, Fanny Ortiz, a los argentinos (Cint Stival y Nico Brukman) y a un español tan espléndido y afable, Alberto Vicens. Mis recuerdos más bonitos de Cuernavaca con cada uno de ustedes.

A mi querido Jorge Eduardo Hernández, me hace feliz compartir esto contigo (*-Yo no me sé expresar. A lo mejor otras podrían explicarlo mejor pero yo siempre he sido igual, es mucho más fácil hablar de las cosas tristes que de las alegres.*) Nadie es más oportuno que Cortázar.

Con dedicatoria especial a mis compañeros en la vida y en la carrera: Fernando Vázquez, Eduardo Álvarez, Lore Kever, Army López, Sofi Montes, Caro Rocha, Tetsuya Nakamura, José de Jesús González, Sele Pérez, Héctor Salazar, Toño Santes y Eder Iniestra.

Siempre que recuerde este logro tendré presente el valor de formarse y educarse, haciendo frente a las vicisitudes que enfrenta este país. Mantengo la expectativa de un mejor por venir para México, fui afortunada al coincidir con profesores extraordinarios a quienes concedo este pequeño triunfo y me comprometo a continuar su legado. Y a mi querido país: habremos de resaltar la necesidad de educar a tus ciudadanos y forjar mejores condiciones de educación, de trabajo, de vida... de mejores seres humanos.

I. Índice

I. Índice.....	5
II. Índice de figuras.....	7
III. Abreviaturas	8
IV. Resumen	9
1. Introducción	10
1.1 Fecundación en mamíferos.....	10
1.2 El espermatozoide	11
1.2.1 El Acrosoma	13
1.3 Requerimientos para la fecundación	13
1.3.1 Activación de la movilidad.....	14
1.3.2 La Capacitación	14
1.3.3 La Reacción Acrosomal.....	15
1.4 La progesterona y la RA	18
1.5 Cambios de pHi en el espermatozoide durante la capacitación.....	20
2. Antecedentes.....	22
3. Hipótesis.....	24
4. Objetivos	24
4.1 General.....	24
4.2 Particulares	24
5. Materiales y métodos.....	24
5.1 Medios de cultivo	24
5.2 Obtención de la muestra biológica.....	24
5.3 Procesamiento de la muestra.....	25
5.4 Registro de pH y reacción acrosomal en espermatozoides individuales de humano.....	26
5.5 Adiciones e inducción de la RA	27
5.6 Registro de pHacr y RA en células individuales	27
5.7 Análisis de datos.....	27
6. Resultados	28
6.1 Registros de pHacr en diferentes estímulos.....	28
6.1.1 El pHacr en ausencia de la RA (<i>Espermatozoides intactos</i>).....	29
6.1.2 El pHacr durante la RA (<i>Espermatozoides reaccionados</i>).....	31
6.1.2.1 RA en respuesta a diferentes estímulos	32
6.1.2.2 Inducción de la RA con ionomicina	34
6.1.2.3 Inducción de la RA con progesterona	36

6.1.2.4 Inducción de la alcalinización intracelular con NH_4Cl	39
6.1.2.5 RA espontánea	41
7. Discusión	42
7.1 <i>LS Green reporta cambios en el pHacr de espermatozoides de humano</i>	42
7.2 <i>Ionicina eleva el pHacr: los acrosomas más alcalinos experimentan la RA</i>	43
7.3 <i>El aumento del pHacr, promovido por progesterona, no es indispensable para desencadenar la RA</i>	44
7.4 <i>La alcalinización acrosomal promovida con NH_4Cl por sí misma no desencadena la RA</i>	46
7.5 <i>En la RA espontánea no se detectaron cambios de pHacr</i>	47
8. Conclusiones	48
9. Perspectivas	49
10. Literatura citada	50
V. Apéndice	57
1. Detección de la RA mediante FM 4-64 y monitoreo del pHacr mediante LS Green.....	57
2. Registros de pHacr y RA en espermatozoides individuales de humano.....	58
3. Determinación del pHacr durante la inducción de la RA.....	59

II. Índice de figuras

Figura 1 Recorrido de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino.....	11
Figura 2 Esquema del espermatozoide humano.....	12
Figura 3 La movilidad hiperactivada.	14
Figura 4 Progresión de la RA en mamíferos.....	16
Figura 5 Modelo general de la señalización que conduce a la RA en mamíferos.	17
Figura 6 Modelo de la vía endocannabinoides inducida por progesterona.....	19
Figura 7 Modelo de las principales entidades moleculares involucradas en la regulación del pH _i en espermatozoide de humano.	21
Figura 8 Swim-up, método de selección de espermatozoides con mayor movilidad.	25
Figura 9 Registros de LS Green ante distintos estímulos sin ocurrencia de RA. ...	31
Figura 10 Porcentaje de RA reportada por FM 4-64 en diferentes condiciones.....	33
Figura 11 Niveles de alcalinización en la inducción de la RA con ionomicina.	35
Figura 12 Proporción de RA con la adición de ionomicina y la subsecuente adición de NH ₄ Cl en el transcurso del tiempo.	36
Figura 13 Niveles de alcalinización en la inducción de la RA con progesterona. ...	38
Figura 14 Proporción de RA con la adición de progesterona y la subsecuente adición de NH ₄ Cl en el transcurso del tiempo.....	39
Figura 15 Niveles de alcalinización acrosomal por exposición a NH ₄ Cl.	41
Figura 16 Cinética del pH _{acr} durante la RA espontánea	42

III. Abreviaturas

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca²⁺	Ion calcio
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
CAs	Anhidrasas carbónicas (<i>Carbonic Anhydrases</i>)
Cl⁻	Ion cloro
C_v	Canales dependientes de voltaje
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada (<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)
Em	Potencial de membrana
HCO₃⁻	Bicarbonato
HTF	medio de <i>fluido tubal humano</i> (<i>Human Tubal Fluid</i>)
MAE	Membrana acrosomal externa
MAI	Membrana acrosomal interna
MP	Membrana plasmática
Na⁺	Ion sodio
NH₄Cl	Cloruro de amonio
pH_{acr}	pH acrosomal
pH_e	pH externo
pH_i	pH intracelular
PKA	Proteína cinasa A
PLCδ	Fosfolipasa C
RA	Reacción acrosomal
ROI	Región de interés (<i>Regions of interest</i>)
TMA	Trimetilamonio
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
ZP	Zona pelúcida

IV. Resumen

En la naturaleza, la regulación del pH intracelular (pHi) es fundamental para múltiples procesos biológicos ya que varios eventos celulares se rigen dentro de un rango restringido de pH. El espermatozoide no es la excepción, la dinámica del pH es importante a lo largo de la fecundación, desde el papel que desempeña en el fluido seminal (en el mantenimiento de la viabilidad y la calidad de los espermatozoides), hasta la adquisición de la maduración funcional para ser capaces de fecundar.

Si bien, es de nuestro conocimiento que en espermatozoides de mamíferos la capacitación se acompaña de un incremento en el pHi, no es del todo claro cómo esta alcalinización regula otros eventos involucrados en la preparación del espermatozoide para fecundar el óvulo, como la reacción acrosomal (RA). La RA es un evento medular para que ocurra la fecundación y dada la importancia fisiológica de este proceso resulta de sumo interés investigar los mecanismos que la regulan.

Por tal razón, en este trabajo examinamos los cambios del pH acrosomal (pHacr) que anteceden a la RA, mediante una estrategia basada en microscopía de epifluorescencia de un colorante sensible a pH y otro indicativo de la RA, monitoreados alternadamente. Establecimos una técnica que nos permitió estimar variaciones del pHacr, antes y durante la progresión de la RA, en tiempo real y a nivel de espermatozoides individuales de humano.

Aquí mostramos que la ionomicina, la progesterona y el NH_4Cl elevan el pHacr, con diferentes cinéticas de alcalinización. Nuestros resultados revelan que la alcalinización acrosomal es un paso necesario, pero no en todos los casos suficiente, para desencadenar la RA, en espermatozoides de humano.

Estas evidencias fortalecen la propuesta de que el aumento del pHacr participa significativamente en el desarrollo de la RA en espermatozoides de humano.

1. Introducción

1.1 Fecundación en mamíferos

Una característica común que define a las formas de vida es la reproducción. Este proceso biológico permite la continuidad de las especies y favorece la diversidad genética en organismos de reproducción sexual. Lo anterior es posible mediante la fecundación.

La fecundación en mamíferos es un proceso altamente regulado que implica el encuentro de los gametos haploides, el espermatozoide y el óvulo, que al fusionarse formarán un cigoto, una célula diploide de la que podrá desarrollarse un nuevo organismo con carga génica única ^[1, 2].

Durante la inseminación, millones de espermatozoides se liberan dentro de la vagina, pero no todos sobreviven, pues deben contender con las nuevas condiciones del microambiente femenino como el sistema inmunológico, su pH ácido, entre otros. Aquellos que sobreviven, nadan progresivamente a través del moco cervical, atraviesan el útero y se dirigen hacia las trompas de Falopio ^[3], asistidos también por las contracciones uterinas ^[4].

Posteriormente, en la región del istmo del oviducto se produce un reservorio transitorio de espermatozoides en el que se adhieren a las células epiteliales, manteniéndose quiescentes en estado de preparación esperando la ovulación ^[5] (Fig. 1).

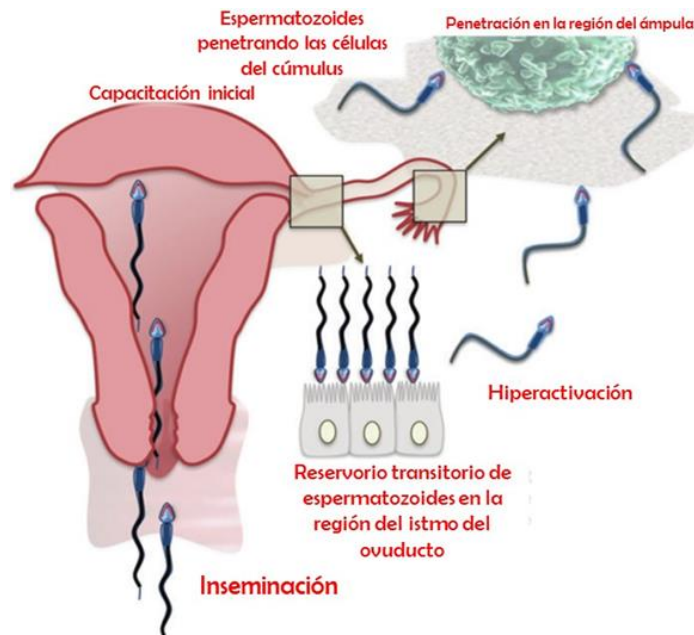


Figura 1 | Recorrido de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino.

Tras ser depositados en la vagina, los espermatozoides deben atravesar el canal cervical para dirigirse al útero y hacia las trompas de Falopio. Aquellos espermatozoides que logran llegar a la región del istmo del oviducto se mantienen en un reservorio temporal y permanecen quiescentes hasta recibir una señal asociada a la ovulación. Posteriormente, se despegan del epitelio oviductal y migran mediante un nado hiperactivado hacia el ampulla, donde penetrarán la masa del cúmulo y finalmente, sólo un espermatozoide podrá fecundar al ovocito (Tomado de 6).

El recorrido de los espermatozoides para lograr la comunicación con el ovocito representa una labor ardua y responde a la alta especialización de este tipo celular, que se describe a continuación.

1.2 El espermatozoide

El espermatozoide es el gameto masculino, una asombrosa célula con una sofisticada organización estructural y alta especialización funcional. Estas células son el resultado final de la espermatogénesis que se desarrolla en los túbulos seminíferos.

El espermatozoide está compuesto por dos piezas principales que son la cabeza y el flagelo, unidos a su vez por la pieza de conexión. La cabeza contiene

el núcleo, el acrosoma, estructuras del citoesqueleto y una pequeña cantidad de citoplasma.

El flagelo se subdivide en tres piezas: media, principal y final. La pieza media contiene la vaina mitocondrial, organizada en forma de hélice alrededor de las fibras densas externas y el axonema. El axonema comprende nueve pares de microtúbulos que rodean un par central (estructura 9+2), es la maquinaria que suministra la fuerza de movilidad flagelar y se extienden desde la pieza de conexión hasta la pieza principal. La pieza final contiene dobletes axonemales, los extremos de las fibras densas externas y la vaina fibrosa [7, 8] (Fig. 2).

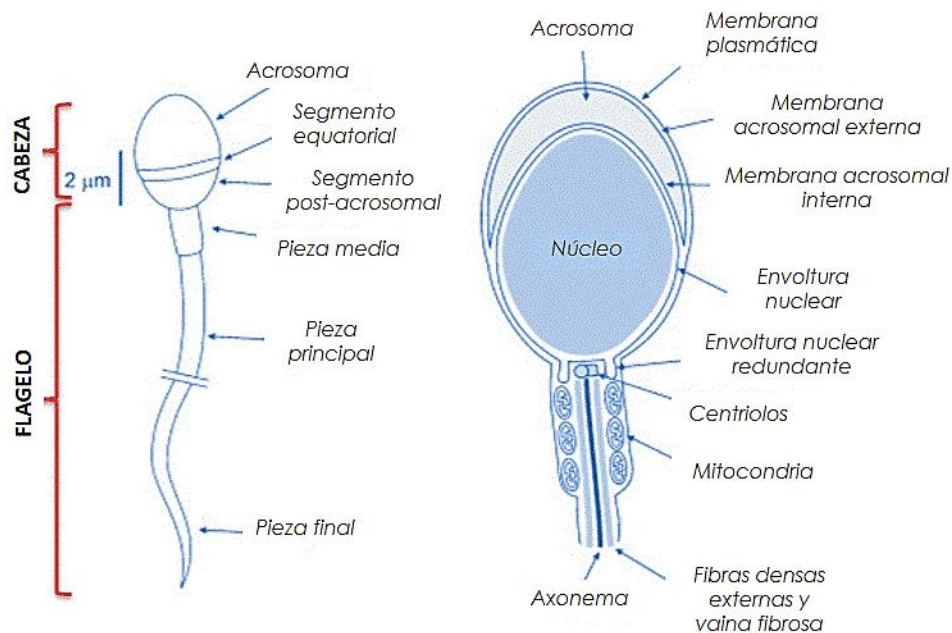


Figura 2 | Esquema del espermatozoide humano.

A) Estructuras principales que conforman la cabeza (~5x3 μm) y el flagelo (~55 μm). **B)** Acercamiento de la cabeza y pieza media con sus componentes: En la región apical de la cabeza, recubriendo al núcleo, se localiza el acrosoma delimitado por una membrana acrosomal interna (MAI) y externa (MAE) (Tomado de 9).

El movimiento flagelar se genera gracias a la actividad de una dineína-ATPasa, quien a su vez se modula por pH, ATP, ADP, Ca^{2+} y por el estado de fosforilación de las proteínas del axonema [10].

Los espermatozoides presentan una amplia diversidad de formas a lo largo de las especies y, en comparación con el gameto femenino, han mostrado una variación morfológica mayor, sugiriendo que la historia evolutiva de esta célula ha repercutido en su compacta y compartimentalizada organización celular ^[11]. Una función clave del espermatozoide ocurre en el compartimento de la cabeza: la exocitosis del acrosoma.

1.2.1 El Acrosoma

El gameto masculino y femenino contienen vesículas o gránulos secretorios originados a partir del aparato de Golgi. En el espermatozoide este organelo se conoce como acrosoma y se desarrolla durante la espermiogénesis, un proceso también conocido como biogénesis acrosomal, en el que se acumulan muchas moléculas necesarias para la fecundación ^[10, 12, 13].

El acrosoma de euterios (mamíferos placentarios) es una estructura con forma de saco delimitado por una membrana interna y externa (**Fig. 2B**), se sitúa en la mitad anterior de la cabeza y consta básicamente de dos partes: el segmento anterior y el segmento ecuatorial, éste último es el sitio de fusión con el óvulo ^[7].

El contenido acrosomal es heterogéneo pues alberga enzimas proteolíticas (como acrosina, tripsina, hialuronidasa y proteasas) ^[1], proteínas de unión a la zona pelúcida (ZP), proteínas estructurales (matriz acrosomal) y cristaloides (aún por ser caracterizados químicamente) ^[12, 14].

