



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Instituto de Biotecnología**

**El papel del pH intracelular en el proceso de capacitación  
del espermatozoide humano**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Doctor en Ciencias**

**PRESENTA:**

**José Arturo Matamoros Volante**

**TUTOR PRINCIPAL**

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

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra. Lorraine Elizabeth Jaimes Hoy  
(Instituto de Biotecnología, UNAM)**

**Dra. Mayel Chirinos Espín**

**(Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán)**

**Cuernavaca, Morelos a 02 de noviembre de 2022**



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.

## Financiamiento

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

Beca de manutención por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), No. de CVU: 700334.

Apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) para la asistencia a congresos internacionales.

Se recibió financiamiento de parte de DGAPA/UNAM (**IN207122** para Claudia Treviño).

## Agradecimientos

A mi tutora y amiga, la Dra. **Claudia Lydia Treviño Santa Cruz** por todo su apoyo a lo largo de estos años. Tus conocimientos, guía y consejos son un pilar fundamental de mi formación.

A los académicos del consorcio de fisiología del espermatozoide: Dr. **Alberto Darszon**, Dr. **Takuya Nishigaki**, Dra. **Carmen Beltrán**, Dr. **Julio Cesar Chávez**, y Dr. **Ignacio López**, por sus conocimientos, apoyo y retroalimentación. También agradezco la asesoría técnica de la M.C. **Paulina Torres Rodríguez**, el Biol. **José Luis de la Vega Beltrán** y la M.C. **Yoloxochitl Sánchez Guevara** por su invaluable participación en múltiples aspectos claves para la realización del proyecto. De igual manera a todos mis compañeros y amigos miembros del laboratorio, cuya compañía, retroalimentación y apoyo fueron esenciales a lo largo de estos años.

A la Dra. **Mayel Chirinos Espín** y la Dra. **Lorraine Jaimes Hoy**, miembros de mi comité tutorial, por ser parte fundamental durante estos dos años, los consejos recibidos se ven reflejados en la calidad del trabajo.

A los miembros de mi comité revisor, Dr. **Arturo Hernández Cruz**, Dr. **León Islas Suarez**, Dr. **Enrique Othón Hernández González**, Dr. **Luis Cárdenas Torres**, Dra. **Denhi Schnabel Peraza** por sus valiosos comentarios y aportaciones a este proyecto.

A la invaluable cooperación y colaboración con la clínica de reproducción asistida CITMER, especialmente a su director, el Biol. **Israel Maldonado Lagunas** y a la Biol. **Liliana Ramírez Domínguez** por haberme permitido trabajar en sus instalaciones y las facilidades para el uso de equipo especializado, así como el acceso a muestras biológicas

A la Lic. **Mariana Olivares Urbano** por todos sus consejos, guías y discusión que me permitieron mejorar y crecer, tanto a nivel académico como personal.

A la asesoría técnica de los miembros del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LMNA, UNAM): el M.C. **Andrés Saralegui Amaro**, el Dr. **Jaime Arturo Pimentel Cabrera**, y el Dr. **Adán Guerrero Cárdenas**. Por su excepcional ayuda y disposición para la utilización de los equipos de microscopía que fueron cruciales para el desarrollo del trabajo.

A la B.A. Dip. Lib. A.L.A. **Shirley Ainsworth** por su invaluable labor y asesoría en servicios bibliotecarios, así como a los miembros del Servicio de Computo del Instituto de Biotecnología, UNAM: al M.C. **Arturo Ocadiz Ramírez**, al M.E.M. **David Santiago Castañeda Carreón**, al M. en TI. **Juan Manuel Hurtado Ramírez** y al Ing. **Roberto Pablo Rodríguez Bahena** por su ayuda en el mantenimiento de los servicios computacionales requeridos en las labores diarias.



## **Dedicatoria**

A mis padres que siempre han sido mi motor y mi apoyo, mi madre una mujer admirable, y mi padre, un hombre maravilloso.

A mi pareja, Mariana, por recorrer este camino conmigo y nunca dejarme solo.

Con amor

Arturo



## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN .....  | 5  |
| ABSTRACT.....  | 6  |
| RESUMEN GRÁFICO/GRAPHICAL ABSTRACT .....   | 7  |
| INTRODUCCIÓN .....   | 8  |
| El espermatozoide: una célula compleja con una tarea complicada .....  | 8  |
| La capacitación espermática .....  | 10 |
| Importancia del pH intracelular en el proceso de capacitación espermática .....  | 11 |
| Regulación temporal del pHi durante la capacitación .....  | 11 |
| Regulación a nivel molecular del pH intracelular durante la capacitación espermática .....   | 12 |
| Papel de los transportadores y canales de $\text{HCO}_3^-$ en la regulación del pHi .....  | 12 |
| Rol de las proteínas acarreadoras de $\text{H}^+$ en el control del pHi .....  | 13 |
| Polarización de la expresión de las proteínas involucradas en la regulación del pHi durante la capacitación.....   | 14 |
| HIPÓTESIS.....   | 17 |
| OBJETIVOS.....   | 17 |
| RESULTADOS .....   | 18 |
| Análisis de los cambios de pHi durante la capacitación de espermatozoides humanos .....  | 18 |
| Medición regionalizada de los cambios de pHi en espermatozoides humanos .....  | 18 |
| La alcalinización del pHi asociada a la capacitación ocurre en la cabeza y la pieza principal, pero aparentemente no en la pieza media de los espermatozoides humanos.....   | 19 |
| Determinación cuantitativa de los cambios de pHi durante la capacitación de espermatozoides humanos .....  | 23 |
| La alcalinización asociada a la capacitación ocurre con mayor frecuencia en muestras de espermatozoides de hombres fértiles .....  | 23 |
| Mecanismos moleculares que controlan la alcalinización intracelular asociada a la capacitación espermática...25  |    |
| Importancia del influjo del anión $\text{HCO}_3^-$ en la regulación del pHi de espermatozoides humanos.....  | 25 |
| El canal CFTR y el cotransportador NBC tienen un rol menor en el control del pHi durante la capacitación .....   | 27 |
| Participación de la vía $\text{HCO}_3^-/\text{sAC}/\text{AMPC}/\text{PKA}$ en la regulación regionalizada del pHi durante la capacitación de espermatozoides humanos .....   | 29 |
| El canal Hv1 como el principal efector de los cambios de pHi en la pieza principal .....   | 32 |
| Participación de las cinasas PYK2, FERT y PKC como posibles intermediarios entre PKA y Hv1.....  | 35 |
| Posible papel de la acetilación de lisinas como un mecanismo de regulación del pHi .....   | 38 |
| Participación de las proteínas de control del pHi en la regulación de la movilidad hiperactivada .....   | 42 |
| DISCUSIÓN.....   | 44 |
| El pHi durante la capacitación y su regulación espaciotemporal .....   | 44 |
| Regulación a nivel molecular del pHi en los espermatozoides humanos .....  | 46 |
| El influjo de $\text{HCO}_3^-$ es necesario para que ocurra la alcalinización del del pHi durante la capacitación: rol de los cotransportadores de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC), y del canal de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (CFTR)..... | 46 |
| Posible rol de la albúmina en el incremento de pHi asociado a la capacitación .....  | 49 |
| Más allá de su naturaleza iónica, el $\text{HCO}_3^-$ es fundamental en la regulación del pHi.....   | 49 |
| El rol del canal Hv1 en el control del pHi intracelular en espermatozoides humanos.....  | 51 |
| Regulación del canal Hv1 mediante modificaciones postraduccionales: fosforilación mediada por las cinasas FER, PYK2 y PKC.....   | 52 |
| Regulación del canal Hv1 mediante modificaciones postraduccionales: rol de la acetilación de lisinas .....   | 54 |
| El pHi alcalino es necesario para que ocurra la hiperactivación.....   | 54 |
| CONCLUSIÓN .....   | 56 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....  | 57 |
| FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....  | 64 |
| PRODUCTIVIDAD .....  | 69 |
| REFERENCIAS.....   | 71 |



## RESUMEN

Durante su tránsito por el tracto genital femenino, los espermatozoides humanos sufren un conjunto de cambios bioquímicos y fisiológicos que resultan indispensables para que puedan llevar a cabo la fecundación. Al conjunto de estos cambios se les conoce colectivamente como capacitación espermática. Entre los múltiples cambios que tienen lugar durante este proceso, la alcalinización del pH intracelular (pHi) es uno de los más relevantes, ya que permite la regulación de proteínas fundamentales para la fecundación. No obstante, aún se desconocen muchos aspectos relacionados con los mecanismos de control del pHi durante la capacitación. En este trabajo se realizó un estudio detallado a nivel descriptivo de cómo ocurre el aumento del pHi asociado a la capacitación. Entre las observaciones más relevantes se encontró que la alcalinización ocurre con una cinética particular durante el tiempo que transcurre la capacitación, y que el aumento en el pHi ocurre de manera diferencial entre las distintas regiones morfológicas del espermatozoide. Adicionalmente, se realizaron estudios que permitieron elucidar, a nivel molecular, cómo se regulan estos cambios de pHi. Se encontró que es necesario que ocurra un influjo de  $\text{HCO}_3^-$  para que ocurra el aumento del pHi. A través del uso de herramientas farmacológicas se identificó que el canal de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ , CFTR, y los cotransportadores de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ , NBC, son parcialmente responsables del influjo de dicho anión, no obstante, no se descarta la posibilidad de que otras proteínas aún no identificadas también estén involucradas en este proceso. Por otro lado, se encontró que la inhibición farmacológica de la adenilil ciclasa soluble (sAC) dependiente de  $\text{HCO}_3^-$  previene el aumento de pHi en el flagelo del espermatozoide, pero no así de la cabeza. De manera similar, la inhibición de la cinasa activada por AMPc (PKA) generó un efecto regionalizado en el flagelo. Asimismo, se encontró que la inhibición de proteínas de señalización relacionadas con PKA, incluidas las cinasas FERT, PYK2 y PKC, así como de acetiltransferasas aún no identificadas, también previnieron la alcalinización asociada a la capacitación, pero exclusivamente en la región del flagelo. Adicionalmente, se encontró que al tratar a los espermatozoides con antagonistas específicos del canal de  $\text{H}^+$ , Hv1, no ocurrió el aumento del pHi en el flagelo, pero sí en la cabeza. De manera interesante, la localización intracelular de las proteínas previamente descritas correlaciona con el efecto observado en la inhibición del aumento del pHi en el flagelo, esto sugiere que, durante la capacitación, el pHi se regula de manera diferencial en la cabeza y el flagelo. Por último, el bloqueo farmacológico de algunas de las proteínas antes mencionadas previno, en diferentes magnitudes, el desarrollo de la movilidad hiperactivada, un tipo de batido flagelar que es fundamental para que ocurra la fusión con el ovocito. En conjunto, estos resultados proveen evidencia acerca de los complejos mecanismos de regulación del pHi, así mismo, resaltan su importancia en el proceso de capacitación.