El acrosoma participa en la interacción inicial de los gametos, durante la fecundación. El proceso que permite la liberación del contenido acrosomal se denomina reacción acrosomal (RA) y es un prerequisite para que el espermatozoide sea capaz de fecundar, que abordaremos a continuación.

1.3 Requerimientos para la fecundación

En mamíferos, tras la eyaculación, los espermatozoides se depositan en el tracto genital femenino en un estado funcionalmente restringido ^[15] por lo que deben experimentar una serie de cambios fisiológicos que los proveen de

maduración funcional, sólo los espermatozoides que cubran estos requerimientos pueden ser candidatos para fecundar al ovocito.

1.3.1 Activación de la movilidad

Para alcanzar el sitio de fecundación, el espermatozoide requiere una fina regulación de su nado, que exhibe dos formas principales: la movilidad activada, en la que el nado es progresivo y con un patrón simétrico del eje flagelar, y la movilidad hiperactivada, caracterizada por un batido vigoroso donde el eje flagelar es asimétrico y con mayor amplitud de la curvatura flagelar (Fig. 3) [9].



Figura 3 | La movilidad hiperactivada.

Forma del eje flagelar de un nado activado (izquierda) e hiperactivado (derecha), en un fluido no viscoso (Tomado de 10).

Recién son depositados en la hembra, los espermatozoides inician su movilidad con un nado activado. El desarrollo de la movilidad hiperactivada favorece que el espermatozoide pueda penetrar las células del *cumulus oophorus* y la zona pelúcida del ovocito, para que finalmente pueda fusionarse con la membrana plasmática del ovocito [4].

Asimismo, una serie de cambios a nivel molecular serán determinantes para que suceda la fecundación, procesos colectivamente llamados capacitación.

1.3.2 La Capacitación

En 1951, los investigadores Austin y Chang, demostraron independientemente que los espermatozoides deben permanecer un periodo de tiempo en el tracto genital femenino, para conseguir fecundar al ovocito, proceso que hoy conocemos como capacitación [15, 16].

La capacitación ocurre sólo en espermatozoides de mamíferos y consiste en la adquisición del potencial necesario para fecundar, mediante una serie de cambios fisiológicos. Este proceso inicia al atravesar la cavidad del útero, donde

la superficie del espermatozoide pierde factores decapacitantes que adquirió durante la maduración en el epidídimo y del contenido del plasma seminal.

Las modificaciones a nivel molecular en el espermatozoide comprenden:

- La pérdida del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide, favoreciendo su fluidez ^[17].
- Aumento en las concentraciones iónicas intracelulares: Ca^{2+} , HCO_3^- , Cl^- y Na^+ ^[10].
- Hiperpolarización de la membrana plasmática: el potencial de membrana (E_m) se torna más negativo ^[18].
- Aumenta la actividad de la proteína cinasa A (PKA): PKA fosforila varias proteínas en residuos de serinas y treoninas, la vía de señalización culmina en el aumento de la fosforilación en residuos de tirosinas ^[19].
- Incremento del pHi ^[10].

En el laboratorio se puede promover la capacitación de espermatozoides de humano, incubándolos en un medio definido suplementado con Ca^{2+} , HCO_3^- y albúmina sérica bovina (BSA) ^[20]. Los espermatozoides capacitados cumplen con los prerequisites fisiológicos para experimentar el proceso previo a la interacción con el ovocito: la reacción acrosomal.

1.3.3 La Reacción Acrosomal

La RA es un proceso crítico que los espermatozoides deben llevar a cabo para lograr la fecundación ^[10]. Consiste en la fusión y vesiculación progresiva entre la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática (MP) del espermatozoide, lo que resulta en la exocitosis del contenido acrosomal y la exposición de la membrana interna acrosomal (MAI) ^[20, 21].

Durante la exocitosis, la fusión de las membranas provoca un cambio drástico de la topología inicial de la región apical del espermatozoide (**Fig. 4**). En humanos, el acrosoma aumenta su volumen durante la capacitación y este hinchamiento es un requerimiento para generar la fusión entre la MP y la MAE ^[22].

La cinética de liberación del contenido acrosomal ocurre en una escala temporal de segundos cuando se estimula con ionóforo de Ca^{2+} o con progesterona [23] y generalmente puede iniciar proximalmente y progresar anteriormente, dando como resultado el desprendimiento de la membrana híbrida [12].

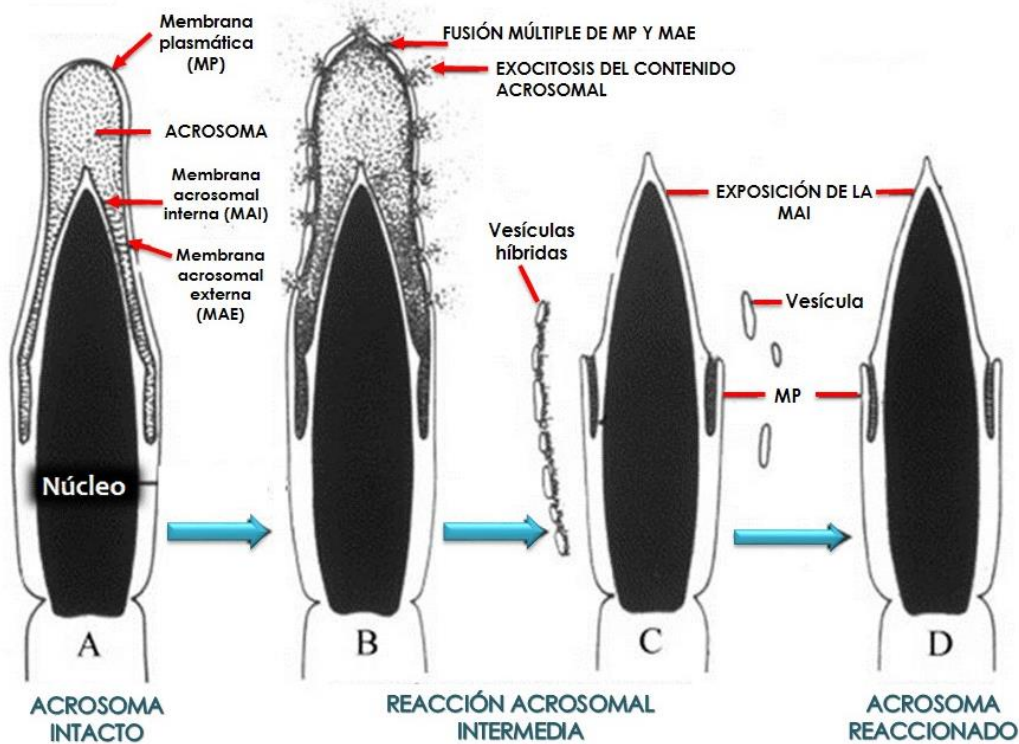


Figura 4 | Progresión de la RA en mamíferos.

A) Acrosoma intacto. La vesícula acrosomal está rodeada por una MAI y una MAE. **B) Inicio de la RA.** La MAE se fusiona con la MP, los múltiples sitios de contacto se favorecen por el hinchamiento acrosomal, generando aperturas que permiten la liberación del contenido acrosomal. **C) Se desprenden vesículas híbridas,** formadas por la MAE y la MP, como resultado de la fusión. **D) Finalmente,** el acrosoma reaccionado resulta en la exposición de la MAI. (Tomado de 24).

MP membrana plasmática; MAI membrana acrosomal interna; MAE membrana acrosomal externa.

Al tratarse de un proceso exocitótico, la RA comparte muchas características con otros tipos de secreción celular, aunque cabe mencionar que la exocitosis acrosomal posee propiedades únicas que se limitan al gameto masculino, principalmente porque es un evento irreversible [25]. Este proceso requiere de la intervención de una maquinaria proteica para la regulación de la secreción, que

comprende proteínas SNAREs, RAB3A, complexinas y sinaptotagmina, entre otros factores [26].

Se cree que el contenido acrosomal ayuda a que el espermatozoide penetre el revestimiento del ovocito [24], particularmente la matriz de la zona pelúcida (ZP) [27]. La ZP es una matriz glicoproteica que rodea al ovocito de mamíferos y en humanos está compuesta por cuatro glicoproteínas (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4). Durante muchos años, se ha considerado que la ZP3 es el principal inductor de la RA [28] siguiendo el modelo que se describe a continuación (Fig. 5):

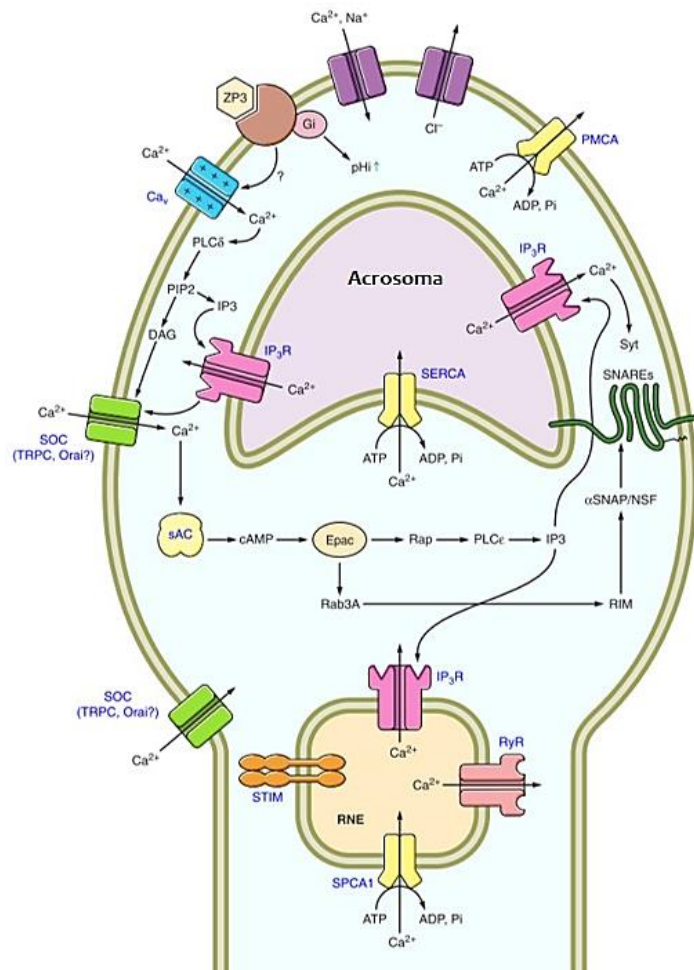


Figura 5 | Modelo general de la señalización que conduce a la RA en mamíferos.

ZP3 se une a un receptor en la MP y activa la proteína Gi que podría estar involucrada en la alcalinización intracelular. La unión de ZP3 provoca un incremento de $[Ca^{2+}]_i$, mediante un mecanismo desconocido que podría activar canales dependientes de voltaje (C_v) y conducir a una depolarización de la membrana. Este incremento inicial y transitorio de Ca^{2+} desencadena la activación de una PLC δ que produce IP $_3$ y DAG

a partir de PIP_2 . IP_3 se une a sus receptores ubicados en los almacenes de Ca^{2+} del espermatozoide: el acrosoma y la RNE (envoltura nuclear redundante) y activa canales operados por pozas internas: SOCs (TRPC y / o ORAI), posiblemente por agregación de STIM. DAG y PIP_2 podrían estimular canales TRCP, desencadenando el aumento sostenido de Ca^{2+} , que activa la sAC y provoca el incremento de AMPc, que a su vez activa EPAC. EPAC interviene en dos señalizaciones: 1) La activación de Rab3, a través de la estimulación de RIM y α SNAP/NSF, induciendo el anclaje de la MAE y la MP mediante la maquinaria de las proteínas SNARE. 2) La activación de Rap, que estimula PLC ϵ para generar IP_3 y finalmente liberar Ca^{2+} desde el acrosoma, promoviendo la fusión de las membranas. Los niveles de Ca^{2+} son controlados mediante bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP (PMCA) y pozas de Ca^{2+} (SPCAI and SERCA) (Tomado de 10).

No obstante, evidencia reciente observada en ratón, indica que la mayoría de los espermatozoides con potencial fecundativo experimentan la RA antes de unirse a la ZP [27], por lo que el modelo clásico de la RA se debe reevaluar y actualmente se mantiene en controversia, pues aún es incierto dónde y cuándo se desencadena la RA [24].

Además de los inductores fisiológicos se conocen otras moléculas que pueden estimular la RA, incluidos ionóforos de Ca^{2+} . La RA es el último de los requerimientos morfo-fisiológicos para que el espermatozoide sea capaz de conseguir el contacto con la membrana del ovocito. Por su parte, el ovocito emite señales que favorecen la comunicación de los gametos, como se describe en seguida.

1.4 La progesterona y la RA

Antes de la fecundación el espermatozoide inicia la excitosis acrosomal en respuesta a señales derivadas del ovocito [20]. La progesterona es una hormona esteroidea producida por las células del *cumulus* a concentraciones dentro del rango micromolar y se ha identificado como el mayor componente activo del fluido folicular humano [10, 32]. En espermatozoides de humano, la progesterona se ha propuesto como el más probable inductor fisiológico de la RA [30, 31].

La identidad de los receptores involucrados en la RA inducida por progesterona no es del todo comprendida, algunos receptores no genómicos se han reportado en la membrana de espermatozoides de mamífero, como es el caso de CatSper. CatSper es el canal de Ca^{2+} específico del flagelo de espermatozoide y es el principal modulador del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, su función es regulada por el pH_i . Además, es esencial en la fecundación puesto que la eliminación de cualquiera de las subunidades formadoras del poro provoca infertilidad en mamíferos [10, 29].

Como se mencionó anteriormente, el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es necesario para que ocurra la RA. En espermatozoides de humano, se ha demostrado que la progesterona induce una entrada de Ca^{2+} mediada por CatSper y recientemente se ha propuesto que la progesterona actúa mediante una vía inusual de señalización de endocannabinoides como se describe en la Fig. 6 [10, 33].

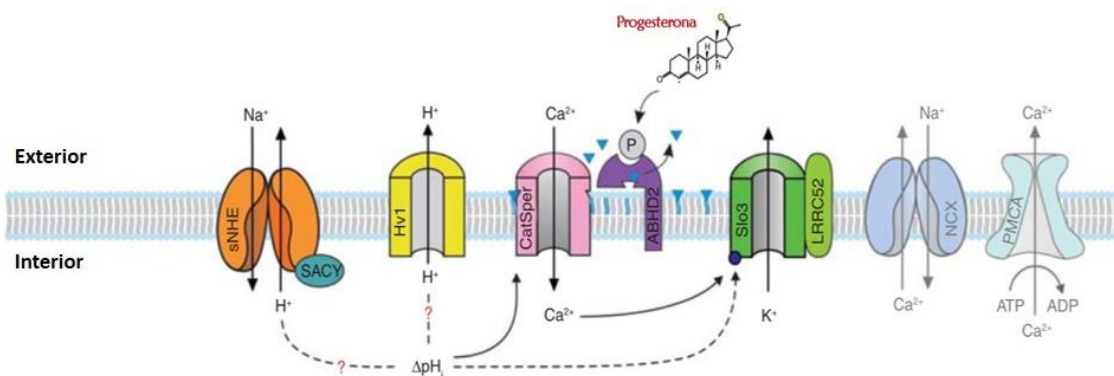


Figura 6 | Modelo de la vía endocannabinoide inducida por progesterona.

Cuando la progesterona se une al receptor ABHD2, en la membrana externa del espermatozoide, ABHD2 manifiesta actividad hidrolasa lipídica y degrada al endocannabinoide 2-AG, un inhibidor endógeno de CatSper, generando ácido araquidónico y glicerol. Esto permite el influjo de iones Ca^{2+} a través de CatSper, que es modulado por cambios de pH_i y potencial de membrana. El potencial de membrana es controlado por el canal de K^+ Slo3, dependiente de Ca^{2+} y en menor medida por cambios en el pH_i . Los canales sNHE y Hv1 son los candidatos propuestos para el control del pH_i . Se sugiere que la recuperación de la respuesta a Ca^{2+} es regulada por NCX y PMCA, aunque su identidad molecular no se ha confirmado (Tomado y modificado de 34).

Además de la estimulación de la RA se ha atribuido importancia fisiológica a la progesterona en la capacitación, la quimiotaxis y la hiperactivación [32, 35].

La importancia del medio intracelular alcalino, de acuerdo con este modelo, resultaría crítica para la acción extragenómica de la progesterona en los espermatozoides de humano.