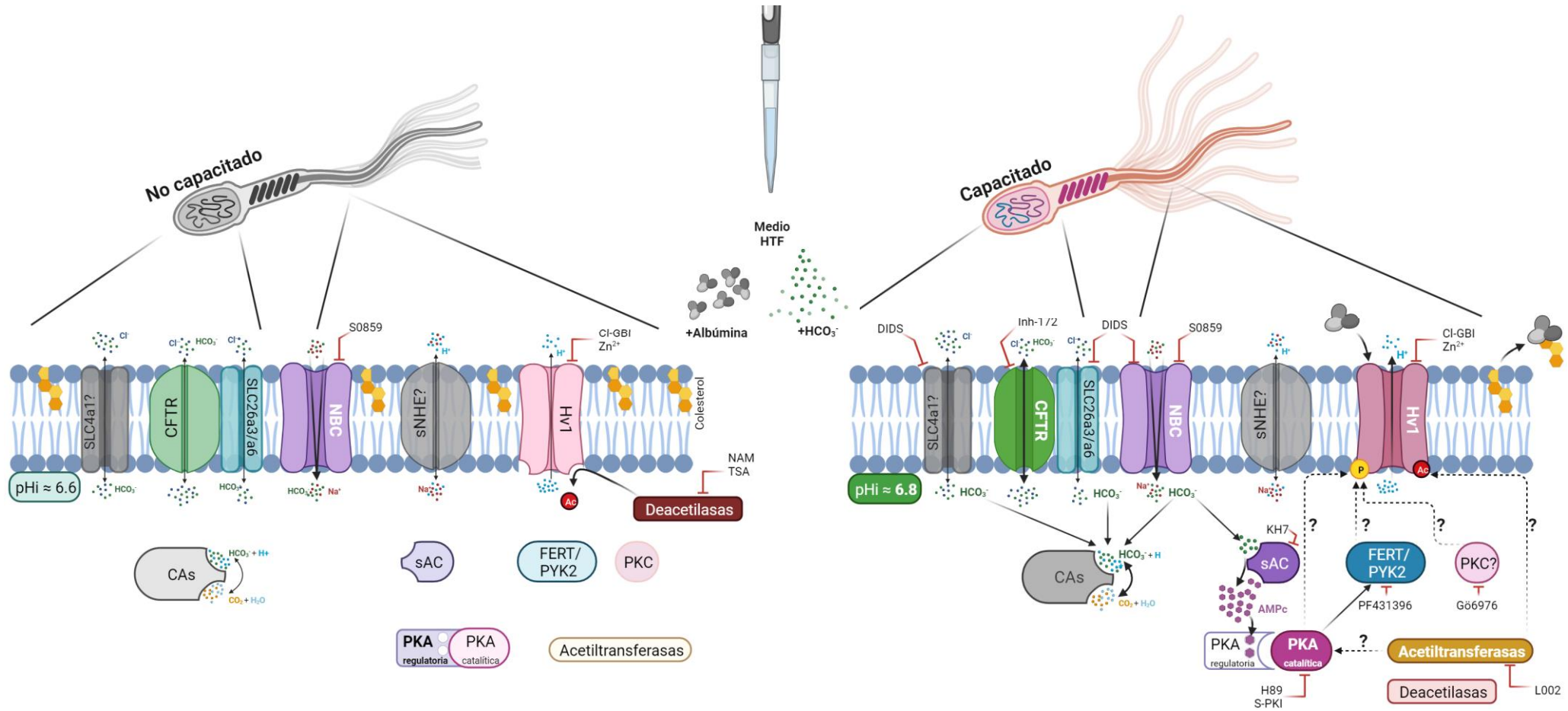


## ABSTRACT

The human sperm must reside for a period inside the female reproductive tract to obtain full fertilizing capabilities; during this time, they undergo biochemical and physiological modifications. Collectively these changes are known as the capacitation process. Among these, the increase in the intracellular pH (pHi) plays a pivotal role, since it regulates the activity of essential proteins required for fertilization. However, how the pHi is regulated during the human sperm capacitation is not completely understood. Here, we provide a detailed description of how the pHi changes during the capacitation process. For instance, we demonstrated that pHi increases with a particular behavior depending on the capacitation time, and this alkalization occurs differentially in the morphological regions of the sperm cell. Furthermore, we provided mechanistic insights into the molecular regulation of pHi during the capacitation. Herein we report that a  $\text{HCO}_3^-$  influx is required to trigger the capacitation-associated alkalization. Employing a pharmacological approach, we showed that the anionic channel related to cystic fibrosis, CFTR, and the  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  cotransporter, NBC, partially regulates the  $\text{HCO}_3^-$  influx, it is also likely that further unidentified proteins related to  $\text{HCO}_3^-$  movement across the plasma membrane are also involved in this process. In addition, the inhibition of the  $\text{HCO}_3^-$ -dependent soluble adenylyl cyclase (sAC), prevented the capacitation-associated pHi increase only in the sperm flagellum, but not in the head. Comparable results were obtained after the pharmacological inhibition of the cAMP-dependent protein kinase (PKA), and other PKA-related proteins such as the tyrosine kinases FERT and PYK2, the serine/threonine kinase PKC, and an unidentified acetyltransferase, as well as the blocking of the  $\text{H}^+$  channel, Hv1. Interestingly, this differential inhibition of the flagellar capacitation-associated pHi increase, correlates with the intracellular localization of those proteins, suggesting a complex mechanism of pHi regulation that involves not only different proteins, but also requires fine coordination at the spatial level. Finally, we demonstrated that the pharmacological blockade of those proteins inhibits the development of hyperactivated motility, a particular flagellar beating that plays a key role during fertilization. Altogether, these results provide invaluable insights regarding the complex process of sperm capacitation and opens the door to further investigation to elucidate as to how these changes and the signaling pathways related to pHi control, are regulated at the spatial level and their relevance to the fertilization process.



# RESUMEN GRÁFICO/GRAPHICAL ABSTRACT

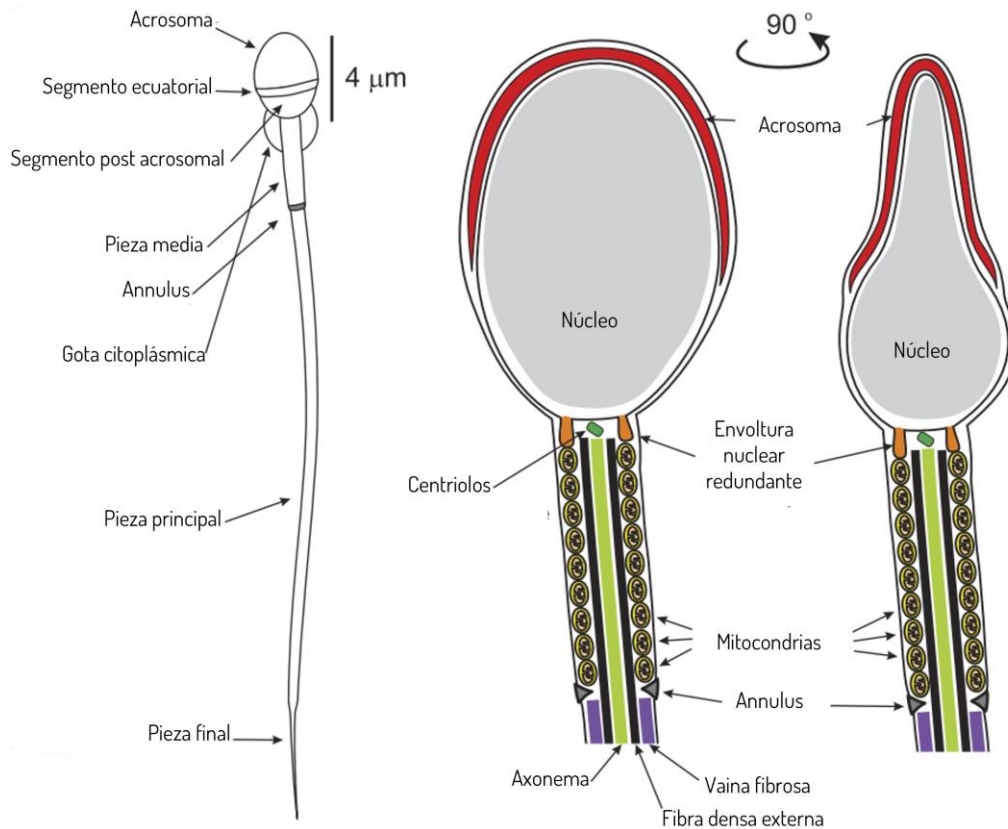




## INTRODUCCIÓN

### *El espermatozoide: una célula compleja con una tarea complicada*

Los espermatozoides son células particulares ya que son las únicas células en los mamíferos que se producen por un organismo, pero su función, tiene lugar en otro organismo completamente diferente. Los espermatozoides se producen por millones dentro de los testículos durante un proceso complejo conocido como espermatogénesis. Tras la meiosis, las células haploides resultantes denominadas espermátidas, sufren una serie de procesos de diferenciación en donde pierden gran parte de su contenido incluyendo sus organelos y la mayor parte del citoplasma. Al final de todos estos procesos, el espermatozoide adquiere su aspecto morfológico diferenciado, el cual podría parecer simple, ya que consta en el caso del espermatozoide humano, de una región semi ovalada denominada cabeza que contiene el núcleo con el ADN, a la cual se encuentra adosado un único flagelo que le brinda la capacidad de desplazamiento [1]. Sin embargo, cuando se realiza una observación minuciosa es posible vislumbrar su complejidad. En la [figura 1](#) se presenta una descripción detallada de la morfología de esta célula tan particular.



**Figura 1. Morfología del espermatozoide humano.** **Acrosoma.** Organelo membranoso único de los espermatozoides que contiene numerosas proteínas que resultan indispensables para la fusión con el ovulo, además de funcionar como un reservorio del ion  $\text{Ca}^{2+}$ . **Segmento ecuatorial y segmento post acrosomal.** Regiones que delimitan la parte media de la cabeza, justo hasta donde abarca el acrosoma, y la parte basal de la cabeza. Dentro de esta región se encuentra el **núcleo**, que contiene el material genético haploide altamente compactado debido a la sustitución de las histonas por protaminas. En la base del núcleo se localiza una estructura considerada como una reminiscencia de los procesos de diferenciación denominada **envoltura nuclear redundante**, la cual se postula que funciona como un reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$ . (continúa en la siguiente página).

Al final de los procesos de diferenciación y maduración en el tracto genital masculino, los espermatozoides están listos para ser liberados y depositados dentro del tracto genital femenino. Los espermatozoides recién eyaculados son células morfológicamente maduras que ya cuentan con prácticamente todo el arsenal de proteínas necesarias para llevar a cabo su función que es fecundar al ovulo. Si estos espermatozoides se colocan en contacto cercano con ovocitos maduros y se dejan el suficiente tiempo, los espermatozoides recién eyaculados ¡no podrán fecundar! Esta observación intrigó por mucho tiempo a los investigadores. Después de muchos años de cuestionamientos, en 1951, dos investigadores de manera independiente demostraron que para que los espermatozoides eyaculados puedan fecundar a los ovocitos, estos deberían de pasar cierto tiempo dentro del tracto genital femenino. Estos experimentos tan importantes en el campo de la reproducción demostraron que, los componentes del fluido del tracto genital femenino de manera individual o en su conjunto, generan cambios a nivel estructural y molecular en los espermatozoides que les van a proveer a estas células, la capacidad de fecundar [2,3].

Al conjunto de cambios morfológicos y moleculares que sufren los espermatozoides durante su tránsito dentro del tracto genital femenino que le van a conferir la capacidad de fecundar al ovocito se les conocen colectivamente como **capacitación espermática** [4]. El descubrimiento de este proceso en combinación con los avances en la fisiología del aparato reproductor femenino, sentaron las bases del avance científico y tecnológico que permitió que en 1978 ocurriera el nacimiento de la primera persona concebida mediante fecundación *in vitro* [5].

Tras 71 años del descubrimiento de la capacitación, se avanzó ampliamente en su entendimiento, sin embargo, muchos de los aspectos relacionados con su regulación a nivel molecular aún no se entienden por completo. En este trabajo se abordaron algunos de los aspectos desconocidos de este proceso, con el fin de generar evidencia científica sólida que permita tener un mejor entendimiento de este tan fundamental proceso biológico

---

**Figura 1. (continuación).** Situada en la frontera entre la cabeza y el flagelo, existe otra reminiscencia de la diferenciación llamada la **gota citoplasmática**. Aunque no es claro la funcionalidad exacta de esta estructura, se propone que puede participar en la regulación del volumen celular. En la zona de transición entre la cabeza y flagelo se localizan dos pares de **centriolos** que indican el nacimiento del axonema, una estructura proteica indispensable para generar el batido flagelar. Está formada por un arreglo de 9 pares de microtúbulos que rodean un par central (9+2). Este se extiende a lo largo del flagelo y está asociada a una serie de proteínas filamentosas llamadas las **fibras externas densas**. En la porción proximal del flagelo, denominada **pieza media**, estas fibras están rodeadas por las **mitocondrias**. Posteriormente, se encuentra una estructura proteica llamada **annulus** que delimita el fin de la pieza media. En seguida se encuentra la porción más larga de todo el flagelo denominada como **pieza principal**. En esta región, las fibras externas se encuentran rodeadas de otras estructuras proteicas reticulares conocidas como la **vaina fibrosa**, las cuales permiten estabilizar el movimiento flagelar. En la parte más distal del flagelo se encuentra la denominada **pieza final**, en donde el axonema solo se encuentra rodeado por la membrana plasmática. Modificado de [6]



## *La capacitación espermática*

Durante el complejo proceso de diferenciación que da lugar a los espermatozoides ocurre la hiper compactación de su material genético y la pérdida de ribosomas, lo que tiene como consecuencia que estas células sean prácticamente incapaces de llevar a cabo la transcripción y traducción, y, por tanto, de sintetizar nuevas proteínas. La manera en que los espermatozoides interpretan y responden al ambiente es a través de la modificación postraduccional del arsenal de proteínas que se sintetizaron durante su maduración, así como de la capacidad de generar cambios en las concentraciones de diferentes iones, gracias a la activación y/o inactivación de diferentes canales y transportadores iónicos [6–8]. Esto es sumamente importante para que puedan desplazarse y guiarse durante su trayecto por el tracto genital femenino.

Durante la capacitación ocurre un aumento en la concentración intracelular de iones como el  $\text{HCO}_3^-$  y el  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la concentración de otros como el  $\text{K}^+$ , el  $\text{Na}^+$  o los  $\text{H}^+$  tienden a disminuir [6–8]. Esto tiene como consecuencia que, entre otras cosas, el potencial eléctrico de la membrana plasmática de los espermatozoides se vuelva más hiperpolarizado [9], y que el pH intracelular (pHi) se torne más alcalino [10]. A su vez, estos cambios en las concentraciones iónicas causa la activación de enzimas de señalización que resultan clave para el adecuado funcionamiento del espermatozoide [11–14]. En conjunto, estos sistemas de señalización representan los mecanismos moleculares que controlan el adecuado funcionamiento de estas células, por lo que resultan fundamentales para el proceso de fecundación.

A nivel funcional, los procesos moleculares que tienen lugar durante la capacitación permiten que los espermatozoides puedan llevar a cabo dos fenómenos indispensables para la fecundación, la hiperactivación y la exocitosis acrosomal. El primero hace referencia a un tipo especial de batido flagelar caracterizado por ser asimétrico y de gran amplitud. Esto permite al espermatozoide, entre otras cosas, desanclarse de las células epiteliales del oviducto, atravesar las capas celulares y proteicas que rodean al ovocito, y finalmente, fusionarse con él [15,16]. El otro fenómeno dependiente la capacitación, es un proceso de exocitosis único que culmina con la liberación del contenido del acrosoma. Este proceso libera enzimas que resultan relevantes para atravesar las capas que rodean al ovocito, y al mismo tiempo, permite exponer una nueva membrana que contiene a las proteínas necesarias para el reconocimiento especie-específico del ovocito, así como proteínas fundamentales para promover la fusión con este [17–19].