1.5 Cambios de pHi en el espermatozoide durante la capacitación

Los espermatozoides de mamífero están expuestos a condiciones de pH externo (pHe) variables durante su trayectoria desde el tracto reproductor masculino hasta el femenino. En el macho, el fluido del epidídimo posee un pH ácido y se regula por el epitelio epididimal mediante el incremento de la secreción protónica y la absorción de HCO_3^- [36]. Los transportadores trans-epiteliales, incluyen la bomba de protones H^+ -ATPasa, antiportadores H^+/Na^+ , co-transportadores $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, y varias anhidrasas carbónicas que en conjunto mantienen la acidez del lumen epididimal y propician el estado quiescente de los espermatozoides [37].

En la hembra, el pHe del fluido luminal varía a lo largo del tracto reproductor femenino. La vagina posee un pH luminal bajo (~5), que se mantiene ácido debido a la producción de ácido láctico por *Lactobacillus* [38]. Cuando ocurre el coito, los espermatozoides se mezclan con el plasma seminal que mantiene un pHe alcalino (7.2-8.4) y altas concentraciones de HCO_3^- , así como los fluidos secretados por el epitelio genital femenino. En este nuevo microambiente, con un pHe alcalino y altas concentraciones de iones Na^+ , Cl^- y HCO_3^- , los espermatozoides mantienen una ventaja contra la acidez vaginal [39, 40].

A medida que los espermatozoides viajan a través del tracto genital femenino, el pH luminal incrementa significativamente hasta valores cercanos a 8, debido a las altas concentraciones de HCO_3^- [4, 3], en tanto que, el pHi aumenta gradualmente también. Se ha demostrado que, durante la capacitación, el pHi aumenta en espermatozoides de humano [41] aunque los mecanismos moleculares que lo controlan no son del todo claros.

Las moléculas encargadas del control del pHi se pueden clasificar en dos grupos principales: transportadores membranales de H⁺ y transportadores de HCO₃⁻. El primer grupo está constituido por intercambiadores Na⁺/H⁺ de la familia SLC9 y canales de H⁺. En humano, el canal de protones Hv1 dependiente de voltaje, probablemente constituye el principal mecanismo de eflujo de protones [42], contribuyendo al aumento del pHi. El segundo grupo involucra co-transportadores de Na⁺/HCO₃⁻ (NBC), intercambiadores Cl⁻/HCO₃⁻ (SLC26) y el canal CFTR [43].

En conjunto, la participación de estas entidades moleculares proveería de la homeostasis necesaria para la regulación del pHi, como se sugiere en la Fig. 7:

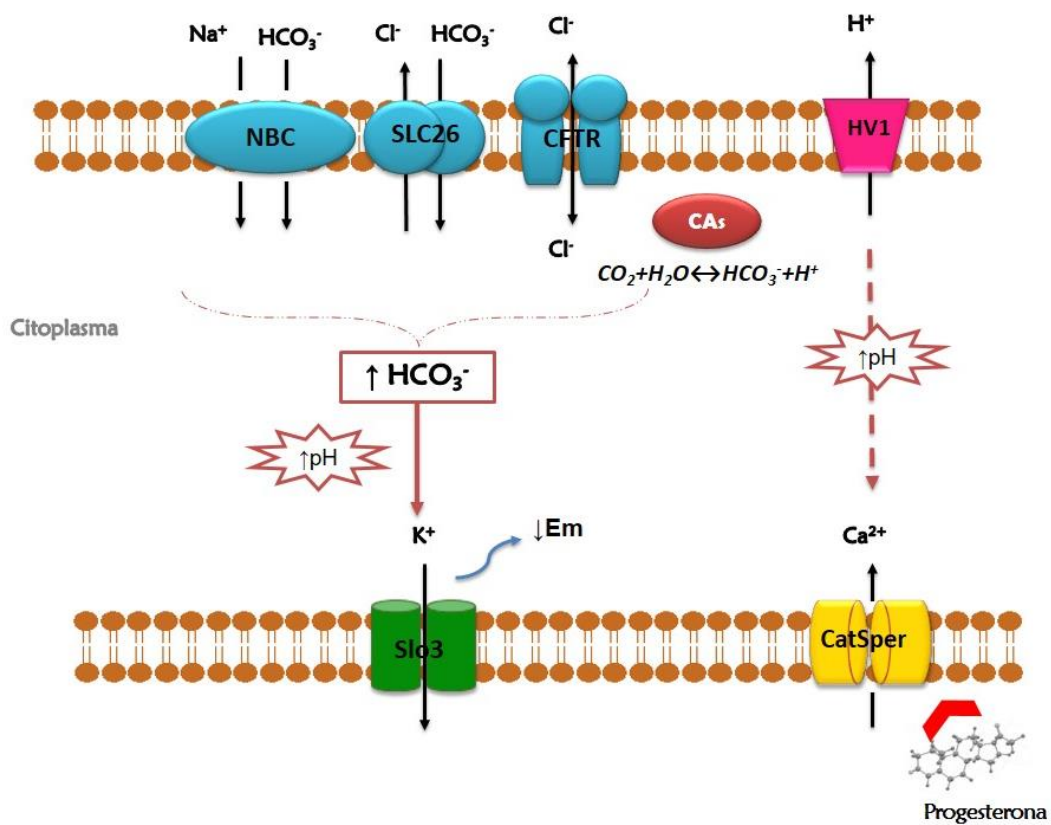


Figura 7 | Modelo de las principales entidades moleculares involucradas en la regulación del pHi en espermatozoide de humano.

El metabolismo del HCO₃⁻ puede ser regulado por transportadores NBC, SLC26 y CFTR que producirían un aumento del pHi. Las anhidrasas carbónicas (CAs) podrían participar en la regulación del pHi mediante la catálisis reversible de la reacción (CO₂+H₂O↔HCO₃⁻+H⁺), donde el aumento del HCO₃⁻ promovería la alcalinización intracelular. El incremento del pHi activaría al canal Slo3, produciendo la

hiperpolarización de la membrana. Por otro lado, la salida de H^+ , a cargo del canal Hvi, podría inducir una alcalinización intraflagelar y activar el canal de Ca^{2+} , CatSper. CatSper, a su vez, es activado por progesterona y promueve el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (Basado en **43, 44**).

Aunque falta mucho por saber sobre la secuencia temporal en la que ocurren los procesos vinculados al aumento del pH_i , la homeostasis del pH_i es esencial en la regulación de muchas proteínas que son pH -dependientes, por lo que resulta de gran interés estudiar la posible regulación diferencial del pH en el espermatozoide y su papel fisiológico durante la fecundación.

2. Antecedentes

La regulación de muchas funciones del espermatozoide está asociada a cambios en el pH , tanto externo como interno. Como se mencionó anteriormente, la alcalinización intracelular del espermatozoide se asocia con tres eventos determinantes de la fecundación: el inicio y modulación de la movilidad flagelar, el inicio y desarrollo de la capacitación y la activación de la maquinaria exocitótica de la RA ^[20].

En un enfoque subcelular, el acrosoma experimenta cambios en el pH durante la capacitación, por lo que la regulación de ciertas funciones del espermatozoide podría no estar limitada al citosol ^[45].

El pH_{acr} de un espermatozoide no capacitado es ácido (≤ 5.5) ^[45, 46] y está controlado principalmente por una bomba de protones dependiente de ATP (V-ATPasa) ^[47, 48] que mantiene la acidez del acrosoma y podría repercutir en la alcalinización citoplasmática. Los organelos ácidos requieren canales iónicos y transportadores para regular sus funciones, como la homeostasis luminal iónica y osmótica. Tal es el caso de ciertas proteasas lisosomales que son pH -dependientes o el transporte de H^+ que depende del potencial de membrana ^[49].

Son pocos los trabajos en la literatura que abordan el papel del pH del compartimento acrosomal en la estimulación de la RA. Desde hace cuatro décadas, se ha considerado que el aumento en el pH acrosomal ocurre durante la capacitación y que su participación es importante para el estímulo la RA ^[46].

Se ha comprobado que la matriz acrosomal es estable a un pH ácido, pero se desestabiliza a pH's neutros. La alcalinización acrosomal provoca la degradación de las proteínas acrosomales, por desestabilización de la estructura amiloide de la matriz proteica y a través de la proteólisis de ciertas proteasas. Además, se sugiere que la degradación de las proteínas acrosomales podría promover el hinchamiento acrosomal, que es considerado un paso crucial y limitante para que suceda la RA [23, 50].

Dentro de los primeros trabajos sobre el pHacr de mamíferos, Working & Meizel (1983) reportaron un incremento significativo de la RA en presencia de compuestos que aumentan el pHacr de espermatozoides de hámster, durante la capacitación [48].

Más tarde, Nakanishi y colaboradores (2001) generaron un ratón transgénico que expresaba la proteína EGFP al interior del acrosoma. La proteína emite fluorescencia dependiente de pH, lo que les permitió registrar el incremento gradual del pH intra-acrosomal de 5.3 ± 0.1 a 6.2 ± 0.3 después de dos horas de capacitación. Interesantemente, observaron que la alcalinización acrosomal correlacionó con la ocurrencia de RA espontánea (RA sin inductores externos), demostrando que el aumento del pHacr ocurre fisiológicamente durante la capacitación [45].

En un trabajo muy reciente de nuestro laboratorio, Chávez y colaboradores investigaron la relación entre la alcalinización acrosomal, la liberación de Ca^{2+} y la RA en espermatozoides de mamífero. Observaron que la acumulación de ciertas bases débiles (inhibidoras de CatSper) al interior del acrosoma, provocan el incremento del pHacr, desencadenando la liberación de Ca^{2+} desde el acrosoma e induciendo la RA en espermatozoides de ratón y humano. Este trabajo es el primer reporte que demuestra la relevancia de la alcalinización del pHacr en la inducción de la RA en la especie humana [51].

La evidencia demuestra que el papel del pHacr es relevante en la preparación de la RA, aunque aún se desconoce mucho sobre el control de este proceso que es necesario para la fecundación.

3. Hipótesis

El pH del acrosoma se alcaliniza antes de que ocurra la reacción acrosomal en espermatozoides de humano.

4. Objetivos

4.1 General

Determinar cuál es la dinámica del pH acrosomal antes de que se induzca la reacción acrosomal en espermatozoides de humano.

4.2 Particulares

- Establecer la estrategia experimental para medir pH_{Hacr} y RA simultáneamente en espermatozoides de humano.
- Determinar la temporalidad en la que ocurren los cambios de pH_{Hacr} durante la RA.
- Determinar la respuesta del pH_{Hacr} al inducir la RA con un ionóforo de calcio y con progesterona.

5. Materiales y métodos

5.1 Medios de cultivo

Se utilizó el medio HTF (*Human Tubal Fluid*) que contiene en mM: NaCl 90.7, KCl 4.7, Glucosa 2.78, CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 0.3, Na-Piruvato 3.4, Na-Lactato 60, HEPES 23.8.

Medio capacitante: medio HTF, suplementado con NaHCO₃ (24 mM) y albúmina sérica de bovino (BSA) 0.5% p/v.
Los medios se ajustaron a un pH de 7.4.

5.2 Obtención de la muestra biológica

Con base en los requerimientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization., 2010) ^[52] y bajo la autorización previa del Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, individuos humanos sanos donaron muestras de semen,

obtenidas mediante eyaculación y depositadas en un contenedor estéril. Se usaron 5 donadores distintos.

5.3 Procesamiento de la muestra

A continuación de la obtención del semen, las muestras se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂, durante 30-60 minutos, para permitir la licuefacción. Transcurrido este tiempo, se procesó el semen mediante la técnica "swim-up" o nado hacia arriba, basado en el reporte de Mata-Martínez *et al.*, 2013 ^[53], que consiste en seleccionar los espermatozoides de humano con mejor movilidad. El procedimiento se realizó con algunas modificaciones, como se describe en la Fig. 8.

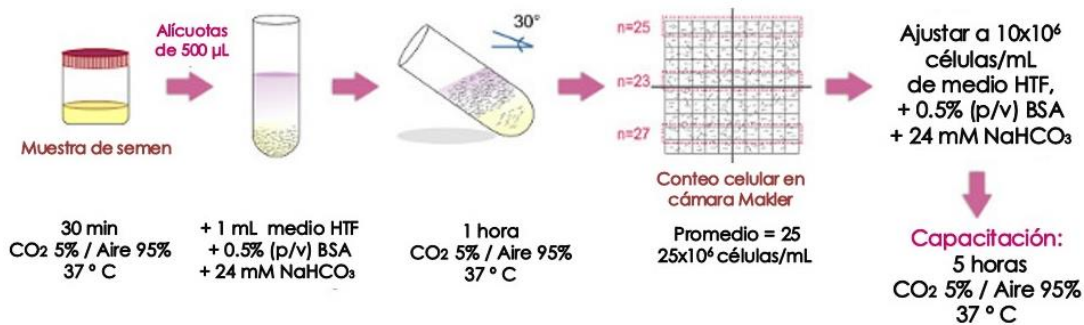


Figura 8 | Swim-up, método de selección de espermatozoides con mayor movilidad.

En el *swim-up* se distribuye la muestra seminal en tubos de ensayo colocando 500 µL en cada uno y 1 ml de medio HTF capacitante, evitando que las fases se combinen. Después, se inclinan los tubos cuidadosamente, a un ángulo aproximado de 30° y se introducen en la incubadora (37°C, 5% CO₂) durante 60 minutos. Al concluir el tiempo de incubación, se recuperan 800 µL de la fase superior y se realiza un conteo rápido de los espermatozoides en una cámara Makler (Self-Medical Instruments, Haifa, Israel). Finalmente, se ajusta la concentración espermática a ~10x10⁶ células/mL usando medio HTF capacitante. (Tomado y adaptado de 53).

Se promovió la capacitación de los espermatozoides en condiciones de incubación a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂, durante 5 horas más, resultando en un total de 6 horas de capacitación incluyendo la hora transcurrida durante el *swim-up*.

5.4 Registro de pH y reacción acrosomal en espermatozoides individuales de humano

Tinción con marcadores fluorescentes

Al concluir el tiempo de capacitación, se centrifugó la muestra a una velocidad de 300 g durante 3 minutos para remover el excedente de BSA. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de medio HTF.

Se añadió el colorante LysoSensor Green DND-189 (443/505 nm) (en adelante referido como LS Green) a la muestra de espermatozoides a una concentración de 500 nM, se incubaron durante 30 minutos previos a los experimentos. Durante los registros, LS Green se mantuvo en el medio extracelular a una concentración final de 500 nM.

Para monitorear la ocurrencia de la RA en tiempo real, se utilizó la estrategia experimental reportada por Sánchez-Cárdenas *et al.*,^[54] con el marcador FM 4-64 (515/640 nm), a una concentración final de 10 μ M en el medio extracelular. El colorante se añadió 1 minuto antes de iniciar los registros, permitiendo así la incorporación del colorante en la membrana del espermatozoide. Las muestras se protegieron de la luz en cuanto se agregaron las sondas fluorescentes.

Montaje e inmovilización parcial de espermatozoides

Para la obtención de las imágenes individuales de los espermatozoides, se recubrieron cubreobjetos circulares de 25 mm de diámetro con Poly-L-lysine 0.03% (w/v) para inmovilizar las cabezas de los espermatozoides y se montaron en cámaras de registro, manteniendo la temperatura a 37°C a lo largo de las películas.

Una vez montado el sistema, se agregaron 10 μ L de muestra espermática sobre el cubreobjetos y se realizó cuidadosamente un lavado para retirar las células que no se adhirieron. En seguida, se colocó un volumen final de 200 μ L de medio de registro (HTF no capacitante), conteniendo ambos colorantes en el medio extracelular así como en las adiciones, a fin de mantener un equilibrio entre el medio y las células reduciendo la pérdida de fluorescencia de estas.

5.5 Adiciones e inducción de la RA

La duración de las películas se estableció con base en el fotoblanqueamiento de los colorantes y el tiempo promedio de RA que se ha reportado en la literatura para los inductores utilizados en este trabajo. Todas las adiciones se incorporaron lentamente aproximadamente al minuto 1 ó 5 durante los registros, agregando un volumen de 50 μL y procurando no generar artefactos por efecto de adición.