Dentro de la diversidad de procesos moleculares que tienen lugar durante el proceso de capacitación, la regulación del pHi ha demostrado ser un elemento fundamental que controla muchos aspectos de este proceso, incluyendo la regulación de la hiperactivación. Por esta razón en este trabajo, se abordaron de manera documental y experimental algunos de los aspectos relacionados con la regulación a nivel molecular, así como de la relevancia fisiológica del pHi en el proceso de capacitación espermática.



### *Importancia del pH intracelular en el proceso de capacitación espermática*

A nivel molecular, un pH<sub>i</sub> alcalino es una señal que regula la actividad de proteínas fundamentales para el funcionamiento adecuado del espermatozoides y por tanto de la fecundación [10]. Entre estas destaca el canal de Ca<sup>2+</sup> específico del espermatozoide, CatSper. Este canal es uno de los principales mecanismos de regulación del Ca<sup>2+</sup> intracelular, un ion fundamental para la movilidad de los espermatozoides. El pH<sub>i</sub> alcalino es una de las señales que propician un aumento en la actividad de este canal [20]. De igual manera, otro canal específico del espermatozoide, el canal de K<sup>+</sup> conocido como SLO3 también aumenta su actividad con un estímulo de alcalinización. Se propone que este canal es responsable de generar la hiperpolarización de la membrana plasmática asociada a la capacitación [21,22]. Interesantemente, la presencia de mutaciones que afecten el funcionamiento de estos dos canales es causa de infertilidad masculina tanto en ratones como en humanos [23,24]. Por otro lado, un pH<sub>i</sub> alcalino es necesario para controlar la actividad de las ATPasas llamadas dineínas. Estas enzimas hidrolizan ATP para producir curvaturas en el axonema lo que genera el batido flagelar [25,26]. Asimismo, un ambiente alcalino se requiere para el funcionamiento adecuado de enzimas glucolíticas que permiten proveer la energía necesaria para el espermatozoide [27,28]. Trabajos previos realizados por nuestro grupo de trabajo describieron que el pH del acrosoma también se alcaliniza durante la capacitación, una paso relevante para que ocurra la exocitosis de su contenido [29,30].

### *Regulación temporal del pH<sub>i</sub> durante la capacitación*

Es importante mencionar que la capacitación es un proceso dinámico que ocurre en una escala temporal variable que entre otras cosas depende de la especie [31]. Algunos de los eventos moleculares asociados a la capacitación ocurren en una escala temporal de minutos, mientras que otros pueden suceden solamente después de varias horas de incubación en un medio que promueva la capacitación [32]. No obstante, no existe evidencia de la temporalidad de los cambios en el pH<sub>i</sub> durante la capacitación. En ese sentido, se reportó que el pH<sub>i</sub> de los espermatozoides aumenta aproximadamente 0.2 unidades cuando estos se incuban durante 24 h en un medio que promueve el proceso de capacitación *in vitro* en comparación de células incubadas en un medio que no induce dicho proceso [33]. Hasta el momento, no se cuenta con información que describa si este aumento en el pH<sub>i</sub> ocurre solamente en espermatozoides capacitados durante varias horas, o bien, es un fenómeno que ocurre en intervalos de tiempo más cortos. Desde una perspectiva molecular, la actividad de las proteínas puede producir cambios en el pH<sub>i</sub> en una escala de tiempo de segundos o minutos, por lo que es posible que el proceso de alcalinización sea un evento temprano en la capacitación. Si la actividad de estas proteínas se mantiene durante periodos más largo, es posible que esto favorezca que el pH<sub>i</sub> permanezca alcalino. Debido a que se desconoce la cinética de los cambios de pH<sub>i</sub> durante la capacitación de los espermatozoides humanos, uno de los objetivos principales del presente trabajo consistió en investigar la temporalidad de los cambios en el pH<sub>i</sub> asociados a la capacitación del espermatozoide.



## Regulación a nivel molecular del pH intracelular durante la capacitación espermática

### Papel de los transportadores y canales de $\text{HCO}_3^-$ en la regulación del pHi

Los cambios en la concentración intracelular de  $\text{HCO}_3^-$  pueden causar variaciones en el pHi debido al equilibrio de la reacción reversible  $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ . Esta reacción se da de forma espontánea, aunque en las células existen enzimas denominadas anhidrasas carbónicas (CAs por sus siglas en inglés) que pueden acelerar esta reacción. Por esta razón, variaciones en las concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  tendrían un efecto en el pHi. Estas variaciones pueden ocasionarse por la acción de proteínas transportadores de este anión, o bien, por cambios en la concentración del  $\text{CO}_2$  el cual puede difundir libremente por la membrana plasmática [34,35].

Para el caso de las anhidrasas carbónicas, se reportó la expresión de algunas de ellas en espermatozoides de humano y ratón, incluidas la CAI [36,37], la Call [37–39], la CAIV [40], la CAXII [41], y la CAXIII [42]. Se observó que el uso de bloqueadores generales contra estas enzimas generan efectos negativos en la movilidad en espermatozoides humanos y de ratón [37]. No obstante, su contribución en la regulación del pHi aun es desconocido.

En los espermatozoides de mamíferos existe una variedad de proteínas relacionadas con el transporte de  $\text{HCO}_3^-$ . Entre éstas se encuentran miembros de las familias de transportadores de solutos<sup>1</sup> SLC26 [35,43–45], SLC4 y SLC22 [46–48]. En espermatozoides humanos y de ratón se reportó la expresión de varios miembros de la familia SLC26, incluidos el A3, el A6 y el A8 [43,44,49–51]. De manera interesante, se demostró que la inhibición farmacológica del SLC26A3 y el SLC16A6 produce una acidificación del citoplasma en espermatozoides de ratón [43] y de humano [49]. Aunque se desconoce si el SLC26A8 participa en la regulación del pHi, se sabe que hombres con mutaciones en el gen que codifica para esta proteína presentan un fenotipo de astenozoospermia<sup>2</sup> [51]. De igual manera, mutaciones de pérdida de función en el gen de SLC26A3 producen oligoastenoteratozoospermia<sup>3</sup> en hombres [50,52]. Para el caso del SLC26A6, no existen reportes de mutaciones que tengan un efecto negativo a nivel reproductivo.

Por otro lado, existe evidencia experimental que indica que tanto en espermatozoides de ratón [47] como de humano [48], existe un mecanismo de transporte electrogénico de  $\text{HCO}_3^-$  que depende del gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$ . Dada la naturaleza de esta proteína se propuso que se trata de un transportador de  $\text{HCO}_3^-$  dependiente de  $\text{Na}^+$  de la familia SLC4, conocidos como NBC (por sus siglas en inglés *Sodium- $\text{Na}^+$ /Bicarbonate Cotransporter*). Aunque se desconoce la identidad molecular precisa del NBC en los espermatozoides de mamífero, se sabe que debe ser uno cuyo mecanismo de cotransporte de  $\text{HCO}_3^-$  y de  $\text{Na}^+$

---

<sup>1</sup>Abreviados en adelante SLC por sus siglas en inglés (*Solute Carrier Transporters*)

<sup>2</sup>De acuerdo con el manual de la OMS para la evaluación del semen, la astenozoospermia se caracteriza por espermatozoides de baja movilidad [76].

<sup>3</sup>Condición que se caracteriza por tener bajo conteo de espermatozoide que además poseen baja movilidad, y una elevada tasa de anomalías morfológicas [76].



sea de naturaleza electrogénica [47,48]. Solamente dos miembros de la familia SLC4 cuentan con esta particularidad, el SLC4a4 y el SLC4a5 también conocidos como NBCe1 y NBCe2, respectivamente [53]. Debido a que no es posible corroborar o descartar la presencia de uno u otro transportador en los espermatozoides de mamíferos, en adelante se referirá a estas proteínas como los NBC. El efecto de la incubación con antagonista de estas proteínas impide que ocurra la hiperpolarización de la membrana plasmática inducida por la capacitación en espermatozoides humanos [48], sin embargo, no existen reportes en donde se haya estudiado el papel de este tipo de proteínas en la regulación del pHi en espermatozoides de mamífero. Por otro lado, se detectó la presencia de otro miembro de esta familia SLC4, el SLC4a1 [54], conocido como el intercambiador aniónico 1 o AE1 por sus siglas en inglés. El SLC4a1 tiene la capacidad de transportar  $\text{HCO}_3^-$  al interior celular, pero a diferencia de los NBC, este lo hace a través del intercambio por  $\text{Cl}^-$  [55]. Hasta la fecha se desconoce el rol del AE1 en el proceso de capacitación o su relevancia en la fecundación.

Recientemente, se encontró que los espermatozoides de ratón expresan al transportador aniónico SLC22a4, el cual está asociado al influjo de  $\text{HCO}_3^-$  y el control del pHi durante la capacitación. De manera interesante, este transportador se expresa únicamente en los testículos, y los ratones que carecen de esta proteína son infértiles [56,57]. Hasta el momento se desconoce si esta proteína se expresa en espermatozoides humanos.

Otra proteína cuya función está relacionada con el flujo de  $\text{HCO}_3^-$  al interior celular, es el canal aniónico CFTR (por sus siglas en inglés *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) [58–60]. La inhibición de este canal produce defectos en la función normal del espermatozoide incluido la regulación del pHi [43,58,59], y mutaciones en el gen que lo codifica están asociadas a una disminución de la capacidad de fecundar de los espermatozoides humanos [60].

#### Rol de las proteínas acarreadoras de $\text{H}^+$ en el control del pHi

Además de las proteínas que están relacionadas con el transporte de  $\text{HCO}_3^-$ , existen otro tipo de proteínas cuya función podría ser parte importante de los mecanismos de regulación del pHi en espermatozoides humanos. Este grupo de proteínas engloba aquellas con capacidad de transportar  $\text{H}^+$  hacia el exterior celular.

Entre estas proteínas se encuentran ciertos integrantes de la familia SLC9, cuya función es intercambiar  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$  de una manera electroneutra. Debido a su actividad, son también conocidos como NHE (por sus siglas en inglés *Sodium- $\text{Na}^+$ /Proton- $\text{H}^+$  Exchanger*) [61–63]. Dentro de los miembros de esta familia, se encuentra el NHE específico del espermatozoide (conocido como sNHE). Esta proteína es esencial para la regulación del pHi en espermatozoides de ratón y su ausencia causa infertilidad en ratones macho [62]. Existe evidencia que otros miembros de esta familia de expresión somática como el NHA1 o el NHA2 también se expresan en espermatozoides de ratón, y solamente cuando ambas proteínas se encuentran ausentes se produce infertilidad masculina en ratones [61]. Recientemente se demostró que el sNHE se expresa también en espermatozoides de



humano, aunque no se ha corroborado su papel en la regulación del pHi, se reportó que mutaciones de pérdida de función generan infertilidad debido a un severo caso de astenozoospermia [63].

Por otro lado, se encontró que en espermatozoides humanos se expresa el canal de H<sup>+</sup> conocido como Hv1 [64,65]. Este canal se inhibe por Zn<sup>2+</sup>, el cual es un elemento que se encuentra en concentraciones de alrededor de 10 mM en el epidídimo y en el plasma seminal. A estas concentraciones el canal se encontraría totalmente bloqueado. Solamente cuando el espermatozoide se deposita dentro del tracto genital femenino, en donde la concentración de Zn<sup>2+</sup> se encuentra en el rango μM [66], el canal se liberaría de su bloqueo y permitiría la salida de H<sup>+</sup> al espacio extracelular provocando una alcalinización intracelular [64]. Adicionalmente, se sabe que la actividad de este canal aumenta durante capacitación [64]. Por todas estas características, se reconoce que el canal Hv1 es el principal regulador del pHi en los espermatozoides humanos [67].

#### Polarización de la expresión de las proteínas involucradas en la regulación del pHi durante la capacitación

En las secciones anteriores se describió cómo las proteínas con posible participación en la regulación del pHi se clasifican en aquellas relacionadas con el transporte y metabolismo del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, y en proteínas que liberan H<sup>+</sup> al espacio extracelular. Una observación interesante consiste en que la regulación de la alcalinización está asociada a la capacitación que emerge de los análisis de la localización subcelular de estas proteínas.

En este sentido, se describió que el transportador SLC26A3 se localiza en la cabeza de los espermatozoides de cobayo [45], mientras que en espermatozoides de ratón y de humano se localiza en la pieza media [43,49]. De manera similar, el SLC26A6 se encontró en la pieza media de los espermatozoides de humano [49]. De manea interesante, estos dos transportadores se detectaron en la pieza principal de espermatozoides humanos pero no de ratones [43,49]. Se sabe que estos transportadores interactúan física y funcionalmente con el canal CFTR. Dicha interacción se demostró previamente en los espermatozoides de ratón, sin embargo, aunque el canal se ha detectado en la cabeza [58], esta interacción solo se observó en la pieza media [43]. Por otro lado, en espermatozoides humanos se encontró que el CFTR se expresa en la región de la cabeza y también en la pieza media [58,60,68,69]. Asimismo, se encontró que el transportador SLC22a4 se localiza en la región de la pieza principal de los espermatozoides de ratón [56]. Con respecto a las enzimas CAs se identificó que, en espermatozoides humanos, la CAI, CAII y CAXIII se localizan en la pieza media [37,38]. Por último, en relación a la expresión de las proteínas de la familia SLC4, se encontró que el SLC4A1 se localiza exclusivamente en la cabeza [54]. Como se mencionó anteriormente, se desconoce la identidad del o los NBC presentes en los espermatozoides de mamíferos, por tanto, tampoco se tiene información acerca de su localización subcelular.

En relación al grupo de proteínas cuya función es la extrusión de H<sup>+</sup> al espacio extracelular, se determinó que su localización subcelular está restringida exclusivamente a la pieza principal del flagelo, esto incluye al canal Hv1 (en espermatozoides humanos) [64,65], el sNHE en humano [63] y en ratón [62], así como los NHA1 y NHA2 en ratón [61].



Como se ha mencionado anteriormente, mucho del conocimiento que se tiene sobre estas proteínas, deriva de investigaciones en modelos animales, no obstante, cada vez existe mayor evidencia experimental que indica que existe una heterogeneidad, no solo en las proteínas que regulan los procesos asociados a la capacitación sino también en los mecanismos de regulación de las mismas [ver referencias [70](#) y [71](#)]. Por esta razón, en la [figura 2](#) se ilustran las proteínas con posible participación en el control del pHi que se han reportado únicamente en los espermatozoides humanos haciendo especial énfasis en su localización subcelular.

Esta heterogeneidad en cuanto a la localización subcelular para el conjunto de proteínas que podrían participar en la regulación del pHi, sugiere que posiblemente los mecanismos de regulación del pHi en el espermatozoide son más que complejos, y que probablemente depende de la actividad coordinada de diversas proteínas. Al mismo tiempo esto sugiere que posiblemente los cambios en el pHi asociados a capacitación ocurren de tal manera que coinciden de manera total o parcial con la distribución subcelular de las proteínas que los regulan y finalmente podría considerarse que los requerimientos del pHi en los diferentes compartimentos de la estructura del espermatozoide pueden ser regulados diferencialmente.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo pretenden proveer de nueva información que ayude al entendimiento de este fenómeno tan complejo. Esto es particularmente relevante ya que se propone que la alcalinización intracelular es un marcador molecular del proceso de capacitación [[10,72](#)], aunque aún se desconocen los aspectos tan básicos como su regulación a nivel temporal y regional.





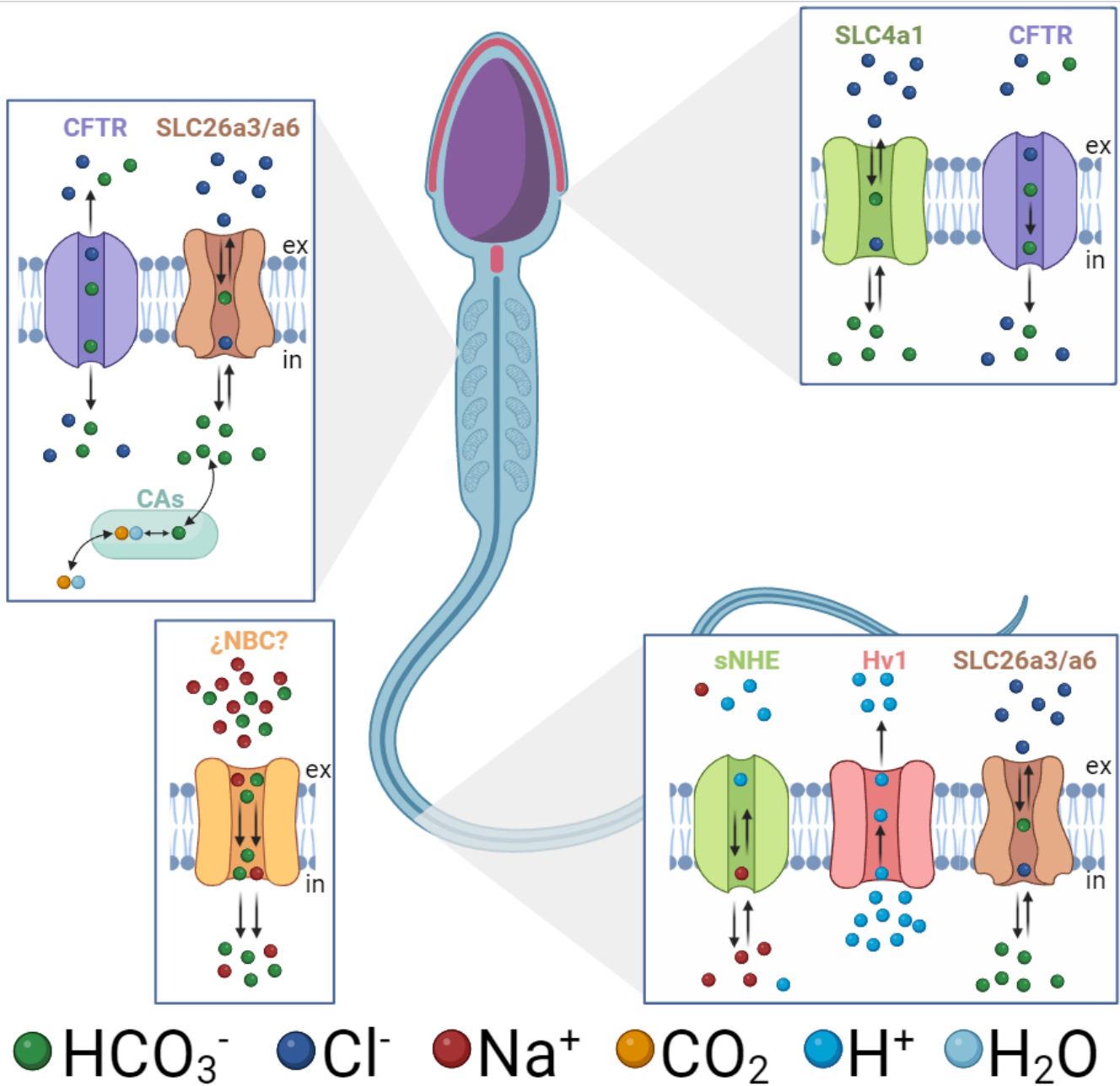


Figura 2. Localización polarizada de los transportadores iónicos posiblemente involucrados en la regulación del pHi. **Cabeza.** En esta región se encontró la presencia del canal permeable a  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  **CFTR**, y del intercambiador de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  **SLC4A1**. **Pieza media.** En esta región se localizó al canal **CFTR**, y los transportadores de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  **SLC26A3** y **SLC26A6**. También se encontró que las **anhidrasas carbónicas I, II y XIII** se localizan en esta región. **Pieza principal.** En esta zona se detectó la expresión del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  específico del espermatozoide (**sNHE**) y del canal de  $\text{H}^+$  **Hv1**. Hasta el momento se desconoce la localización del cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (**NBC**).



## HIPÓTESIS

El proceso de **alcalinización asociada** a la capacitación de los espermatozoides humanos ocurre de manera diferencial en el tiempo y en el espacio, así mismo, su regulación depende de la participación de múltiples proteínas cuyo efecto en el **pHi** depende de manera total o parcial con su localización subcelular. El bloquear farmacológicamente a estas proteínas, impedirá que el **pHi** aumente, lo que tendrá consecuencias a nivel fisiológico, como la inhibición del desarrollo de la movilidad hiperactivada.

## OBJETIVOS

### General

Estudiar la regulación e importancia del **pHi** durante el proceso de capacitación de espermatozoides humanos.

### Particulares

- ▶ Establecer la temporalidad de los cambios de **pHi** durante la capacitación.
- ▶ Determinar si la alcalinización asociada a la capacitación ocurre diferencialmente en las distintas regiones subcelulares del espermatozoide.
- ▶ Evaluar los efectos del bloqueo farmacológico de las proteínas que regulan el **pHi** en la movilidad hiperactivada.



## RESULTADOS

### *Análisis de los cambios de pHi durante la capacitación de espermatozoides humanos*

#### Medición regionalizada de los cambios de pHi en espermatozoides humanos

Para estudiar cómo ocurren los cambios en el pHi durante la capacitación de los espermatozoides humanos, se empleó la técnica de la citometría de flujo acoplada a imágenes. Esta técnica permite adquirir información de decenas de miles de células en cuestión de minutos, y al mismo tiempo, permite el análisis regionalizado de imágenes de espermatozoides humanos para estudiar de manera independiente los eventos que ocurren en la cabeza, de aquellos que suceden en la pieza media y la pieza principal [73]. Hasta el momento no existía evidencia de la utilidad de esta técnica para la medición del pHi en espermatozoides humanos. Por esta razón se determinó si esta técnica permitía evaluar cambios regionalizados en el pHi. Para ello, los espermatozoides humanos se purificaron del fluido seminal y se incubaron en un medio conocido como HTF (por sus siglas en inglés *Human Tubal*) cuya composición no promovía la capacitación espermática (en adelante llamado como “no capacitante” y abreviado como NC) (ver [detalles experimentales](#)). Posteriormente, se incubaron en presencia de un colorante fluorescente sensible a cambios en el pHi, el BCECF-AM, denominado en adelante como BCECF<sup>4</sup> (ver [detalles experimentales](#)). Una vez que los espermatozoides internalizaron el BCECF en su citoplasma, se añadió un colorante fluorescente de viabilidad celular, el Ioduro de propidio, llamado en adelante PI. Con esta combinación de colorantes es posible excluir a las células no viables (positivos a PI) y evaluar el pHi de una población de espermatozoides viables ([Fig. S1a](#) y [S1b](#)).

Posteriormente, se planteó determinar si, en efecto, mediante esta técnica es posible medir cambios de pHi en un contexto celular. Para ello se comparó la fluorescencia de células vivas teñidas con BCECF, las cuales se incubaron en ausencia o presencia de 10 mM de trimetilamonio (TMA). Se sabe que esta base débil promueve un aumento sostenido del pHi de aproximadamente 0.4 unidades [74]. Como era de esperarse, las células tratadas con TMA presentaron mayores niveles de fluorescencia de BCECF en comparación de las células de la condición control ([Fig. S1c](#)). Para realizar las comparaciones numéricas entre las diferentes condiciones experimentales, se realizó una normalización de la fluorescencia de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Fluorescencia relativizada de BCECF } (F_{rel}) = F/F_{mediana(Control)} \quad \text{Ecuación 1}$$

En donde  $F$  corresponde a cada valor de fluorescencia de BCECF obtenido por cada célula y por cada región.

$F_{mediana(Control)}$  corresponde al valor de la mediana<sup>5</sup> de fluorescencia del colorante en la condición no capacitante

---

<sup>4</sup> El espectro de excitación/emisión del BCECF es 490/535 nm. Cuando el pHi aumenta, la fluorescencia de BCECF incrementa, y viceversa, tras una acidificación del pHi, la fluorescencia decae.

<sup>5</sup> Se escogió realizar la normalización con la mediana ya que en muchos casos la fluorescencia de las poblaciones celulares presentaba una distribución que no cumplía con los criterios de normalidad.



control. Este cálculo se realizó para cada donador y para cada región, de esta manera, la media y la mediana de la fluorescencia relativizada de BCECF ( $F_{rel}$ ) para la condición Control, siempre fue equivalente a 1.

Una vez que los datos se procesaron de acuerdo con lo indicado en la [ecuación 1](#), se realizó una comparación numérica de la fluorescencia de BCECF en presencia o ausencia de TMA. Adicionalmente, para determinar si este aumento de fluorescencia podía ser evaluado a nivel subcelular, se aplicó una estrategia de análisis de imágenes que desarrollamos previamente [\[73\]](#). Esta estrategia de análisis es útil para segmentar de manera semiautomatizada las miles de imágenes de espermatozoides obtenidas mediante la citometría de flujo acoplada a imágenes (ver [detalles experimentales](#)). Con esta segmentación es posible realizar mediciones de fluorescencia de cada región subcelular del espermatozoide: la cabeza, la pieza media y la pieza principal ([Fig. S1d](#)). Tras realizar la segmentación y realizar el subsecuente análisis subcelular, se observó que el TMA produjo un aumento de la fluorescencia del BCECF en las tres regiones subcelulares del espermatozoide ( $F_{rel}$  promedio = 1.87, 1.63 y 1.77 para la cabeza, la pieza media y pieza principal respectivamente) ([Fig. S1e](#)).

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que es posible detectar cambios en el pHi de poblaciones de espermatozoides humanos mediante el uso de la citometría de flujo acoplada a imágenes es una herramienta adecuada para la evaluación del pHi. Adicionalmente, el análisis de imágenes utilizado permitió el análisis a nivel de célula única con una resolución subcelular sobresaliente, esto nos permitió de igual manera poder determinar que los valores de pHi en los tres segmentos seleccionados (cabeza, pieza media, y pieza principal) son diferentes. Además, nos permitió abordar nuestra siguiente pregunta sobre cómo cambian estos valores en condiciones de capacitación. La alcalinización del pHi asociada a la capacitación ocurre en la cabeza y la pieza principal, pero aparentemente no en la pieza media de los espermatozoides humanos

Estudios previos revelaron que el pHi de los espermatozoides humanos aumenta tras 24 h de incubación en medio que promueve la capacitación [\[33\]](#). Sin embargo, en este trabajo se planteó demostrar el curso temporal en el que ocurre esta alcalinización intracelular asociada a la capacitación, así como, determinar la manera que estos cambios ocurren a nivel subcelular en cada una de las regiones del espermatozoide. Para ello, se utilizaron espermatozoides aislados del fluido seminal que se incubaron en medio NC, los cuales se cargaron con BCECF. Posteriormente, se tomó una fracción de estas células con el colorante para medir sus niveles de fluorescencia (esta medición es considerada subsecuentemente como la condición NC control). Al resto de las de células cargadas con BCECF se les añadió un volumen equivalente de medio HFT suplementado con  $\text{HCO}_3^-$  (50 mM), y con 1% v/v de albúmina sérica de bovino (denominada en adelante como BSA o solo como albúmina). Se sabe que la presencia de estos compuestos promueve el proceso de capacitación *in vitro* [\[75,76\]](#). A este medio suplementado con  $\text{HCO}_3^-$  y albúmina se le denominó en adelante como medio capacitante (CAP)<sup>6</sup>. Transcurridos

---

<sup>6</sup> La concentración final de  $\text{HCO}_3^-$  y de albumina en el medio CAP es de 25 mM y 0.5%, respectivamente.



algunos segundos de la adición de medio CAP, se tomó a una fracción de células a las que se les realizó la primera<sup>7</sup> medición de la fluorescencia de BCECF en condiciones capacitantes.