Todas las soluciones se prepararon con FM 4-64 y LS Green a una concentración final de 10 μM y 500 nM, respectivamente. Como control de medio se usó HTF no capacitante. Como agente alcalinizador se utilizó NH_4Cl a una concentración final de 10 mM. Para inducir la RA se utilizó ionomicina y progesterona a una concentración final de 10 μM en ambos casos.

5.6 Registro de pHacr y RA en células individuales

Los registros se realizaron en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus iX71, a través de un objetivo de inmersión en aceite 60x/1.42 NA (PlanApo N). Se capturó una imagen por segundo registrando la señal fluorescente de cada colorante alternadamente, con excitación de 2 ms y una duración total de 7 minutos por registro (Basado en 55).

Las muestras cargadas con FM 4-64 y LS Green se excitaron con un LED Blue (3.15 A, Luminus Devices, Woburn, MA) con un filtro de excitación de paso de banda (HQ 480 / 40X) y un filtro de emisión (HQ 535/50M) (Chroma Technology, Bellows Falls, VT).

Las imágenes de fluorescencia se adquirieron mediante una cámara EMCCD iXon 3 (Andor Technology), utilizando un protocolo ejecutado por el software Andor iQ 2.9.1.

5.7 Análisis de datos

El análisis de las señales fluorescentes se realizó en el programa Image J, (National Institutes of Health, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). La señal de fluorescencia en célula única se obtuvo trazando una región de interés (ROI) desde la zona ecuatorial de la cabeza del espermatozoide hasta abarcar la región acrosomal,

seleccionando sólo los espermatozoides que mantuvieron movilidad durante los registros.

Normalización de los valores de fluorescencia

Se obtuvieron unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) en el curso del tiempo y se normalizaron a 1 con la ecuación (F/F_0) , donde F es cualquier valor de fluorescencia en el tiempo menos el fondo y F_0 es la fluorescencia basal obtenida durante los 10 segundos iniciales. El fondo se obtuvo trazando un ROI en una región de la película desprovista de células o señal del colorante. Todos los registros de fluorescencia se sometieron a esta normalización en función del tiempo, los datos numéricos se presentan como la media \pm S.E.M y las pruebas estadísticas se realizaron usando una ANOVA con una prueba de Tukey de comparación múltiple. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) y $p \leq 0.001$ (***).

El análisis estadístico y los gráficos se obtuvieron mediante el software GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA, USA), SigmaPlot 12 (Systat Software Inc. San Jose, CA), y Excel (Microsoft).

6. Resultados

6.1 Registros de pHacr en diferentes estímulos

Para seguir la dinámica del pHacr en espermatozoides de humano que experimentan la RA, establecimos una estrategia experimental basada en el monitoreo de dos colorantes capaces de reportar cambios del pH y ocurrencia de la RA, concomitantemente (ver **Apéndice 1**).

Por un lado, LS Green es una sonda acidotrópica que presenta una disminución de la fluorescencia en respuesta a la alcalinización y un aumento de la señal fluorescente durante la acidificación. Por otro lado, FM 4-64 es un colorante lipofílico que incrementa su fluorescencia a medida que ocurre la RA, posiblemente por la incorporación del colorante al interior de las fenestraciones que resultan de la fusión de membranas ^[54]. Esta estrategia experimental nos permitió obtener las intensidades de fluorescencia de los espermatozoides individualmente, para así monitorear la RA y los cambios del pHacr en tiempo real.

En seguida, examinamos el comportamiento del pHacr por cada grupo experimental de células ante diferentes estímulos:

A partir de los registros de fluorescencia normalizada de espermatozoides individuales (como los que se muestran en el **Apéndice 2**), se obtuvo el promedio de fluorescencia por condición experimental, representados por trazos que incluyen el S.E.M. Por lo tanto, cada trazo representa el promedio del cambio de fluorescencia normalizada, por condición (medio HTF, ionomicina, progesterona o NH₄Cl), incluyendo los errores estándar a lo largo del tiempo. Todos los trazos de las **Figs. 9, 11a, 13a y 15a** se obtuvieron de esta manera y corresponden a los espermatozoides intactos, mientras que los espermatozoides reaccionados se representan con puntos como se explica más adelante para el caso de la RA.

La respuesta de las células expuestas a diferentes estímulos, se dividieron en dos grupos principales para su análisis: las células que no experimentaron RA (espermatozoides intactos) y las que sí (espermatozoides reaccionados).

6.1.1 El pHacr en ausencia de la RA (*Espermatozoides intactos*)

Como primer paso, se evaluó la respuesta de LS Green en células que no liberaron su contenido acrosomal (espermatozoides intactos o no reaccionados) (**Fig. 9**), conforme a lo reportado por FM 4-64 y con la finalidad de constatar que LS Green fuese un fiel reportero de cambios en el pH del acrosoma. Se determinó la fotoestabilidad del colorante (células=60, n=4) por la exposición a la fuente de iluminación, que mostró un ligero decaimiento de la fluorescencia promedio sin relevancia estadística (**trazo gris**) conforme a la prueba de Tukey de comparación múltiple.

En un siguiente experimento, se evaluó la respuesta al medio de registro, que se utilizó como vehículo para todos los compuestos que se adicionaron y también se usó como un control negativo de la alcalinización acrosomal (**trazo negro**). Al minuto 1 se incorporó medio HTF no capacitado (células=46, n=5), la fluorescencia media se mantuvo al margen de los niveles del fotoblanqueamiento en los primeros minutos y a partir del minuto 3.5 se observó un ligero decaimiento de la fluorescencia, que resultó insignificante en comparación al efecto de los estímulos probados. La segunda adición fue NH₄Cl (10 mM) en el

minuto 5, se usó como un control positivo de alcalinización acrosomal y los espermatozoides respondieron efectivamente, mostrando un incremento del pHacr significativo.

Posteriormente, examinamos el efecto de los inductores de la RA en el pHacr de los espermatozoides intactos:

Se adicionó el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina (minuto 1), un inductor artificial de la RA, que provocó un aumento del pHacr con una cinética lenta, constante y lineal (**trazo verde**). Después, estas células se expusieron a NH_4Cl (minuto 5), respondiendo a una segunda alcalinización acrosomal sin que se desencadenara la RA en el tiempo que comprendieron nuestros registros. Estos resultados comprenden a todos los espermatozoides que no respondieron a la RA por la exposición a ionomicina+ NH_4Cl , un total de 39 espermatozoides no reaccionados de 161 células analizadas (n=6). De los estímulos analizados en los espermatozoides intactos, la adición de ionomicina+ NH_4Cl generaron los niveles de alcalinización acrosomal más altos en espermatozoides intactos.

Como un agonista fisiológico de la RA, se utilizó progesterona (minuto 1), que generó una alcalinización rápida y que se sostuvo después del primer minuto de la adición (**trazo rojo**). En el minuto 5, estas células se estimularon con NH_4Cl , lo que provocó un segundo incremento en el pHacr. Estos registros corresponden a 117 espermatozoides que no reaccionaron de un total de 153 células analizadas (n=5).

Finalmente, expusimos a los espermatozoides a NH_4Cl , en una sola adición (minuto 1, **trazo violeta**), para evaluar la respuesta del pHacr ante un agente alcalinizador. Conforme a lo esperado, el pHacr de los espermatozoides incrementó, generando una alcalosis rápida, que se estabilizó durante el primer minuto de la adición en 78 espermatozoides intactos de un total de 100 células analizadas (n=5).

De forma interesante, la alcalinización que provocó la progesterona (minuto 1, **trazo rojo**) siguió una cinética muy similar a la que promovió el NH_4Cl (minuto 1, **trazo violeta**), incluso la fluorescencia media se traslapó desde el momento de la adición y hasta el minuto 3.5.

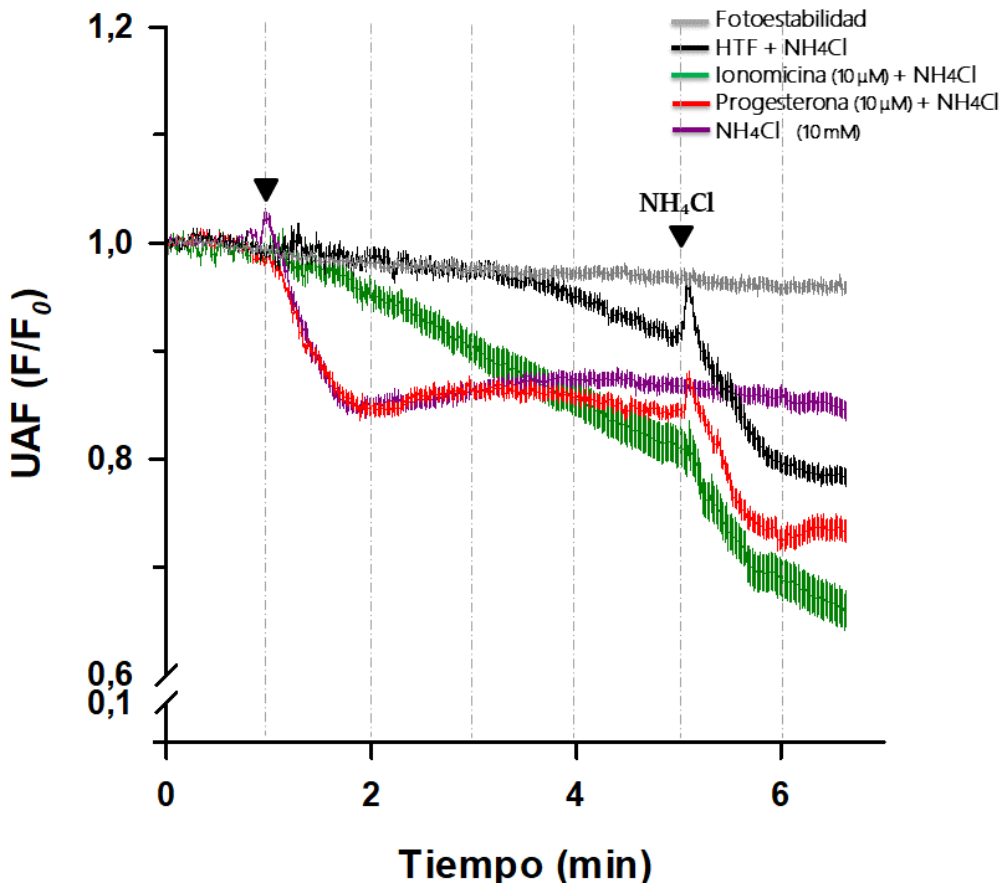


Figura 9 | Registros de LS Green ante distintos estímulos sin ocurrencia de RA.

Cada trazo representa la fluorescencia normalizada promedio \pm S.E.M. de la región acrosomal de espermatozoides individuales de al menos 4 donadores distintos. La primera punta de flecha indica la adición del estímulo al minuto 1 (HTF, ionomicina, progesterona ó NH_4Cl). La segunda adición corresponde a NH_4Cl , al minuto 5, excepto en el caso de NH_4Cl (**Trazo violeta**). En el registro de fotoestabilidad no se realizaron adiciones (**Trazo gris**).

Los inductores de la RA utilizados durante estos experimentos, así como la respuesta al NH_4Cl , provocaron la disminución de la fluorescencia de LS Green en niveles estadísticamente diferentes al control de medio HTF+ NH_4Cl y a los registros de fotoestabilidad, conforme a la prueba estadística de comparación múltiple.

6.1.2 El pHacr durante la RA (*Espermatozoides reaccionados*)

Una vez corroborado que LS Green es capaz de indicar cambios en el pHacr de espermatozoides de humano, se examinó la respuesta de las células que sí

experimentaron el proceso de RA, por lo que liberaron su contenido acrosomal (células reaccionadas).

Con el fin de realizar un estudio comparativo sobre el comportamiento del pH_{acr} cuando hay y no hay RA, el análisis se realizó de la siguiente forma:

Se seleccionaron las células que experimentaron RA y se graficó para cada espermatozoide (como se especifica en el **Apéndice 3**) el valor de fluorescencia de LS Green (**puntos amarillos**) en el tiempo que inicio la RA (reportada por FM 4-64). Los espermatozoides reaccionados se agruparon por intervalos de tiempo de reacción, en rangos de un minuto (minuto 1-2...6-7), es decir, cada punto amarillo corresponde a una célula reaccionada en cierto nivel de alcalinización y dentro de cierto intervalo de tiempo. Asimismo, señalamos el promedio de alcalinización acrosomal durante la RA (**puntos rojos**) para cada intervalo de tiempo, incluyendo las desviaciones estándar.

El siguiente paso fue realizar el análisis de comparación múltiple de la RA (**puntos rojos**) contra dos condiciones sin ocurrencia de la RA: el control de medio HTF+NH₄Cl (**trazos en negro**) y su respectivo inductor (**trazos en azul**) conforme transcurrió el tiempo. Por lo que establecimos como puntos de comparación la mitad de cada intervalo de tiempo (minuto 1.5...6.5) para confrontar, en un análisis estadístico, el cambio del pH_{acr} en cada condición y a medida que transcurre el tiempo de registro (**Figs. 11a, 13a y 15a**). El resumen de las pruebas de comparación múltiple se grafica para cada estímulo (**Figs. 11b, 13b y 15b**).

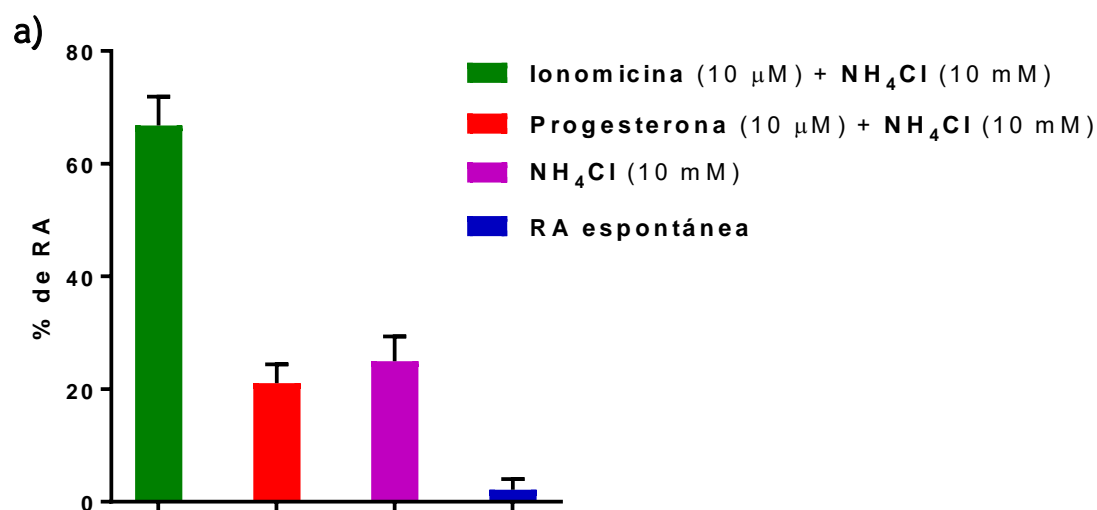
En síntesis, confrontamos los promedios de fluorescencia de LS Green, en el inicio de la RA y en ausencia de RA (control de medio e inductor) en seis momentos a lo largo del tiempo (minuto 1.5...6.5) para explorar si existe una correlación entre la magnitud de alcalinización acrosomal y el desencadenamiento de la RA.

6.1.2.1 RA en respuesta a diferentes estímulos

En primera instancia, presentamos el porcentaje de RA que resultó de cada condición. Estos resultados corresponden a al menos 4 donadores por cada estímulo, donde cada donador representa un experimento independiente.

El porcentaje de RA se obtuvo considerando el total de los espermatozoides reaccionados entre el total de los espermatozoides analizados para cada donador en cierta condición (Datos de la Fig. 10b). Se presenta la proporción media de RA en cada condición, incluyendo el error estándar de la media (S.E.M) (Fig. 10a).

La mayor incidencia de RA se observó en los espermatozoides expuestos a Ionomicina+NH₄Cl, con un porcentaje del 66.8% de RA. La estimulación con Progesterona+NH₄Cl generó un porcentaje de RA del 21.0%; comparablemente, la adición única de NH₄Cl produjo un porcentaje medio de RA del 24.9%. El menor porcentaje de RA se observó en las células que no se sometieron a estimulación y que reaccionaron espontáneamente en una proporción del 2.1% (Fig. 10a).



b) Condición	Espermatozoides reaccionados	Espermatozoides intactos	Total de células analizadas	Donadores (n)
Ionomicina + NH ₄ Cl	122	39	161	6
Progesterona + NH ₄ Cl	36	117	153	5
NH ₄ Cl	22	78	100	4
RA espontánea	4	120	124	5

Figura 10 | Porcentaje de RA reportada por FM 4-64 en diferentes condiciones.

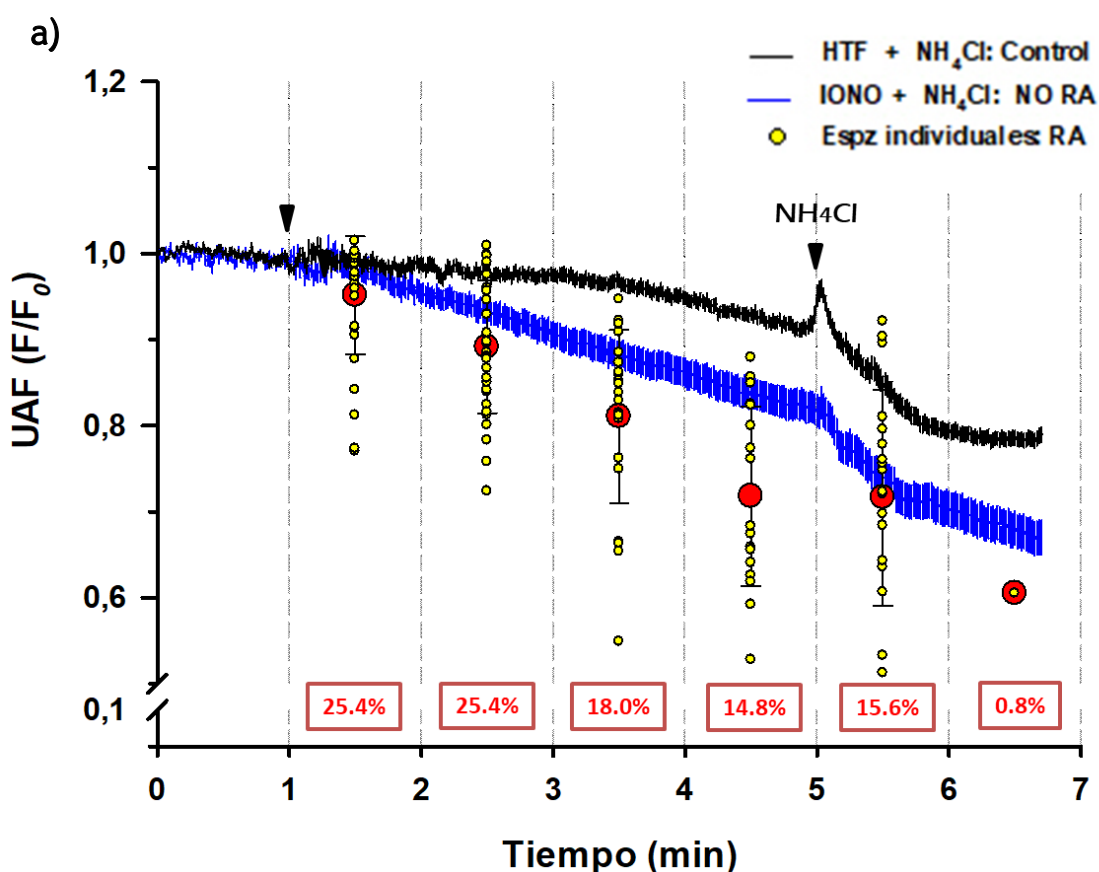
a) Se presentan los porcentajes de RA media conseguidas en cada condición. El mayor porcentaje de RA corresponde a la condición Ionomicina+NH₄Cl, que superó el 60%. La Progesterona+NH₄Cl indujo cerca del 21% de RA, en proporciones similares al efecto

del NH_4Cl (24.9%). La RA espontánea sólo se presentó en 2% de la población analizada. Las barras representan la media \pm S.E.M. b) En la tabla se resume el número de espermatozoides cuantificados en presencia o ausencia de RA, así como el número de experimentos independientes realizados para cada condición (n).

A continuación, presentamos las cinéticas de alcalinización del pHacr con diferentes estímulos y desglosamos los resultados de las pruebas de comparación múltiple.

6.1.2.2 Inducción de la RA con ionomicina

La inducción de la RA mediante la exposición a ionomicina (minuto 1) generó el mayor porcentaje de RA con respecto a los demás estímulos (Fig. 10). La mayor proporción de espermatozoides reaccionaron durante los primeros 2 minutos después de la adición de ionomicina (Fig. 11a), tiempo en que el pHacr promedio mostró niveles más alcalinos comparados con las células no reaccionadas. A medida que transcurrió el tiempo, la alcalinización media de los espermatozoides reaccionados presentó niveles superiores al pHacr de células no reaccionadas, con una mayor significancia estadística (Fig. 11b).



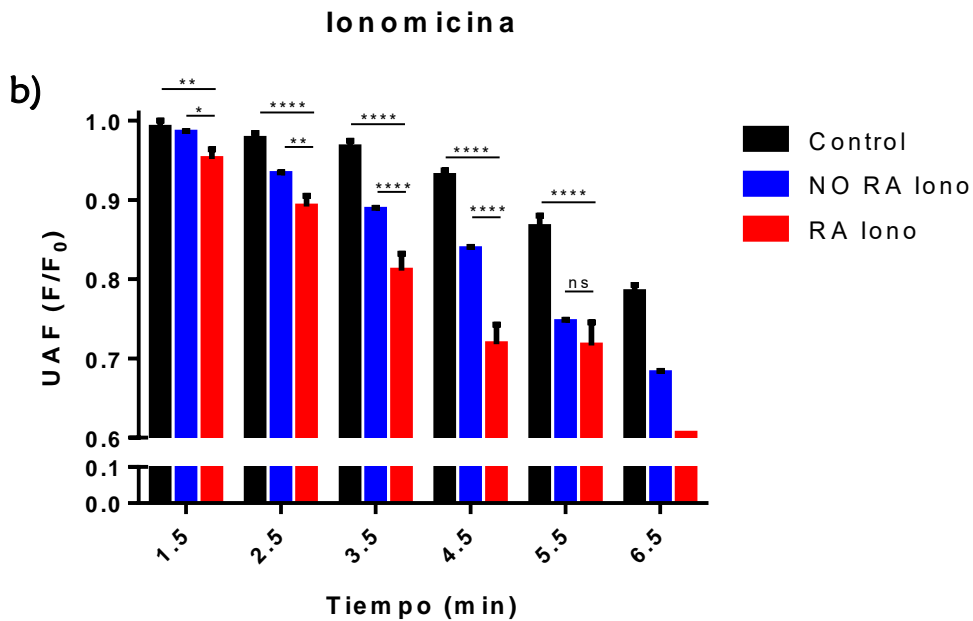


Figura 11 | Niveles de alcalinización en la inducción de la RA con ionomicina.

a) Se presentan los valores de fluorescencia normalizada de LS Green en el inicio de la RA (puntos amarillos), incluyendo el promedio de células reaccionadas por intervalo de tiempo (puntos rojos) y su desviación estándar. Los porcentajes en los cuadros rojos indican la proporción de espermatozoides que reaccionaron durante tal rango de tiempo. Los trazos corresponden al promedio de la fluorescencia normalizada de los espermatozoides intactos (ver métodos): el trazo azul corresponde a los espermatozoides inducidos con ionomicina, mientras que la población de espermatozoides en presencia de medio HTF + NH₄Cl se representan en el trazo negro. Los espermatozoides que desencadenaron la RA, en promedio, mostraron niveles de fluorescencia de LS Green más bajos y por lo tanto mayor alcalinización que las células intactas. b) Resumen del pH_{acr} en respuesta a ionomicina (RA=122, espermatozoides analizados=161, n= 6). Los niveles de mayor alcalinización promedio por inducción de ionomicina, se presentaron en los espermatozoides reaccionados, con diferencias estadísticamente significativas respecto a los no reaccionados (control de medio y No RA por ionomicina). Al promover la alcalinización intracelular con NH₄Cl, una población de espermatozoides (16%) reaccionó, a partir de diferentes niveles de alcalinización previa a la RA. En el minuto 6-7 no fue posible realizar la comparación estadística por falta de medidas repetidas. Las barras representan la media ± S.E.M. y los asteriscos indican diferencias significativas a un nivel $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) y $p \leq 0.001$ (***).

En la segunda adición, agregamos NH₄Cl, lo que generó que una población de espermatozoides experimentara la RA (16%), habiendo estado expuestos a

ionomicina previamente. Como se puede apreciar en el intervalo 5-7 de la Fig. 11, estas células mostraron mayor alcalinización al exponerse a ionomicina, sin embargo, fue hasta la adición del pulso alcalinizador con NH_4Cl (minuto 5) cuando se desencadenó la RA (minuto 5-7) (Fig. 12). Asimismo, dentro de este rango de tiempo algunos espermatozoides mostraron mayor alcalinización acrosomal, pero fue hasta la adición del pulso alcalinizador que inició la RA, sugiriendo que la pre-estimulación con ionomicina favoreció la ocurrencia de la RA desencadenada por NH_4Cl .

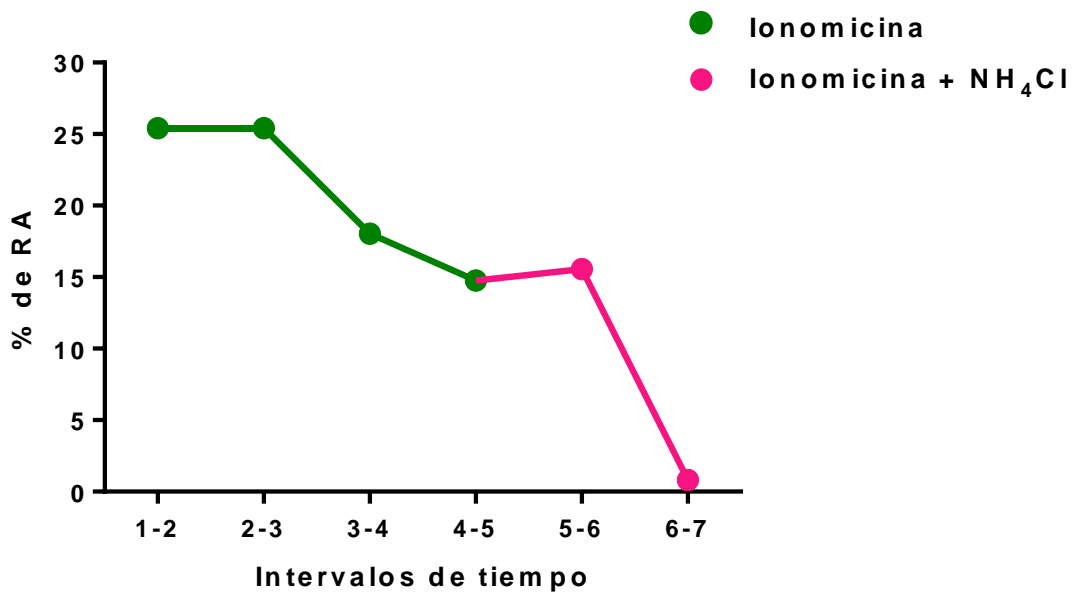


Figura 12 | Proporción de RA con la adición de ionomicina y la subsecuente adición de NH_4Cl en el transcurso del tiempo.

El mayor porcentaje de RA ocurrió en los primeros minutos de la exposición a ionomicina (verde) y el porcentaje decayó conforme transcurrió el tiempo. Tras añadir NH_4Cl , después del minuto 5 (rosa), respondió el 16% de los espermatozoides reaccionados en el minuto 5-6 y finalmente, el 1% al concluir los registros.

Por lo tanto, la estimulación con ionomicina produce una alcalinización del pHAc que, en general, fue superior en los espermatozoides que experimentaron la RA.

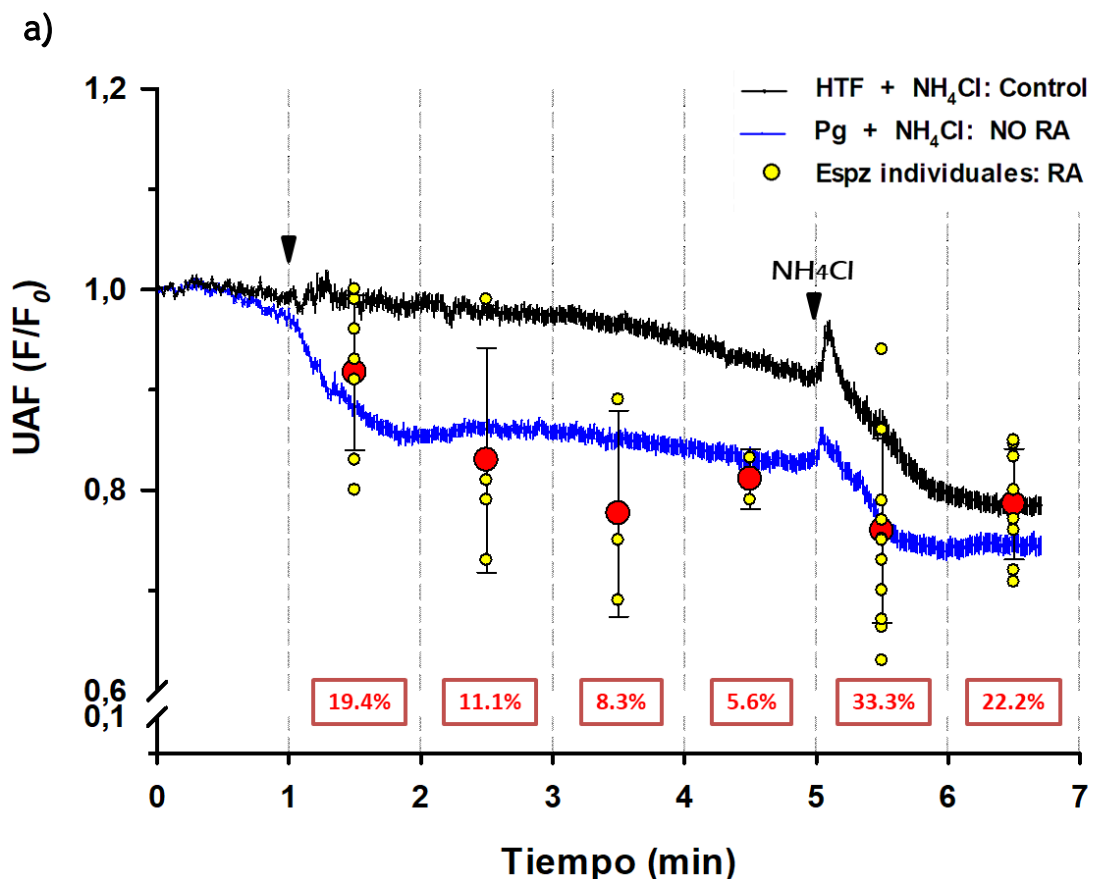
6.1.2.3 Inducción de la RA con progesterona

La RA estimulada por la progesterona, un agonista fisiológico en espermatozoides de mamífero [56, 57], manifestó un porcentaje menor (21%) de células reaccionadas comparado con los estímulos probados en este trabajo y

cercano a lo reportado en la literatura [30, 57]. Los espermatozoides expuestos a progesterona (10 μ M), alcalinizaron su pHacr (Fig. 13). En el primer minuto después de la inducción, los espermatozoides intactos se alcalinizaron más rápidamente en comparación a la media de los espermatozoides reaccionados.

Del total de espermatozoides reaccionados con progesterona, cerca del 30% de la población reaccionó durante los dos primeros minutos después de la exposición y algunos espermatozoides mantuvieron niveles de pHacr más alcalinos que los intactos, aunque la prueba estadística no dio diferencias significativas de la alcalinización promedio durante este tiempo.

A partir del minuto 3, la alcalinización media de los espermatozoides reaccionados fue mayor que el pHacr de los espermatozoides intactos expuestos a progesterona, aunque sólo fue estadísticamente significativo en el intervalo del minuto 3-4 y en un 8.3% de la población reaccionada (Fig. 13b). Con respecto al control de medio HTF+NH₄Cl, siempre hubo diferencias significativas en la alcalinización acrosomal durante la inducción de la RA con progesterona.