Tras 15 min de incubación en medio CAP se realizó la segunda medición de fluorescencia. Subsecuentemente, se realizaron 11 mediciones cada 15 min hasta completar a los 180 min de capacitación. A partir de los 190 min, las mediciones adicionales se hicieron cada 60 min hasta completar 360 min de incubación en condiciones que promueven la capacitación (en la [figura 3a](#) se esquematiza este protocolo).

Las imágenes obtenidas se procesaron como se mencionó anteriormente para realizar el análisis regionalizado (ver [detalles experimentales](#) y [Fig. S1d](#)), y posteriormente se aplicó la relativización indicada en la [ecuación 1](#). Los datos obtenidos se representan como gráficas de densidad de fluorescencia (ver [detalles experimentales](#)) ([Fig. 3b](#)). Con el fin de comparar los resultados obtenidos entre cada donador, se obtuvo un promedio de la fluorescencia relativizada y los datos resultantes se graficaron para cada condición experimental y cada región subcelular (ver [detalles experimentales](#)) ([Fig. 3c](#)).

Los resultados obtenidos muestran que, desde el primer punto evaluado después del inicio de la capacitación, se da un incremento en la  $F_{rel}$ , lo que indica que ocurrió un aumento en el pHi. Comparados con la condición NC ( $F_{rel} = 1.00$ ), el aumento observado ocurrió mayoritariamente en la cabeza ( $F_{rel} = 1.28 \pm 0.01$ ,  $p = 0.04$ ), y aunque también se presentó en la pieza principal, este no fue estadísticamente significativo ( $F_{rel} = 1.08 \pm 0.05$ ,  $p = 0.13$ ). Interesantemente, en la pieza media se observó una disminución no significativa en la fluorescencia ( $F_{rel} = 0.89 \pm 0.05$ ,  $p = 0.66$ ). Para los siguientes tiempos evaluados, los resultados obtenidos mostraron una elevada variabilidad entre los datos individuales de cada donador (ver puntos en escala de grises de la [Fig. 3b](#) y [3c](#)). Para poder visualizar el comportamiento cinético de los cambios de fluorescencia se realizó un ajuste de regresión local (ver [detalles experimentales](#)) (líneas negras en la [Fig. 3c](#)). Mediante este análisis, se determinó que los valores de  $F_{rel}$  de la cabeza y la pieza principal continuaron aumentando hasta llegar a su punto máximo a los 60 min de incubación en medio CAP. ( $F_{rel} = 1.26 \pm 0.07$ ,  $p = 0.012$ ; y  $1.13 \pm 0.04$ ,  $p = 0.022$  para la cabeza y la pieza principal, respectivamente). Sin embargo, tras 75 min de capacitación, la fluorescencia en la pieza media llegó a su punto menor ( $F_{rel} = 0.84 \pm 0.05$ ,  $p = 0.01$ ), a partir de este punto se mantuvo aparentemente constante hasta los 360 min de incubación. Por el otro lado, a partir de los 75 min de capacitación, la fluorescencia de la cabeza y la pieza principal presentó una fase de decaimiento hasta llegar a un punto mínimo a los 165 min ( $F_{rel} = 1.19 \pm 0.03$ ,  $p = 0.01$ ; y  $1.10 \pm 0.04$ ,  $p = 0.01$ ; para la cabeza y la pieza principal respectivamente). Después de este punto, la fluorescencia presentó una variabilidad alta y una tendencia a mantenerse relativamente constante hasta los 360 min de capacitación, aunque solamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en la región de la cabeza ( $F_{rel} = 1.20 \pm 0.06$ ,  $p = 0.007$ ), pero no así en

---

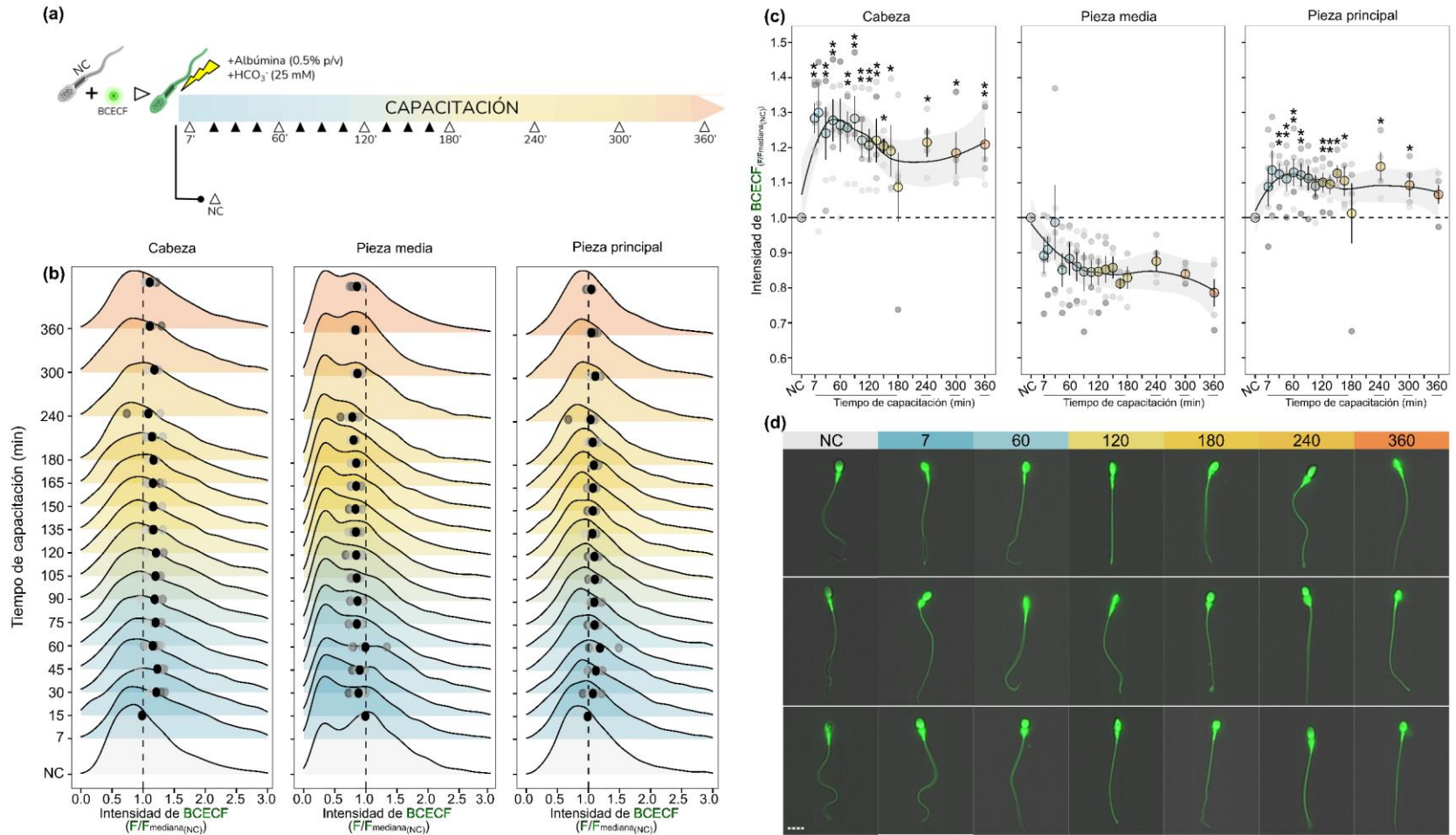
<sup>7</sup> La suspensión de espermatozoides se centrifuga para concentrarlas y poder ser evaluadas por el citómetro (ver [detalles experimentales](#)). Por esta razón el primer punto evaluado durante la capacitación corresponde a 7 min.



la pieza principal ( $F_{rel} = 1.06 \pm 0.04$ ,  $p = 0.061$ ), ([Fig. 3c](#)). En la [figura 3d](#) se observan imágenes de BCECF de espermatozoides representativos de algunos de los tiempos evaluados.

Los resultados descritos anteriormente demostraron que los cambios del pH<sub>i</sub> asociados a la capacitación ocurren desde el primer tiempo evaluado de la capacitación, y subsecuentemente presentan un comportamiento altamente variable ([Fig. 3b](#) y [3c](#)). Por esta razón se planteó descartar la posibilidad de que los cambios observados en la fluorescencia ocurren de una manera que solo depende del tiempo de incubación e independiente de los componentes del medio capacitante. Para ello se comparó la fluorescencia de espermatozoides teñidos con BCECF incubados en condiciones NC durante 60 o 360 min. Interesantemente, no se observaron cambios estadísticamente significativos en comparación de la condición NC inicial (10 min después de la tinción con BCECF) en ninguna de las tres regiones ( $F_{rel} = 1.09 \pm 0.03$ ,  $p = 0.13$ ;  $0.91 \pm 0.07$ ,  $p = 0.67$ ; y  $1.02 \pm 0.02$ ,  $p = 0.67$ ; para la cabeza, la pieza media y la pieza principal) ([Fig. S2](#)). Esto sugiere que los cambios en el pH<sub>i</sub> dependen de la presencia de los componentes clave del medio capacitante, es decir el anión  $\text{HCO}_3^-$  y la albúmina, y no así de factores como el tiempo, o la manipulación experimental.





**Figura 3. El aumento del pH asociado a la capacitación ocurre con una cinética temporal definida y diferente en cada región del espermatozoide.** (a) Esquema de la estrategia para la evaluación de la cinética del pH. Los espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes (NC) fueron cargados con BCECF y se les hizo la primera medición (condición NC). A otro grupo de células cargadas con BCECF se les añadió medio suplementado con  $\text{HCO}_3^-$  (25 mM) y albúmina (0.5% p/v) para promover la capacitación (condición CAP). En estas condiciones se realizaron mediciones a los 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180, 240, 300 y 360 min de incubación. (b) Histogramas de densidad de fluorescencia de BCECF relativizadas con la condición NC (de acuerdo con la ecuación 1). Las gráficas están construidas con la información de al menos 1000 células por donador y por cada tiempo evaluado. Los puntos negros representan la mediana de fluorescencia de todas las muestras analizadas. (c) valores promedio de la fluorescencia relativizada de BCECF de todos los tiempos evaluados. Los puntos de colores indican el promedio  $\pm$  el error estándar de la media. Las líneas curvadas corresponden al modelo de regresión local, y la zona sombreada en gris corresponde al intervalo de confianza del 95% del ajuste. Para las gráficas en (b) y en (c) los puntos en escala de grises indican la mediana de fluorescencia de cada donante ( $n = 5$ ). Se realizaron comparaciones estadísticas con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de un análisis de comparaciones múltiples mediante el método de Holm. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ . (d) Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con BCECF incubados en los tiempos indicados.

## Determinación cuantitativa de los cambios de pHi durante la capacitación de espermatozoides humanos

A raíz de los resultados descritos en el apartado anterior, se decidió obtener información sobre la magnitud de estos cambios de pHi asociados a la capacitación espermática. Para ello se desarrolló una estrategia experimental que permitió la determinación del pHi absoluto en poblaciones de espermatozoides teñidos con BCECF. Para esta técnica se desarrolló un tipo particular de citometría de flujo a la que se le denominó como de “adquisición continua”. La razón para utilizar este citómetro es que, a diferencia del citómetro acoplado a imágenes, este permite hacer registros de la fluorescencia en un curso temporal durante el cual se pueden hacer adiciones de diferentes compuestos sin necesidad de interrumpir el registro. Gracias a esto fue posible crear una estrategia experimental que permitió obtener valores absolutos del pHi (ver [detalles experimentales](#) y [Fig. S3](#)).

Mediante esta estrategia, se determinó que el pHi de los espermatozoides no capacitados fue de  $6.62 \pm 0.35$ , mientras que tras 360 min de incubación en un medio que promueve la capacitación, el pHi incremento a  $6.80 \pm 0.32$  ( $p=0.10$ ) ([Fig. 4](#)). Es importante mencionar que una de las desventajas más relevantes de la citometría de flujo de adquisición continua es que al carecer de la capacidad de adquirir imágenes no es posible realizar mediciones regionalizadas. Aunque el aumento en el pHi no resultó ser estadísticamente significativo, estos resultados refuerzan la propuesta de que el pHi aumenta durante la capacitación y proveen evidencia sobre la magnitud de dicho cambio.

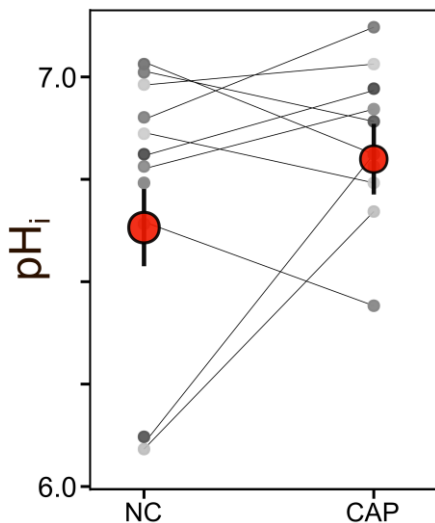


Figura 4. Medición absoluta del pHi en espermatozoides humanos mediante citometría de adquisición continua. Valores promedio de pHi de poblaciones (al menos 5000 células por donador y por condición) de espermatozoides provenientes de diferentes donadores ( $n=11$ , puntos en escala de grises). Se evaluaron células incubadas en condiciones no capacitantes (NC) y se compararon con células que se incubaron durante 360 min en medio capacitante (CAP). Los puntos rojos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de todas las muestras evaluadas. Se realizó una prueba de Wilcoxon para determinar la presencia de significancia estadística. (ver [detalles experimentales](#) y [Fig. S3](#) para más información del protocolo).

La alcalinización asociada a la capacitación ocurre con mayor frecuencia en muestras de espermatozoides de hombres fértiles

Durante el periodo de desarrollo de este trabajo se publicó un artículo de investigación en donde se reportó que en muestras de espermatozoides provenientes de pacientes con bajas de tasas de fertilización *in vitro* (FIV) durante tratamiento de fertilidad presentaron niveles de pHi ácidos en contraste con aquellos con mejores tasas de fecundación [77]. Con el fin de reforzar la idea de que un pHi alcalino puede ser un elemento crucial para definir el potencial fertilizante de una muestra seminal, se realizó la determinación del pHi absoluto de muestras



seminales provenientes de donantes normozoospermicos que reportaron haber sido padres por medios naturales en un lapso no mayor a 5 años (a este grupo de donantes se les denominó como de “paternidad reportada”). De igual forma, se obtuvo el pHi de muestras seminales de individuos normozoospermicos que reportan no haber sido padres hasta el momento de la medición (denominados en adelante como de “paternidad no reportada”). De manera interesante, tras 6 h de incubación en medio capacitante se encontró que las muestras seminales del grupo de donantes con paternidad reportada presentaron un aumento promedio de 0.36 unidades de pHi con respecto a la condición NC ( $6.58 \pm 0.14$  vs  $6.94 \pm 0.12$  para condiciones NC y CAP respectivamente,  $p = 0.0078$ ) (Fig. 5). Cabe destacar que a pesar de que se observó un alto grado de variabilidad entre los valores de pHi, el 100% (8 de 8) de estas muestras mostró este comportamiento. En contraste, las muestras de individuos de paternidad no reportada presentaron un comportamiento variable en donde solamente en una de las seis muestras (17%) se observó una alcalinización tras la capacitación. A su vez, en dos (33%) de estas no se observaron cambios, y en las restantes tres (50%) se observó un descenso del pHi. Debido a esta situación, el comportamiento promedio del pHi tras la capacitación mostró una aparente acidificación de 0.06 unidades de ( $6.67 \pm 0.14$  vs  $6.61 \pm 0.08$  para condiciones NC y CAP respectivamente,  $p = 0.55$ ) (Fig. 5). Como era de esperarse, los datos obtenidos presentaron niveles altos de variación entre muestras. Sin embargo, estos resultados suman evidencia acerca de la importancia del pHi durante el proceso de capacitación. Además, sugieren que la adecuada ocurrencia del fenómeno de alcalinización asociada a la capacitación podría estar relacionada con la capacidad fecundante de una muestra de espermatozoides.

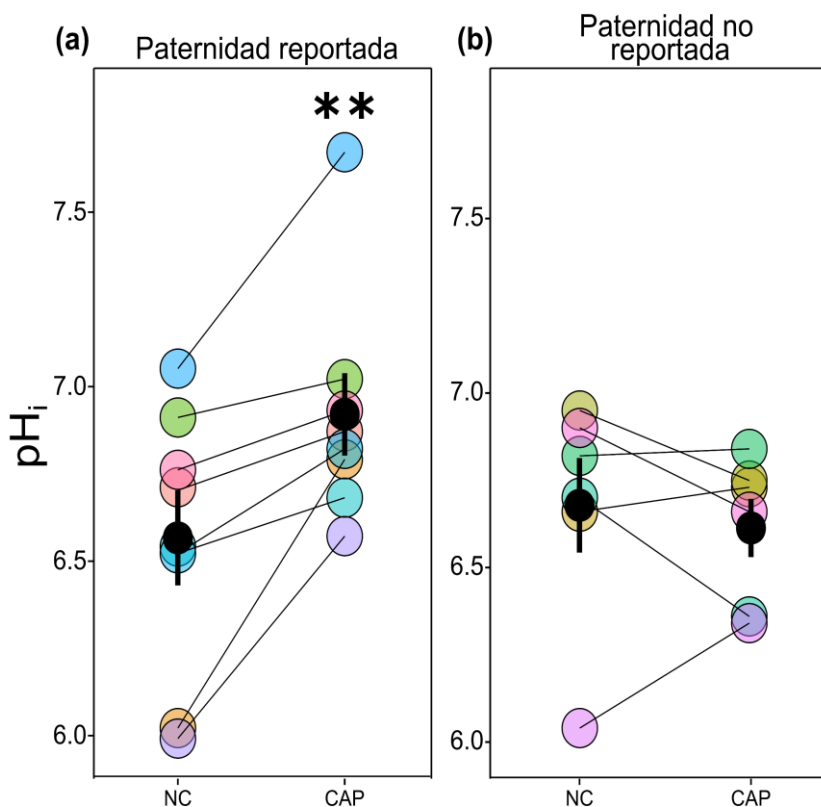


Figura 5. Medición absoluta del pHi en muestras de espermatozoides de donadores con paternidad reportada y no reportada. Grafica de puntos que representa los valores promedio de pHi de poblaciones de espermatozoides (al menos 5000 células por condición) de donadores normozoospermicos evaluados en condiciones no capacitantes (NC) comparados con espermatozoides incubados durante 360 min en medio capacitante (CAP). Cada punto en colores representa el pHi promedio de una población de espermatozoides de un donante individual. Las muestras se clasificaron en dos categorías dependiendo si el donante reportó ser padre (paternidad reportada, n = 8) (a), o si el donante reporta no ser padre (paternidad no reportada, n=6) (b). Los puntos negros representan el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de los valores promedio de pHi de todas las muestras evaluadas. Se realizó una prueba de Wilcoxon para determinar diferencias significativas.  $**p < 0.05$ .



## Mecanismos moleculares que controlan la alcalinización intracelular asociada a la capacitación espermática

### El rol del anión $\text{HCO}_3^-$ en la regulación del pHi de espermatozoides humanos

Los resultados de la sección anterior sugieren que los componentes del medio de incubación que inducen el proceso de capacitación *in vitro*, la albúmina y el  $\text{HCO}_3^-$ , de manera individual o en conjunto, desencadenan vías de señalización que van a generar, entre otras cosas, el aumento del pHi. Bajo esta premisa, se consideró que posiblemente el anión  $\text{HCO}_3^-$  podría ser el responsable principal de desencadenar la respuesta celular que culmina con la alcalinización del citoplasma. Para demostrar esto, se utilizaron espermatozoides teñidos con BCECF incubados en un medio que contenía medio HTF suplementado únicamente con albúmina mas no con  $\text{HCO}_3^-$ . Con este experimento se esperaba que el aumento del pHi característico de la capacitación no sucediera en lo absoluto, o bien, que ocurriera de manera disminuida. Para los siguientes experimentos, solamente se midieron los tiempos de incubación NC, 7, 60 y 240 min. Los datos se procesaron para obtener la  $F_{\text{rel}}$  de acuerdo con la [ecuación 1](#). Las células incubadas en medio carente de  $\text{HCO}_3^-$ , presentaron resultados muy variables considerando cada región subcelular. En la zona de la cabeza, a los 7 y 60 min de incubación en dicho medio, la  $F_{\text{rel}}$  fue estadísticamente menor que en las células incubadas en medio CAP ( $F_{\text{rel}(\text{no } \text{HCO}_3^-)} = 1.01 \pm 0.01$  vs  $F_{\text{rel}(\text{CAP})} = 1.10 \pm 0.02$ ,  $p = 3.2 \times 10^{-3}$ , para los 7 min;  $F_{\text{rel}(\text{no } \text{HCO}_3^-)} = 1.01 \pm 0.03$  vs  $F_{\text{rel}(\text{CAP})} = 1.06 \pm 0.02$ ,  $p = 0.024$ , para los 60 min). A su vez, en la pieza media se detectó un ligero aumento de la  $F_{\text{rel}}$  después de 7 min de incubación que se mantuvo constante a los 60 min, el cual solamente resulto ser significativamente mayor que la condición capacitante hasta los 240 min de incubación ( $F_{\text{rel}(\text{no } \text{HCO}_3^-)} = 1.10 \pm 0.05$  vs  $F_{\text{rel}(\text{CAP})} = 0.99 \pm 0.04$ ,  $p = 8.5 \times 10^{-4}$ ). Por otro lado, en la pieza principal se observaron niveles de  $F_{\text{rel}}$  que resultaron ser menores que en la condición NC. En todos los tiempos de capacitación evaluados, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición capacitante ( $F_{\text{rel}(\text{no } \text{HCO}_3^-)} = 0.98 \pm 0.02$  vs  $F_{\text{rel}(\text{CAP})} = 1.07 \pm 0.03$ ,  $p = 0.015$ , para los 7 min;  $F_{\text{rel}(\text{no } \text{HCO}_3^-)} = 0.96 \pm 0.01$  vs  $F_{\text{rel}(\text{CAP})} = 1.03 \pm 0.02$ ,  $p = 0.034$ , para los 60 min;  $F_{\text{rel}(\text{no } \text{HCO}_3^-)} = 0.94 \pm 0.01$  vs  $F_{\text{rel}(\text{CAP})} = 1.03 \pm 0.01$ ,  $p = 4.7 \times 10^{-4}$ , para los 240 min) ([Fig. 6a](#) y [6b](#)).

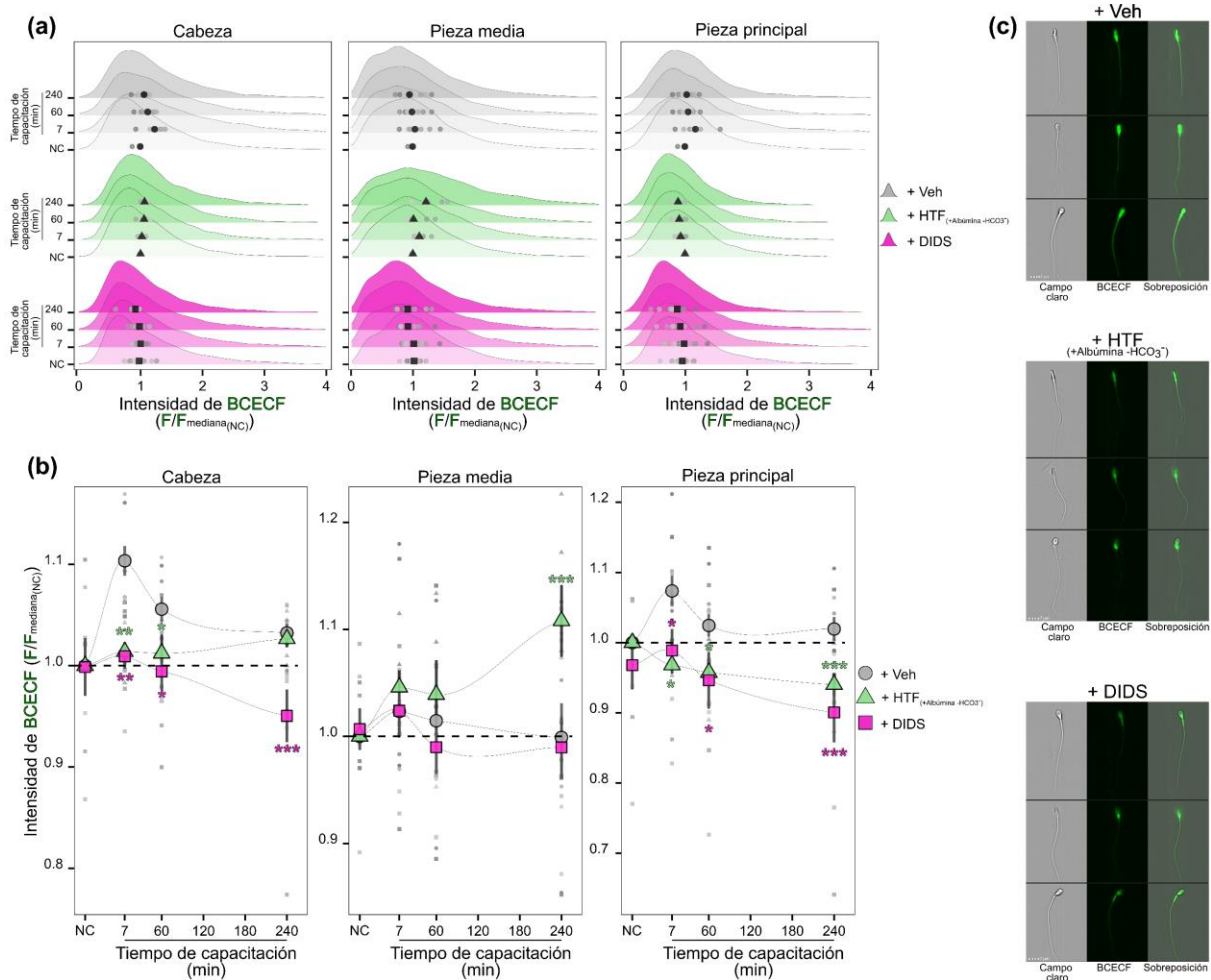
Este resultado indica que el  $\text{HCO}_3^-$  presente en el medio capacitante es crucial para inducir el aumento de pHi asociado a la capacitación. Adicionalmente la variabilidad observada en cada una de las regiones subcelulares sugiere que existen una regulación que ocurre de manera independiente en cada zona del espermatozoide.