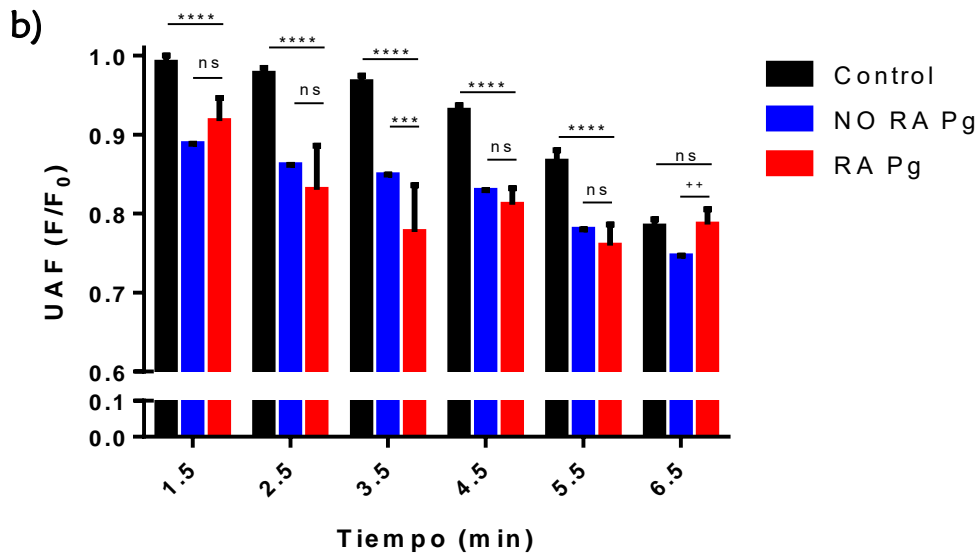


Figura 13 | Niveles de alcalinización en la inducción de la RA con progesterona.

a) Valores de fluorescencia de LS Green en el inicio de la RA (puntos amarillos) y fluorescencia media de RA (puntos rojos) por intervalos de tiempo. Los porcentajes en los cuadros rojos indican la proporción de espermatozoides que reaccionaron durante tal rango de tiempo. Los trazos representan el promedio de la fluorescencia normalizada (ver métodos) \pm S.E.M. de los espermatozoides intactos en el curso del tiempo. El trazo azul corresponde a los espermatozoides inducidos con progesterona, los cuales no experimentaron RA. El control de medio HTF+NH₄Cl se representa en el trazo negro. b) Cuantificación de la fluorescencia normalizada por intervalos de tiempo: la gráfica de barras corresponde a los valores de la media \pm S.E.M. a la mitad de cada intervalo de tiempo y los asteriscos indican diferencias significativas a un nivel $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) y $p \leq 0.001$ (***).

De manera interesante, el mayor porcentaje de RA obtenido por la exposición a progesterona (55.5% de la población total expuesta a Progesterona), ocurrió tras el estímulo alcalinizador de NH₄Cl, durante los dos minutos siguientes (Fig. 14, minuto 5-7). Estos espermatozoides aumentaron su pH_{acr} antes de la RA aunque la media de alcalinización acrosomal no mostró significancia estadística en esta población de espermatozoides.

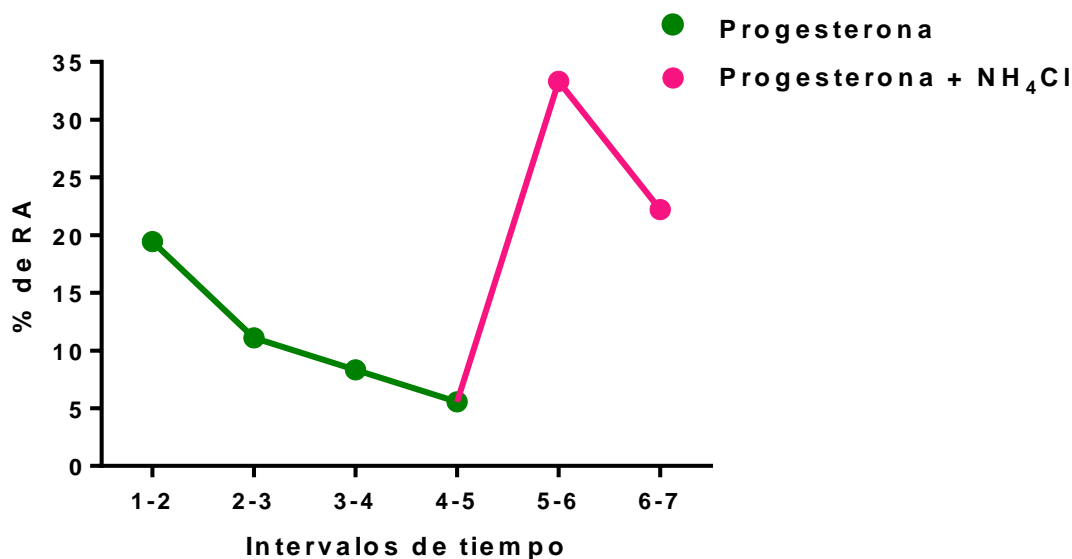


Figura 14 | Proporción de RA con la adición de progesterona y la subsecuente adición de NH₄Cl en el transcurso del tiempo.

La RA desencadenada por la exposición a progesterona (verde) obtuvo la mayor proporción en los primeros minutos y decreció conforme avanzó el tiempo. Notablemente, después de la adición de NH₄Cl (rosa), una proporción superior de espermatozoides respondió a la RA el 33.3% en el minuto 5-6 y 22.2% durante el minuto 6-7. Es decir, de la población total de células reaccionadas con progesterona, más de la mitad (55.5%) experimentó la RA con la subsecuente adición de NH₄Cl.

Por lo tanto, la estimulación con progesterona genera una alcalinización acrosomal tanto en espermatozoides intactos como en los que experimentan la RA.

6.1.2.4 Inducción de la alcalinización intracelular con NH₄Cl

En los registros anteriores, hemos utilizado NH₄Cl, después de la exposición a los inductores, como un control del aumento del pH_{Hacr}. Para explorar si la elevación del pH_{Hacr} es capaz de desencadenar la RA por sí misma, se indujo la alcalinización intracelular de los espermatozoides, mediante la exposición a NH₄Cl.

Nuestros resultados mostraron que NH₄Cl promueve un aumento del pH_{Hacr} aunque, contrario a lo esperado, la alcalinización intracelular sólo desencadenó la RA en una pequeña proporción de espermatozoides (24.9%) comparado con el resto de los estímulos (Fig. 10). De esta población de

espermatozoides reaccionados, la mayoría (31%) inició la RA dentro del primer minuto (Fig.15a), donde el pHacr fue mayor para los espermatozoides reaccionados, con una diferencia estadística significativa (Fig.15b).

Conforme transcurrió el tiempo, los niveles de alcalinización de los espermatozoides reaccionados mostraron diferencias significativas contra el control de medio HTF pero no en comparación al pHacr de los espermatozoides intactos, lo que sugiere que la alcalinización del acrosoma es importante más no esencial para la ocurrencia de la RA en humanos.

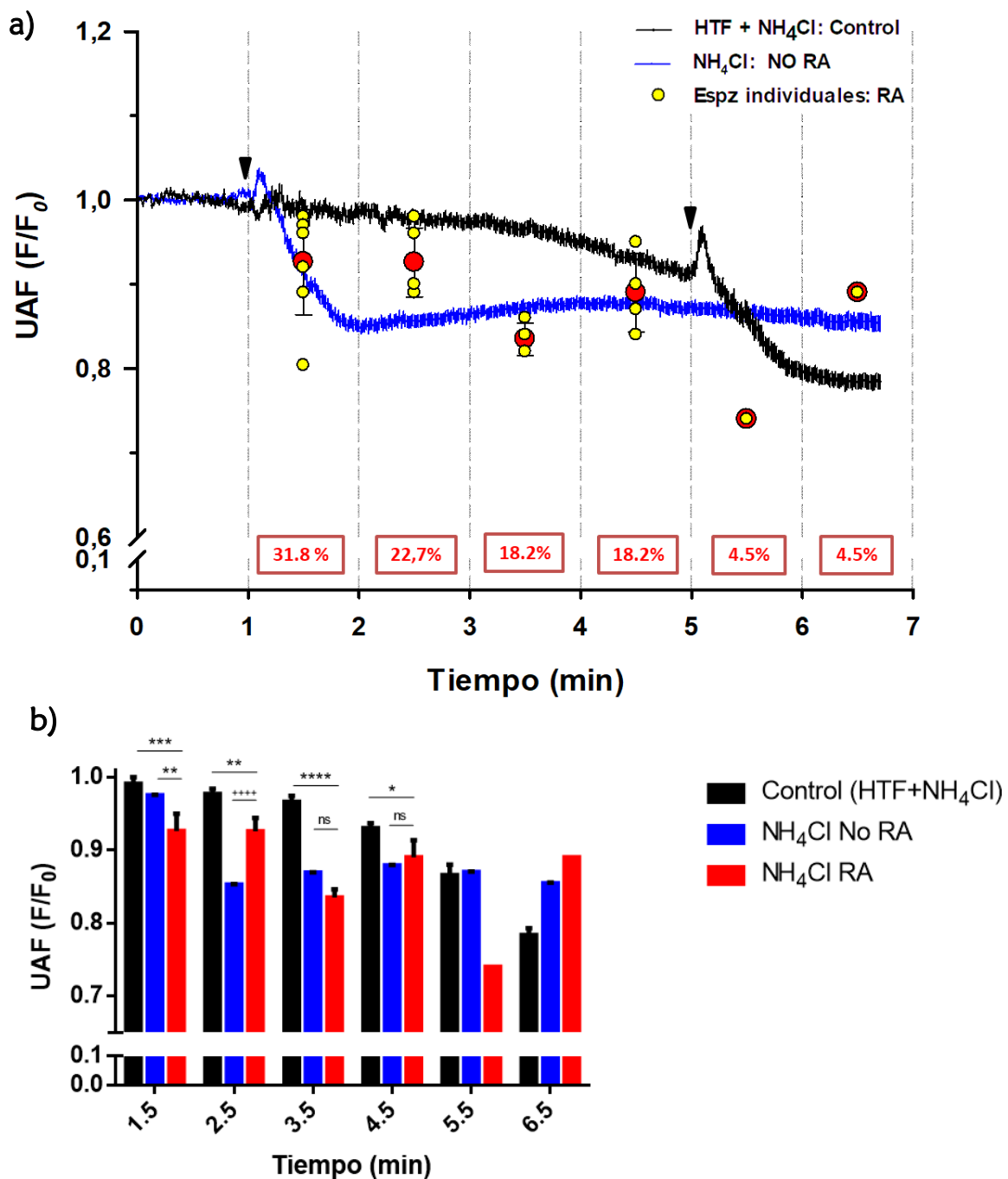


Figura 15 | Niveles de alcalinización acrosomal por exposición a NH_4Cl .

a) El trazo azul corresponde a espermatozoides expuestos a una sola adición de NH_4Cl en el minuto 1. El trazo azul representa el control de medio $\text{HTF}+\text{NH}_4\text{Cl}$. Los espermatozoides reaccionados por estimulación del agente alcalinizador, se representan con puntos amarillos, que corresponden a la fluorescencia de LS Green en el inicio de la RA. Los puntos rojos indican la fluorescencia media de reacción incluyendo la desviación estándar por intervalos de tiempo. El pH_{acr} de las células reaccionadas fue mayor que el control en la mayoría de los intervalos, no así en comparación al pH_{acr} promedio de las células intactas (trazo azul). Los porcentajes en los cuadros rojos indican la proporción de espermatozoides reaccionados en el rango de tiempo. El control se representa en el trazo negro. b) Resumen de los resultados de alcalinización acrosomal con NH_4Cl (RA=22, espermatozoides analizados=100, $n=5$). Las barras representan la media \pm S.E.M. y los asteriscos indican diferencias significativas a un nivel $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) y $p \leq 0.001$ (***).

6.1.2.5 RA espontánea

Los espermatozoides reaccionados espontáneamente, en condiciones desprovistas de estímulos, corresponden al menor porcentaje de RA observada (2%) de las condiciones analizadas. Desafortunadamente, sólo 4 células se sometieron a la RA espontánea, de un total de 124 células analizadas, por lo que, debido a la baja tasa de RA espontánea y a que se contó con una sólo célula reaccionada por intervalo de tiempo, resultó imposible llevar a cabo la prueba estadística en esta condición, dada la falta de medidas repetidas (Fig. 16).

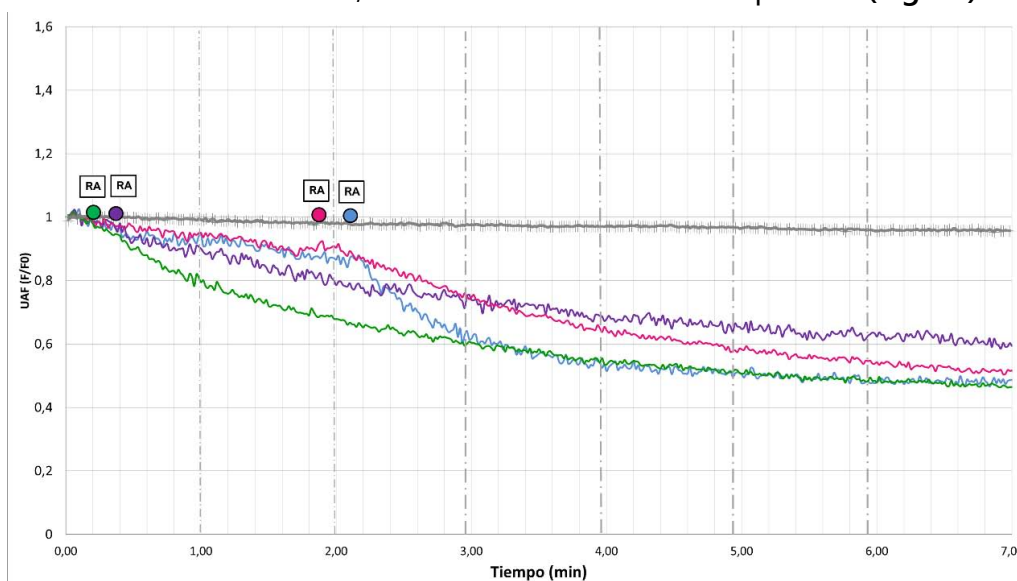


Figura 16 | Cinética del pHacr durante la RA espontánea

Los trazos (rosa, azul, verde, morado) corresponden a la fluorescencia individual de LS Green y los círculos indican el tiempo en el que inició la RA, conforme con FM 4-64. Cada color corresponde a un espermatozoide. El trazo gris representa la fluorescencia media de los espermatozoides intactos (células=60, n=4). En el minuto 0-1 se presentó la RA de dos células (verde y morado), en el minuto 1-2 un espermatozoide reaccionó, así como en el intervalo 2-3. Aunque estas dos últimas células mantuvieron un nivel de fluorescencia menor que el basal antes de someterse a la RA, no fue posible realizar la prueba estadística por falta de medidas repetidas.

7. Discusión

Sánchez-Cárdenas y colaboradores (2014), establecieron una estrategia para estimar simultáneamente cambios en el $[Ca^{2+}]_i$ y la progresión de la RA en espermatozoides de humano, mediante los colorantes fluorescentes Fluo-4 y FM 4-64, respectivamente ^[54]. Con base en esta técnica, en el presente trabajo establecimos la metodología para medir los cambios de pHacr asociados al proceso de RA, utilizando un colorante sensible a cambios en el pH, en lugar del colorante para medir $[Ca^{2+}]_i$. LS Green es una amina débil que se acumula en compartimentos ácidos como resultado de la protonación, incrementando su fluorescencia o bien, disminuyéndola cuando el pH se eleva.

7.1 LS Green reporta cambios en el pHacr de espermatozoides de humano

Como hemos mencionado, el acrosoma es una vesícula ácida cuyo contenido se libera durante la RA, un proceso gradual y progresivo de exocitosis. Con el fin de comprobar que LS Green fuese un buen indicador de cambios en el pH del acrosoma antes y durante la inducción de la RA, en primer lugar, realizamos un análisis en los espermatozoides con acrosomas intactos, conforme a lo reportado por FM 4-64 (**Fig. 9**).

Al exponer a estas células a los distintos estímulos, revelaron diferentes cinéticas de disminución de la fluorescencia de LS Green:

En el control de medio HTF, los niveles de fluorescencia se mantuvieron dentro del margen de la fotoestabilidad media, hasta el minuto 3.5 y posteriormente ocurrió un ligero decaimiento que indicaría un incremento del

pHacr. Éste ligero aumento del pHacr puede explicarse por las condiciones del medio externo de registro: el pHe se ajustó a 7.4 para simular una condición del ambiente femenino, lo que pudo suscitar una ligera alcalinización del citosol, y por lo tanto del pHacr, pues se ha estimado que el pHacr de espermatozoides capacitados alcanza un valor de 6.2 ^[45] y hay una dependencia del pHi con el pHe [43].

No obstante, esta ligera alcalinización en el control negativo de medio HTF es insignificante en comparación al efecto que generaron los inductores. Además, la subsecuente adición de NH₄Cl, como un control positivo de alcalinización acrosomal, sí resultó en un efecto con significancia estadística.

Los cambios en los niveles de fluorescencia media en los controles de fotoestabilidad y el medio de registro (HTF+NH₄Cl) nos permitieron constatar que LS Green reporta confiablemente cambios de pH en la región acrosomal.

A continuación, se discute el efecto de los inductores en el pHacr y se comparan los resultados en presencia y ausencia de la RA.

7.2 Ionomicina eleva el pHacr: los acrosomas más alcalinos experimentan la RA

Nuestros resultados demuestran que la exposición a ionomicina generó una cinética de alcalinización distintiva del resto de los estímulos examinados, en los espermatozoides intactos, con un aumento lento y gradual a lo largo del tiempo y siendo estadísticamente diferente del control de medio en todos los intervalos de tiempo evaluados.

Por su parte, los espermatozoides reaccionados exhibieron una tendencia similar en la alcalinización acrosomal media (círculos rojos) durante la exposición a ionomicina (**Fig. 10a**), por intervalo de tiempo y a medida que el tiempo avanzaba, los espermatozoides que reaccionaron alcanzaron niveles más alcalinos. Cabe destacar que los espermatozoides que se sometieron a la RA mostraron niveles de alcalinización media superior que los espermatozoides intactos. Estos resultados sugieren que los espermatozoides estimulados con ionomicina, requieren alcanzar niveles más alcalinos del pHacr para someterse a la RA.

La ionomicina es un ionóforo intercambiador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ y un potente inductor de la RA 8^[58]. La alcalinización observada en el pHacr puede explicarse por la entrada de Ca^{2+} a la célula, lo que induciría la salida de H^+ , a nivel del citosol y consecuentemente a nivel del acrosoma, elevando así el pHacr.

Por otro lado, la cinética de alcalinización acrosomal en respuesta a ionomicina, podría revelarnos la velocidad con la que incrementa el pH de la vesícula acrosomal, probablemente mediante el intercambio de Ca^{2+} por H^+ . Bajo este mecanismo supuesto, se explicaría que la mayor proporción de células que experimentaron la RA mostraron los niveles más altos de alcalinización y, probablemente, mayores niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por la acción del ionóforo.

Finalmente, el mecanismo mediante el que este ionóforo de Ca^{2+} promovería la alcalinización acrosomal, podría no involucrar al conjunto de canales implicados en la regulación del pH en el espermatozoide, ante condiciones fisiológicas, por lo que estos resultados deben interpretarse con reserva.

7.3 El aumento del pHacr, promovido por progesterona, no es indispensable para desencadenar la RA.

Para tener un acercamiento al efecto de un inductor fisiológico de la RA en el pHacr, expusimos a los espermatozoides a progesterona.

Nuestros resultados sugieren que la progesterona evoca un incremento en el pHacr en una magnitud y velocidad similar a la alcalinización generada por un agente alcalinizador como NH_4Cl . Sorprendentemente, los trazos promedio de la exposición a progesterona (10 μM) y NH_4Cl (10 mM) se empalmaron en los espermatozoides que no liberaron la vesícula acrosomal (**Fig. 9**) e incluso el porcentaje de RA fue similar para cada caso (**Fig. 10a**). Se ha propuesto que la RA estimulada por progesterona, ocurre en una pequeña población de células ya que durante la capacitación sólo una fracción de los espermatozoides se someten a los eventos moleculares necesarios para lograr la RA ^[14].

La alcalinización del pHacr promovida por la progesterona y NH_4Cl , por separado, no fue mayor al pHacr de los espermatozoides intactos en todos los

intervalos de tiempo, sugiriendo que una mayor alcalinización no es indispensable para desencadenar la RA con estos compuestos.

Pocos reportes en la literatura abordan el efecto de la progesterona en el pHi del espermatozoide. Se ha sugerido la importancia de un medio intracelular alcalino para la acción extragenómica de la progesterona en la inducción de la RA [59]. Recientemente, se describió un modelo de una vía endocannabinoides inducida por la progesterona, que promueve la entrada de Ca^{2+} a la célula a través de CatSper un canal que es modulado por pHi [33]. Sin embargo, en la actualidad no hay evidencias de cómo la progesterona podría repercutir directamente en el pH del espermatozoide e incluso, en un estudio realizado por Cross y Razy-Faulkner, se ha propuesto que genera el efecto contrario, una acidificación [59].

A partir de nuestros resultados podemos especular que la progesterona activa indirectamente la maquinaria de canales iónicos implicados en la regulación del pHi que, al elevar el pH citosólico, alcalinizaría subsecuentemente el pHacr.

Por otro lado, y consistente con reportes anteriores, se observó una mayor respuesta de la RA inducida por progesterona, cuando se incubó simultáneamente con NH_4Cl [59], una base débil que eleva el pHi. En el mismo trabajo realizado por Cross y Razy-Faulkner, no se observó inducción directa de la RA por los agentes alcalinizadores, NH_4Cl y TMA, como tampoco observamos en nuestros resultados una respuesta acrosomal significativa durante el estímulo de NH_4Cl . Estas evidencias sugieren que la progesterona+ NH_4Cl , producen un efecto sinérgico que desencadena la RA en una respuesta rápida (2 minutos), en comparación al tiempo de RA que se ha visto para la progesterona individualmente. Por lo tanto, estos resultados apoyan la propuesta de que la alcalinización acrosomal podría tener un papel importante en la estimulación de la RA, promovida por progesterona.

Una variable por considerar en nuestro sistema es la composición del medio de registro, que en nuestros experimentos no contuvo HCO_3^- extracelular. Algunos autores sugieren que el HCO_3^- podría no ser indispensable en el momento de la RA inducida por la zona pelúcida [60], otros estudios demuestran

que la progesterona es capaz de inducir la RA en un medio con bajo HCO_3^- [61] y coinciden en que el HCO_3^- es un componente indispensable durante la capacitación. En este sentido, los resultados que mostramos en este trabajo se obtuvieron al exponer a los espermatozoides a HCO_3^- a lo largo de la capacitación, pero no durante los registros, por lo que no debemos descartar, en estudios posteriores, considerar la respuesta del pHacr en un medio suplementado con HCO_3^- , al inducir la RA con progesterona.

7.4 La alcalinización acrosomal promovida con NH_4Cl por sí misma no desencadena la RA

Con el objetivo de comprobar si un agente alcalinizador del acrosoma es capaz de desencadenar la RA al elevar el pHacr, examinamos la respuesta acrosomal al exponer a los espermatozoides únicamente a NH_4Cl . NH_4Cl es una base débil conocida por promover la alcalinización citosólica y, acorde a nuestros resultados, promueve también la alcalinización acrosomal en espermatozoides de humano, en presencia o ausencia de RA.

En espermatozoides no reaccionados, el trazo de alcalinización media por la exposición a NH_4Cl , mostró una cinética de alcalinización típica del estímulo generado por NH_4Cl , con un incremento del pH inicial seguida de una ligera acidificación, hasta que se estabiliza el pH, manteniéndose constante. La naturaleza bioquímica de este compuesto podría repercutir en la baja eficacia para desencadenar la RA, ya que la alcalinización que promueve en el acrosoma es transitoria.

Nuestros resultados concuerdan con otros reportes previos, donde el NH_4Cl estimula la RA en proporciones no significativas [51, 58]. Conforme a lo reportado por trabajos de nuestro laboratorio, la estimulación con NH_4Cl aumenta el $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pero no desencadena la RA. En este reporte, Chávez *et al.*, demostraron que en un medio con bajo Ca^{2+} (100 nM), NH_4Cl no fue capaz de elevar el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pero en un medio con niveles normales de Ca^{2+} externo (en rangos de concentración como los aquí utilizados) sí hay un incremento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Por lo que, aun cuando NH_4Cl promueve la alcalinización acrosomal, es incapaz de

desencadenar la RA pues es necesario el aumento tanto del pHacr como del $[Ca^{2+}]_i$ [51].

Si bien, la alcalinización promovida por NH_4Cl no resultó suficiente para estimular la RA con significancia estadística, no ocurrió lo mismo para el caso de los espermatozoides pre-estimulados con los inductores de la RA. Después de la exposición a ionomicina o progesterona (minuto 1), se observó una respuesta acelerada de la RA al adicionar NH_4Cl (Figs. 12, 14), como si la pre-estimulación de los inductores más el pulso alcalinizador generaran un efecto sinérgico para desencadenar la RA.

En relación con nuestros resultados, los espermatozoides pre-estimulados con progesterona o ionomicina, compuestos que incrementan el $[Ca^{2+}]_i$, incrementaron el pHacr y el $[Ca^{2+}]_i$ sin provocar la exocitosis acrosomal. Sin embargo, la subsecuente exposición al agente alcalinizador, permitió un nuevo incremento del pHacr y el $[Ca^{2+}]_i$ que serían suficientes para desencadenar la RA.

Sugerimos que la combinación del inductor (ionomicina o progesterona)+ NH_4Cl mantienen ventaja sobre la adición única de NH_4Cl para desencadenar la RA debido a dos razones principales: a) los inductores *per se* elevaron el pHacr de los espermatozoides (incluyendo los intactos), b) los inductores de la RA involucran el influjo de $[Ca^{2+}]_i$, que es requerido durante ese proceso.

Estas evidencias apoyan la propuesta de que tanto el pHacr como el $[Ca^{2+}]_i$ desempeñan papeles cruciales en el desarrollo de la RA en espermatozoides de humano.

7.5 En la RA espontánea no se detectaron cambios de pHacr

La RA espontánea se manifiesta sin que se estimule a los espermatozoides con algún inductor. Esperábamos que estos resultados aportaran información sobre el tiempo y la magnitud de cambio del pHacr antes de la RA. Sin embargo, nos enfrentamos con dos limitantes principales, la primera corresponde a la baja tasa de RA espontánea observada, donde sólo 4 células de 124 analizadas reaccionaron de esta forma; la segunda limitante podría recaer en nuestro sistema de registro, que podría no contar con la resolución temporal suficiente para

detectar los posibles cambios de pH_{acr} en las células reaccionadas espontáneamente.

Aunque, se ha demostrado que la RA espontánea correlaciona con el aumento del pH_{acr} a lo largo de la capacitación ^[45], queda por resolver cuál es la escala de tiempo en la que ocurre el cambio de pH_{acr} que la precede.

Desafortunadamente, LS Green mostró baja fotoestabilidad a tiempos de registro superiores bajo nuestras condiciones, por lo que no consideramos viable alargar la duración de los registros.

Finalmente, en este estudio no descartamos que nuestros parámetros experimentales sean idóneos para estimar cambios del pH_{acr} durante la RA espontánea, debido a que las células reaccionadas en el minuto 1-3 (**Fig. 16**), mostraron un decaimiento previo de su fluorescencia, que podría corresponder a una alcalinización acrosomal. Así que, para comprobar que se trate de una alcalinización previa a la RA, será necesario un análisis más extenso con un mayor número de espermatozoides examinados en esta condición.

8. Conclusiones

Todos los estímulos utilizados (ionomicina, progesterona y NH₄Cl) mostraron un efecto alcalinizador en el pH_{acr} de espermatozoides de humano.

En espermatozoides intactos se distinguieron dos tendencias principales en el incremento del pH_{acr} durante la inducción de la RA: una alcalinización rápida y sostenida (progesterona y NH₄Cl) y una alcalinización lenta y constante (ionomicina).

Los espermatozoides que se someten a la RA inducida por ionomicina, muestran niveles de pH_{acr} más alcalinos que los que no reaccionan.

Los espermatozoides que se someten a la RA inducida por progesterona alcalinizaron su pH_{acr}, aunque no en mayor magnitud que los espermatozoides intactos.

La alcalinización del pHacr, promovido por NH_4Cl , no es suficiente para desencadenar la RA.

Debido a la baja incidencia de RA espontánea, no fue posible analizar la cinética del pHacr en esta condición.

La progesterona+ NH_4Cl , muestran un efecto sinérgico y estimulan la RA en una proporción superior que la efectuada por separado.

9. Perspectivas

Determinar la cinética del cambio de pHacr durante la RA espontánea, incrementando el número de espermatozoides en el análisis de esta condición.

Evaluar la cinética del pHacr en un medio suplementado con bicarbonato.

Investigar el papel del pHacr en la vía que regula el desencadenamiento de la RA.

10. Literatura citada

- [1] Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, *38*(4), 979–986.
- [2] Okabe, M. (2013). The cell biology of mammalian fertilization. *Development*, *140*(22), 4471–4479.
- [3] De Jonge, C. (2005). Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction Update*, *11*(3), 205–214.
- [4] Suarez, S. S., & Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, *12*(1), 23–37.
- [5] Murray, S. C., & Smith, T. T. (1997). Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertility and Sterility*, *68*(2), 351–357.
- [6] Aitken, R. J., & Nixon, B. (2013). Sperm capacitation: A distant landscape glimpsed but unexplored. *Molecular Human Reproduction*, *19*(12), 785–793.
- [7] Toshimori, K., & Eddy, E. M. (2006). The Spermatozoon. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 99–148.
- [8] De Jonge, C. & Barratt, C. (2006), The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. *Cambridge University Press*, 372.
- [9] Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Treviño, C. L., Felix, R., & Beltrán, C. (2005). Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *International Review of Cytology*, *243*, 79–172.
- [10] Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Trevino, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev*, *91*(4), 1305–1355.

- [11] Simmons, L. W., & Moore, A. J. (n.d.). *10 Evolutionary quantitative genetics of sperm. Sperm Evolution* (First Edition). Elsevier Ltd.
- [12] Fléchon, J. E. (2016). The acrosome of eutherian mammals. *Cell and Tissue Research*, *363*(1), 147–157.
- [13] Wassarman, P. M., Jovine, L., & Litscher, E. S. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology*, *3*(2), E59-64.
- [14] Buffone, M. G., Hirohashi, N., & Gerton, G. L. (2014). Unresolved Questions Concerning Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis. *Biology of Reproduction*, *90*(5).
- [15] Chang MC. 1951. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature* *168*:697–698.
- [16] Austin CR (1951) Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res* *4* (series B), 581–596.
- [17] Gadella, B., & Leahy, T. (2015). New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian Journal of Andrology*, *17*(4), 561.
- [18] López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís-López, A., Santi, C. M., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2014). Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction*, *20*(7), 619–629.
- [19] Ickowicz, D., Finkelstein, M., & Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: Role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology*, *14*(6), 816–821.
- [20] Yanagimachi, R. (1981). Mechanism of fertilization in mammals. *Fertilization and Embryonic Development in Vitro*, (1979), 81–182.
https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4016-4_6

- [21] Barros, C., Bedford, J. M., Franklin, L. E. and Austin, C. R. (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 34, C1-C5.
- [22] Zanetti, N., & Mayorga, L. S. (2009). Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 81(2), 396–405.
- [23] Sosa, C. M., Pavarotti, M. A., Zanetti, M. N., Zoppino, F. C. M., De Blas, G. A., & Mayorga, L. S. (2014). Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. *Molecular Human Reproduction*, 21(3), 244–254.
- [24] Wassarman, P. M., Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Darie, C., & Litscher, E. S. (2005). Recent aspects of mammalian fertilization research. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234(1–2), 95–103.
- [25] Florman, H. M., Jungnickel, M. K., & Sutton, K. A. (2008). Regulating the acrosome reaction. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 503–510. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082696hf>
- [26] Sosa, C. M., Pavarotti, M. A., Zanetti, M. N., Zoppino, F. C. M., De Blas, G. A., & Mayorga, L. S. (2014). Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. *Molecular Human Reproduction*, 21(3), 244–254.
- [27] Okabe, M. (2016). *The Acrosome Reaction: A Historical Perspective. Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization.*
- [28] Conner, S. J., Lefièvre, L., Hughes, D. C., & Barratt, C. L. R. (2005). Cracking the egg: Increased complexity in the zona pellucida. *Human Reproduction*, 20(5).
- [29] Ren D, Navarro B, Perez G et al (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*; 413:603–609.