Con el objetivo de determinar si el efecto del  $\text{HCO}_3^-$  en el pHi se debe a su influjo por acción de algún transportador de membrana plasmática, los espermatozoides se incubaron en presencia de 100  $\mu\text{M}$  del inhibidor general del transporte aniónico, DIDS, o en su defecto, con una concentración equivalente de DMSO como vehículo (Veh) (ver [detalles experimentales](#)). La idea es que el fármaco inhibiera la actividad de la mayoría de los canales y transportadores que pudieran estar participando en el influjo  $\text{HCO}_3^-$  requerido para la alcalinización asociada a la capacitación. De acuerdo con lo esperado, el tratamiento con DIDS inhibió significativamente el



aumento de la  $F_{rel}$  en las tres regiones del espermatozoide en todos los tiempos de incubación evaluados (Fig. 6a y 6b).

En conjunto, estos resultados sugieren que el influjo de  $HCO_3^-$  es fundamental para que ocurra el aumento de  $pHi$  en la cabeza y la pieza principal de los espermatozoides durante la capacitación. Para esto se requiere de la participación de proteínas transmembranales, ya sea canales o transportadores, que transportan este anión. Por otro lado, es probable que la albúmina por sí sola, también sea capaz de activar proteínas o vías de señalización que convergen en la inducción del aumento del  $pHi$  asociado a la capacitación regionalizada (ver discusión). Al mismo tiempo, estos resultados generan la interrogante sobre qué proteínas son las responsables de generar el influjo de este anión.



**Figura 6. Importancia del influjo del  $HCO_3^-$  en la regulación del  $pHi$  durante la capacitación.** (a) Histogramas de densidad de fluorescencia de BCECF de las células incubadas con los diferentes tratamientos: vehículo (Veh), medio sin  $HCO_3^-$  (HTF +albúmina - $HCO_3^-$ ), o un inhibidor general del transporte aniónico (DIDS, 50  $\mu M$ ). La información de la fluorescencia de BCECF se relativizó con respecto a la condición no capacitante incubadas con vehículo (NC-Veh) de acuerdo con la ecuación 1. Cada histograma contiene la información de al menos 1000 células por donador. (b) Valores promedio de la fluorescencia relativizada de BCECF. Los puntos de colores indican el promedio  $\pm$  error estándar de la media. Las líneas curvadas en (b) corresponden al ajuste de un modelo de regresión local. Para las gráficas en (a) y (b) los puntos en escala de grises indican la mediana de la fluorescencia de cada donante ( $n = 5$ ). Se realizaron pruebas de Krustall-Wallis seguidas de comparaciones múltiples de cada tratamiento con respecto al vehículo para cada tiempo de incubación evaluado. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$  (c) Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con BCECF e incubados con los diferentes tratamientos empleados.



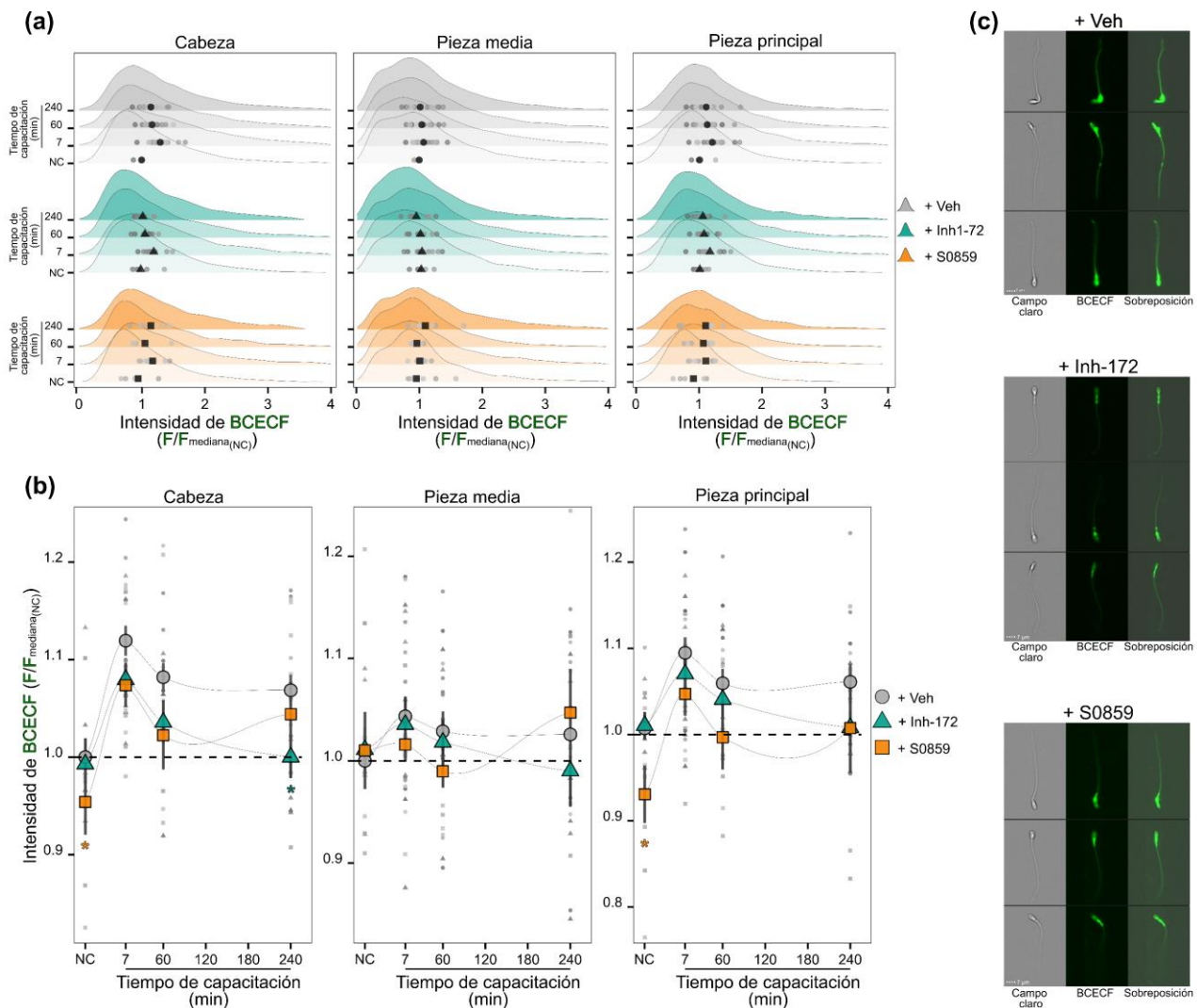
Los resultados de la sección anterior puntualizaron la relevancia del influjo de  $\text{HCO}_3^-$  para que ocurra el aumento del pHi asociado a la capacitación, pero generaba la interrogante sobre las proteínas (transportadores o canales) que están involucrados en este proceso. Previamente se detectó que en los espermatozoides expresan algunas proteínas con esta función, entre las que se encuentran los cotransportadores de  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  conocidos como NBC. En espermatozoides humanos, se encontró evidencia de la actividad de una proteína con las características de un NBC de naturaleza electrogénica ya que el bloqueo farmacológico de estas proteínas inhibe la hiperpolarización de la membrana plasmática que ocurre inmediatamente tras la adición de  $\text{HCO}_3^-$  [48]. Por esta razón se consideró que, al inhibir a esta proteína, posiblemente se evitaría el aumento de pHi que se da en los primeros minutos de incubación en presencia de  $\text{HCO}_3^-$ . Para demostrar lo anterior, se empleó el S0859 (5  $\mu\text{M}$ ), un antagonista específico de los NBC, y se compararon los resultados con espermatozoides incubados solamente con el vehículo (Veh). Interesantemente, la inhibición de esta proteína en condiciones NC, propició una reducción de la fluorescencia del BCECF que resultó ser estadísticamente significativa tanto en la cabeza ( $F_{\text{rel}(S0859\text{-}NC)} = 0.95 \pm 0.04$  vs  $F_{\text{rel}(Veh\text{-}NC)} = 1.00 \pm 0.00$ ,  $p = 0.034$ ) como en la pieza principal ( $F_{\text{rel}(S0859\text{-}NC)} = 0.92 \pm 0.04$  vs  $F_{\text{rel}(Veh\text{-}NC)} = 1.00 \pm 0.00$ ,  $p = 0.039$ ), pero no así en la pieza media ( $F_{\text{rel}(S0859\text{-}NC)} = 1.00 \pm 0.04$  vs  $F_{\text{rel}(Veh\text{-}NC)} = 1.00 \pm 0.00$ ,  $p = 0.93$ ). Por otro lado, en condiciones capacitantes especialmente a los 60 y 240 min, los niveles de fluorescencia fueron menores que la condición control, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 7a y 7b). Estos resultados sugieren que la actividad de los NBC es importante para el control del pHi incluso antes de la capacitación, aunque su participación en el aumento inicial del pHi inducido por el medio capacitante es discutible. Además, esto apoya la idea de que existen otras proteínas que participan en el control del influjo de  $\text{HCO}_3^-$  que ocurre desde los primeros minutos de la capacitación.

Otro candidato es el canal CFTR el cual permea  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ . Se reportó que el Inh-172, un antagonista específico de este canal, induce una acidificación del pHi en espermatozoides humanos capacitados durante 300 min [59]. En el presente trabajo se determinó si este compuesto prevenía el aumento inicial del pHi inducido por el influjo de  $\text{HCO}_3^-$ , y al mismo tiempo, se indagó si efecto del bloqueo de este canal correlaciona con su localización subcelular previamente descrita (ver Fig. 2). Para ello se emplearon espermatozoides teñidos con BCECF e incubados en presencia de 5  $\mu\text{M}$  del Inh-172, o en presencia de DMSO como vehículo (Veh). Se evaluaron los mismos tiempos descritos en la sección anterior (NC, y Cap a los 7, 60 y 240 min). De igual manera, los datos se procesaron como se indicó en secciones anteriores para obtener la información a nivel regionalizado, y posteriormente se relativizaron de acuerdo con la ecuación 1. De manera interesante, se observó que la inhibición farmacológica del CFTR no provocó un aumento significativo en la  $F_{\text{rel}}$  ni a los 7 ni a los 60 min de incubación con respecto a la condición NC. Sin embargo, se observó una disminución de la fluorescencia con respecto a la condición control tras 240 min de incubación en medio capacitante y en presencia del fármaco.



Este efecto ocurrió en las tres regiones subcelulares del espermatozoide, aunque solamente mostró ser estadísticamente diferente en la zona de la cabeza ( $F_{rel(Inh-172-240')} = 1.00 \pm 0.02$  vs  $F_{rel(Veh-240')} = 1.08 \pm 0.02$ ,  $p = 0.03$ ) (Fig. 7a y 7b). La observación anterior sugiere que la participación del CFTR en la regulación del pH<sub>i</sub> es aparentemente relevante únicamente tras varias horas de capacitación.

Estos resultados fortalecen la idea de que otra u otras proteínas aun no identificadas están involucradas de alguna manera en la regulación del flujo inicial de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que resulta necesario para inducir el incremento de pH<sub>i</sub> observado tras la inducción de la capacitación (ver [discusión](#)).



**Figura 7. El canal CFTR y el cotransportador como mecanismos de relevancia menor en la regulación del pH<sub>i</sub> durante la capacitación. (a)** Histogramas de densidad de fluorescencia de BCECF de las células incubadas con los diferentes tratamientos: vehículo (Veh), inhibidores del canal CFTR (Inh-172, 5 μM) y de los transportadores NBC (S0859, 5 μM). La información de la fluorescencia de BCECF se relativizó con respecto a la condición no capacitante incubadas con vehículo (NC-Veh) de acuerdo con la ecuación 1. Cada histograma contiene la información de al menos 1000 células por donador. **(b)** Valores promedio de la fluorescencia relativizada de BCECF. Los puntos de colores indican el promedio ± error estándar de la media. Las líneas curvadas en (b) corresponden al ajuste de un modelo de regresión local. Para las gráficas en (a) y (b) los puntos en escala de grises indican la mediana de la fluorescencia de cada donante (n = 5). Se realizaron pruebas de Krustall-Wallis seguidas de comparaciones múltiples de cada tratamiento con respecto al vehículo para cada tiempo de incubación evaluado. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$  **(c)** Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con BCECF e incubados con los diferentes tratamientos empleados.



La evidencia obtenida en este trabajo apoya la idea de la importancia del influjo de  $\text{HCO}_3^-$  en la regulación de la alcalinización intracelular asociada a la capacitación en espermatozoides humanos. Sin embargo, aún no es claro cómo el aumento de la concentración de este anión está involucrado en este proceso.

Una posibilidad es que el  $\text{HCO}_3^-$  se una a la adenilil ciclasa soluble (sAC), una proteína de expresión exclusiva del espermatozoide que es indispensable para la fecundación [78]. Esta enzima cataliza la transformación del adenosín trifosfato (ATP) en adenosín monofosfato cíclico (AMPC) [79]. Una de las acciones más relevantes de este importante segundo mensajero es activar a la cinasa dependiente de AMPC, conocida como PKA [11]. La activación de esta cinasa en los espermatozoides ocurre tan pronto como un minuto después de la estimulación con  $\text{HCO}_3^-$  [80]. Anteriormente, se demostró que la inhibición farmacológica de PKA induce una acidificación citoplásmica en espermatozoides humanos incubados en medio capacitante durante 300 min [59]. Por esta razón, resultó relevante determinar la participación de la vía que relaciona al  $\text{HCO}_3^-$ , la sAC y la PKA en la regulación del pHi en el espermatozoide humano, con el fin de determinar si la inhibición de los componentes de esta vía previene de manera total o parcial el aumento del pHi asociado a la capacitación, especialmente la alcalinización que ocurre durante los primeros minutos de este proceso.