- [30] Harper, C. V, Barratt, C. L. R., Publicover, S. J., & Kirkman-Brown, J. C. (2006). Kinetics of the progesterone-induced acrosome reaction and its relation to intracellular calcium responses in individual human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 75(September), 933–939.
- [31] Strunker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB (2011) The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 471:382–386.
- [32] Kaupp, U. B., & Strünker, T. (2017). Signaling in Sperm: More Different than Similar. *Trends in Cell Biology*, 27(2), 101–109.
- [33] Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., ... Lishko, P. V. (2016). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science* 352, 555–559.
- [34] Wachten, D., Jikeli, J. F., & Kaupp, U. B. (2017). Sperm Sensory Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, a028225.
- [35] Correia J, Michelangeli F, Publicover S (2015) Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm. *Reproduction* 150:R65–R76.
- [36] Pastor-Soler N, Pietrement C, Breton S (2005) Role of acid/base transporters in the male reproductive tract and potential consequences of their malfunction. *Physiology (Bethesda)* 20:417–428.
- [37] Liu, Y., Wang, D.-K., & Chen, L.-M. (2012). The Physiology of Bicarbonate Transporters in Mammalian Reproduction¹. *Biology of Reproduction*, 86(4), 1–13.
- [38] Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ and Moench TR (2001) Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod* 16,1809–1813.

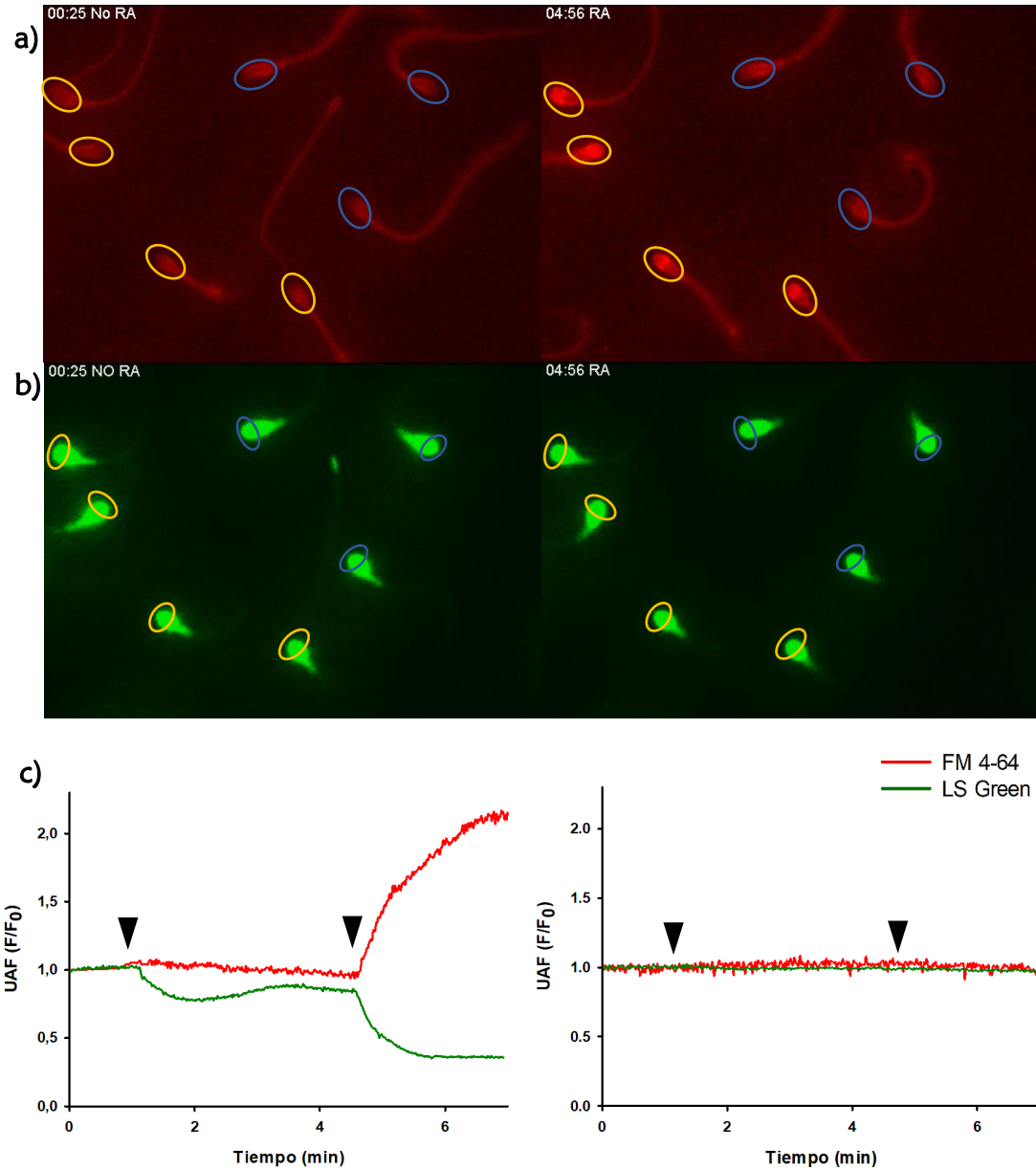
- [39] Ali Akbar, S., Nicolaidis, K. H., & Brown, P. R. (1998). Carbonic anhydrase isoenzymes CAI and CAII in semen, decidua, chorionic villi and various fetal tissues. *Early Human Development*, 51(3), 205–211.
- [40] Kavanagh JP (1985) Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid. *J Reprod Fertil* 75:35–4.
- [41] Fraire-Zamora JJ, Gonzalez-Martinez MT. Effect of intracellular pH on depolarization-evoked calcium influx in human sperm. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:C1688–C1696.
- [42] Lishko, P. V, & Kirichok, Y. (2010). The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *The Journal of Physiology*, 588, 4667–4672.
- [43] Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A. L., Romero, F., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(3), 1149–1158.
- [44] Chávez, J. C., Ferreira, J. J., Butler, A., De La Vega Beltrán, J. L., Treviño, C. L., Darszon, A., ... Santi, C. M. (2014). SLO3 K⁺ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 289(46).
- [45] Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Toshimori, K., & Okabe, M. (2001). Alkalinization of Acrosome Measured by GFP as a pH Indicator and Its Relation to Sperm Capacitation. *Developmental Biology*, 237(1), 222–231.
- [46] Meizel, S., & Deamer, D. W. (1978). The pH of the hamster sperm acrosome. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 26(2), 98–105.
- [47] Working, P. K., & Meizel, S. (1981). Evidence that an ATPase functions in the maintenance of the acidic pH of the hamster sperm acrosome. *Journal of Biological Chemistry*, 256(10), 4708–4711.

- [48] Working, P. K., & Meizel, S. (1983). Correlation of increased intraacrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. *Journal of Experimental Zoology*, 227(1), 97–107.
- [49] Xu, H., & Ren, D. (2015). Lysosomal Physiology. *Annual Review of Physiology*, 77, 57–80.
- [50] Yamagata, K., Murayama, K., Okabe, M., Toshimori, K., Nakanishi, T., Kashiwabara, S.-I., and Baba, T. (1998). Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* 273, 10470–10474.
- [51] Chávez, J. C., De la Vega-Beltrán, J. L., José, O., Torres, P., Nishigaki, T., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2017). Acrosomal alkalization triggers Ca²⁺ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology*.
- [52] World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*, Fifth Edit. Switzerland: WHO Press.
- [53] Mata-Martínez, E., José, O., Torres-Rodríguez, P., Solís-López, A., Sánchez-Tusie, A. A., Sánchez-Guevara, Y., ... Treviño, C. L. (2013). Measuring Intracellular Ca²⁺ Changes in Human Sperm using Four Techniques: Conventional Fluorometry, Stopped Flow Fluorometry, Flow Cytometry and Single Cell Imaging. *Journal of Visualized Experiments*, (75), 1–12.
- [54] Sánchez-Cárdenas, C., Servin-Vences, M. R., José, O., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A., & Darszon, A. (2014). Acrosome Reaction and Ca²⁺ Imaging in Single Human Spermatozoa: New Regulatory Roles of [Ca²⁺]_i. *Biology of Reproduction*, 91(August), 1–21.
- [55] Nishigaki T, Wood CD, Shiba K, Baba SA & Darszon A. (2006). Stroboscopic illumination using light-emitting diodes reduces phototoxicity in fluorescence cell imaging. *Biotechniques* 41 191–197.

- [56] Parinaud J, Labal B & Vieitez G 1992 High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect. *Fertility and Sterility* 58: 599–602.
- [57] Roldan, E. R., Murase, T., and Shi, Q. X. (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266, 1578–1581.
- [58] Cross, N. L., & Razy-Faulkner, P. (1997). Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biology of Reproduction*, 56(5), 1169–1174.
- [59] Aitken, R. J., Harkiss, D., Knox, W., Paterson, M., & Irvine, S. (1998). On the cellular mechanisms by which the bicarbonate ion mediates the extragenomic action of progesterone on human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 58(1), 186–196.
- [60] Shi Q-X & Roldan ERS. (1995). Bicarbonate/CO₂ is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biol Reprod*; 52:540–546.
- [61] Sabeur K. & Meizel S. (1995). Importance of bicarbonate to the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction. *J Androl*, 16:266–271.

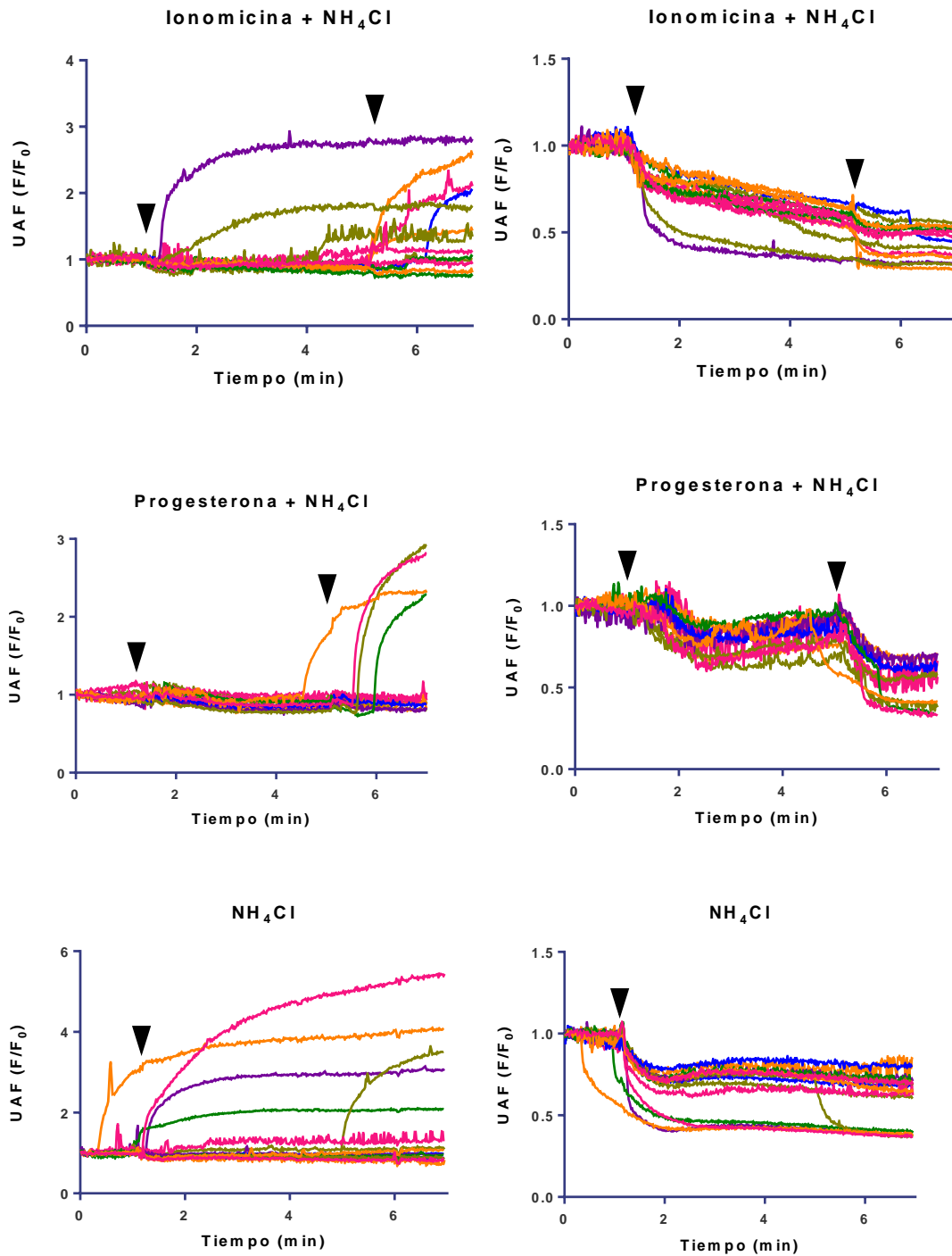
V. Apéndice

1. Detección de la RA mediante FM 4-64 y monitoreo del pHacr mediante LS Green.



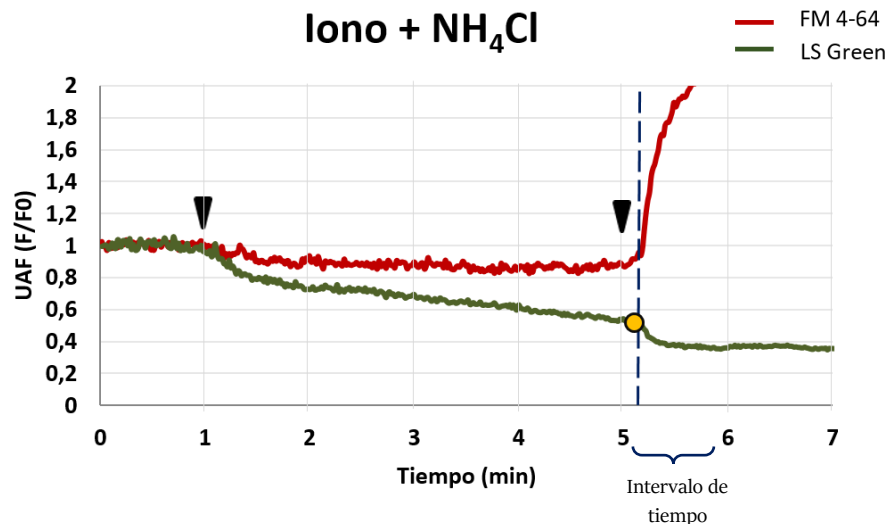
- Imágenes de espermatozoides de humano en microscopía de epifluorescencia. La tinción con FM 4-64 delimita la membrana de los espermatozoides (izquierda) y el incremento de la fluorescencia revela la progresión de la RA (derecha) para registrar la RA.
- Alternadamente, obtuvimos los registros de la fluorescencia de LS Green, seleccionando la región acrosomal de los espermatozoides.
- Las gráficas corresponden a la señal fluorescente de ambos colorantes en una célula que experimentó RA (izquierda) y otra que no (derecha).

2. Registros de pHacr y RA en espermatozoides individuales de humano.



Trazos individuales de RA y pHacr que corresponden al registro de la fluorescencia de FM 4-64 (derecha) y LS Green (izquierda), representados con el mismo color, en cada una de las condiciones expuestas. Los trazos por cada condición pertenecen a un experimento representativo, las puntas de flecha indican el momento de la adición correspondiente.

3. Determinación del pH_{Ac} durante la inducción de la RA.



Ejemplo de trazos de fluorescencia de LS Green y FM 4-64 de una célula inducida a la RA con Ionomicina+NH₄Cl. Se obtuvo el valor mínimo de la fluorescencia de LS Green (círculo amarillo), justo antes del incremento de la fluorescencia de FM 4-64, para analizar el comportamiento del pH_{Ac} de los espermatozoides reaccionados. Finalmente, los espermatozoides se agruparon de acuerdo con el intervalo de tiempo en que reaccionaron.