Para ello se utilizaron espermatozoides previamente teñidos con BCECF los cuales se trataron con 50  $\mu\text{M}$  de KH7, un inhibidor de la sAC, o bien, con 30  $\mu\text{M}$  de H89, un antagonista de la PKA. Se realizaron mediciones siguiendo las condiciones descritas anteriormente, es decir, evaluando la fluorescencia del BCECF en condiciones NC, y en CAP a los 7, 60 y 240 min de incubación en presencia de los fármacos o del respectivo vehículo (Veh). Los datos obtenidos se procesaron de acuerdo con la [ecuación 1](#). De manera interesante, en los espermatozoides tratados con H89 se observó que la  $F_{\text{rel}}$  se redujo significativamente pero solo en la región de la pieza principal pero no en las otras regiones subcelulares. Esta disminución ocurrió tanto en condiciones NC ( $F_{\text{rel(H89)}} = 0.89 \pm 0.01$  vs  $F_{\text{rel(Veh)}} = 1.00 \pm 0.01$ ,  $p = 0.008$ ) como en todos los tiempos de capacitación evaluados ( $F_{\text{rel(H89-7)}} = 0.94 \pm 0.021$  vs  $F_{\text{rel(Veh-7)}} = 1.07 \pm 0.013$ ,  $p = 0.038$ ,  $F_{\text{rel(H89-60)}} = 0.92 \pm 0.01$  vs  $F_{\text{rel(Veh-60)}} = 1.01 \pm 0.02$ ,  $p = 0.021$ ,  $F_{\text{rel(H89-240)}} = 0.89 \pm 0.04$  vs  $F_{\text{rel(Veh-240)}} = 1.04 \pm 0.02$ ,  $p = 0.012$ ) ([Fig. 8b](#)).

Es importante mencionar que la concentración empleada de H89 puede también inhibir la actividad de otras cinasas como la CaM-K II, o la PKC. Para reforzar este resultado obtenido, se empleó un inhibidor más específico para esta cinasa. Un polipéptido de 19 aminoácidos derivado de la región efectora de la proteína inhibidora de PKA (PKI) que se encuentra naturalmente en las células. Para este experimento se usaron dos versiones del péptido: 1) un compuesto que corresponde solamente a los 19 aminoácidos, nombrado en adelante PKI, el cual por su naturaleza química no es permeable a la membrana plasmática por lo que carecería de actividad biológica en células vivas; y 2) una versión modificada del péptido que posee una miristoilación en la glicina de la posición 1 del polipéptido lo que le confiere la capacidad de atravesar la membrana celular. Este

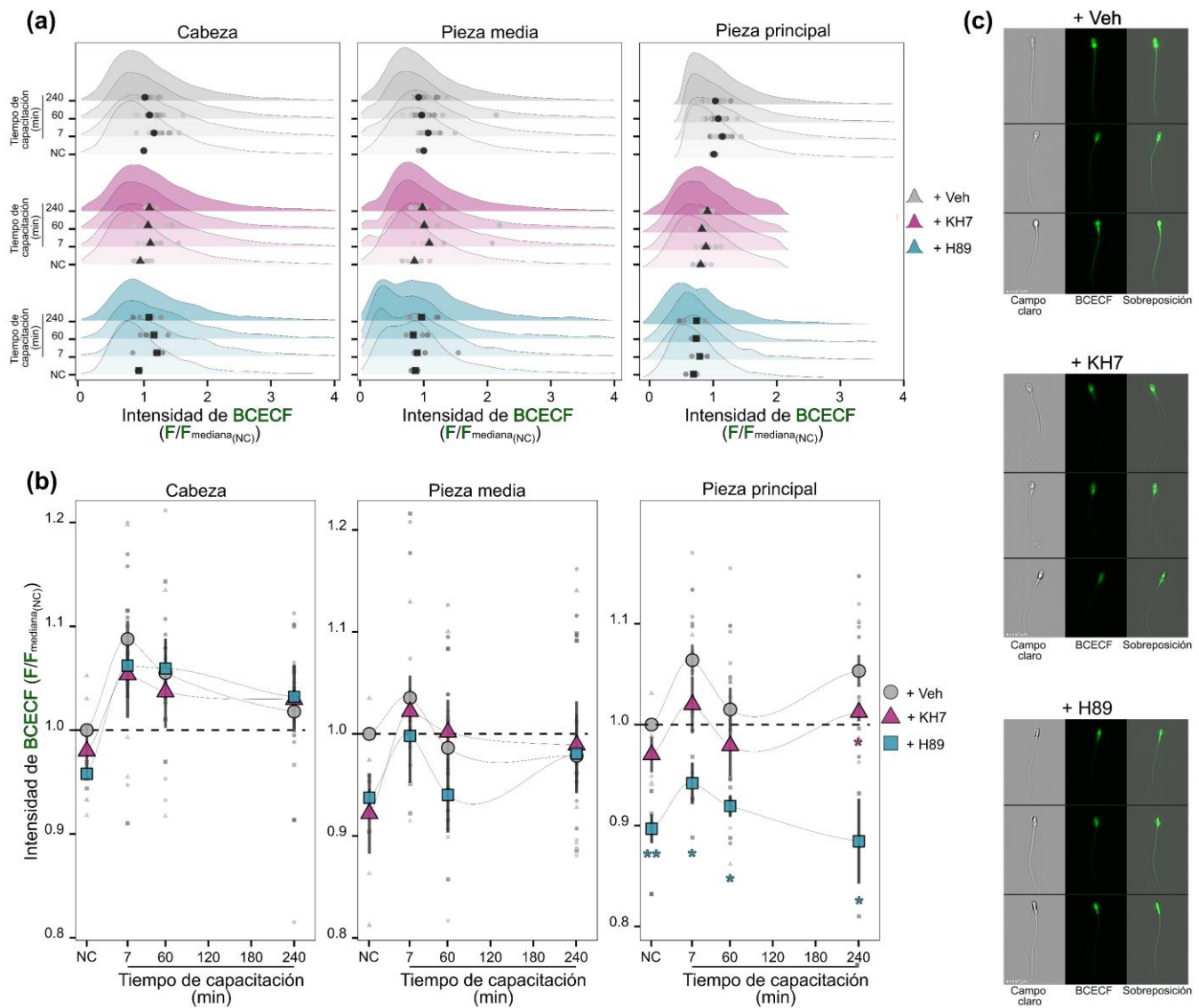


compuesto se nombra en adelante como S-PKI. Ambas versiones del péptido se utilizaron a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ . Para este experimento solamente se evaluaron células incubadas en medio capacitante durante 240 min en presencia de los polipéptidos o del vehículo ( $\text{H}_2\text{O}$ ). En estas condiciones, se observó que el S-PKI, pero no el PKI produjo una disminución estadísticamente significativa de la  $F_{\text{rel}}$  en la región de la pieza principal ([Fig. S4](#)) pero no de la cabeza ni de la pieza media (datos no mostrados).

Por otro lado, el bloqueo de la sAC mediante el KH7 también indujo una reducción de la  $F_{\text{rel}}$ , el cual resultado ser estadísticamente diferente únicamente en la región de la pieza principal tras 240 min de capacitación en condiciones capacitantes ( $F_{\text{rel}}(\text{KH7-240}') = 1.01 \pm 0.005$  vs  $F_{\text{rel}}(\text{Veh-240}') = 1.04 \pm 0.02$ ,  $p = 0.031$ ). Sin embargo, en la región de la cabeza y de la pieza media no se observó un cambio estadísticamente significativo con respecto a la condición control ([Fig. 8b](#)).

En conjunto, estos resultados sugieren que la vía de señalización que involucra la activación dependiente de  $\text{HCO}_3^-$  de la sAC, y la subsecuente activación de PKA, tiene un papel fundamental en la regulación del pHi. De manera interesante, estos resultados coinciden con la localización subcelular reportada para la PKA (ver la discusión para mayores detalles). Al mismo tiempo, estos resultados abren nuevas interrogantes, especialmente cuales son las proteínas río abajo de la activación de la sAC y/o de PKA que funcionan como efectoras del control del pHi.





**Figura 8.** Participación de la vía de  $\text{HCO}_3^-/\text{sAC}/\text{AMPC}/\text{PKA}$  en la regulación regionalizada del  $\text{pH}_i$  durante la capacitación. **(a)** Histogramas de densidad de la fluorescencia de BCECF de las células incubadas con los diferentes tratamientos: vehículo (Veh), inhibidor de la sAC (KH7, 50  $\mu\text{M}$ ), y de la PKA (H89, 30  $\mu\text{M}$ ). La información de la fluorescencia de BCECF se relativizó con respecto a la condición no capacitante incubadas con vehículo (NC-Veh) de acuerdo con la [ecuación 1](#). Cada histograma contiene la información de al menos 1000 células por donador. **(b)** Valores promedio de la fluorescencia relativizada de BCECF. Los puntos de colores indican el promedio  $\pm$  error estándar de la media. Las líneas curvadas en **(b)** corresponden al ajuste de un modelo de regresión local. Para las gráficas en **(a)** y **(b)** los puntos en escala de grises indican la mediana de la fluorescencia de cada donante ( $n = 5$ ). Se realizaron pruebas de Krustall-Wallis seguidas de comparaciones múltiples de cada tratamiento con respecto al vehículo para cada tiempo de incubación evaluado. \*  $p < 0.05$ , y \*\* $p < 0.01$ . **(c)** Imágenes representativas de espermatocitos teñidos con BCECF e incubados con los diferentes tratamientos empleados.





## El canal Hv1 como el principal efector de los cambios de pHi en la pieza principal

Los resultados de la sección anterior revelaron la importancia de la vía de  $\text{HCO}_3^-/\text{sAC}/\text{AMPC}/\text{PKA}$  en la regulación del pHi en la pieza principal. La pregunta inmediata que se planteó fue determinar la naturaleza de la proteína efectora encargada de regular el pHi en esta región del espermatozoide.

Se sabe que los espermatozoides humanos presentan una conductividad a  $\text{H}^+$  mediada por el canal Hv1. Además, se demostró que esta corriente presenta mayor magnitud en espermatozoides capacitados [64]. Como se mencionó anteriormente (Fig. 1), este canal se localiza exclusivamente en la región de la pieza principal del espermatozoide [64]. A raíz de estas observaciones, se propuso que este canal es el principal mecanismo para la regulación del pHi [64,65,67], aunque en ninguno de esos trabajos se presentó evidencia experimental que indague el rol de Hv1 en este proceso.

Para demostrar la participación de dicho canal en el proceso de alcalinización asociada a la capacitación espermática, se emplearon espermatozoides teñidos con BCECF, los cuales se incubaron en presencia de  $200 \mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$  ya que el catión  $\text{Zn}^{2+}$  es un inhibidor de este canal [81]. De igual manera se emplearon espermatozoides incubados en presencia del vehículo ( $\text{H}_2\text{O}$ ) a manera de control. Las mediciones de fluorescencia se realizaron y analizaron igual que los experimentos descritos en las secciones anteriores. El efecto del  $\text{Zn}^{2+}$  en la zona de la cabeza de los espermatozoides fue altamente variable, pero se observó una reducción estadísticamente significativa tras 240 min de capacitación ( $F_{\text{rel}(\text{Zn}^{2+}-240')} = 1.02 \pm 0.2$  vs  $F_{\text{rel}(\text{veh}-240')} = 1.10 \pm 0.01$ ,  $p = 0.016$ ) (Fig. 9b). En contraste, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la fluorescencia de la pieza media en ninguno de los tiempos de capacitación evaluados. Mientras que en la pieza principal, se observó una reducción estadísticamente significativa a los 7, 60 y 240 min de incubación en medio capacitante ( $F_{\text{rel}(\text{Zn}^{2+}-7')} = 1.02 \pm 0.12$  vs  $F_{\text{rel}(\text{veh}-7')} = 1.12 \pm 0.04$ ,  $p = 0.031$ ;  $F_{\text{rel}(\text{Zn}^{2+}-60')} = 1.01 \pm 0.02$  vs  $F_{\text{rel}(\text{veh}-60')} = 1.08 \pm 0.01$ ,  $p = 0.024$ ; y  $F_{\text{rel}(\text{Zn}^{2+}-240')} = 0.98 \pm 0.04$  vs  $F_{\text{rel}(\text{veh}-240')} = 1.06 \pm 0.01$ ,  $p = 0.015$  respectivamente) (Fig. 9b).

Mediante experimentos de electrofisiología en configuración de célula completa<sup>8</sup> se encontró que  $100 \mu\text{M}$  del inhibidor del canal Hv1 denominado 2-Guanidinobenzimidazol (2-GBI) reducen en un 70% la corriente de  $\text{H}^+$  (presumiblemente conducida a través de Hv1) en espermatozoides humanos [82]. Sin embargo, el 2-GBI presenta una baja permeabilidad a la membrana, hecho que resulta relevante por dos cosas: 1) el sitio de unión del 2-GBI a Hv1 es en la región intracelular [83], y 2) con la metodología utilizada, no es posible aplicar directamente el 2-GBI al citoplasma de los espermatozoides. Alternativamente, existe un compuesto derivado del 2-GBI que presenta mayor permeabilidad, el 5-Cl-Guanidinobenzimidazol (Cl-GBI). Al aplicar este compuesto en el medio de cultivo, se observó una inhibición de más del 80% de la corriente de  $\text{H}^+$  en ovocitos de *Xenopus* que expresan de manera heteróloga el canal Hv1 [83]. Hasta el momento de la realización de este proyecto, no

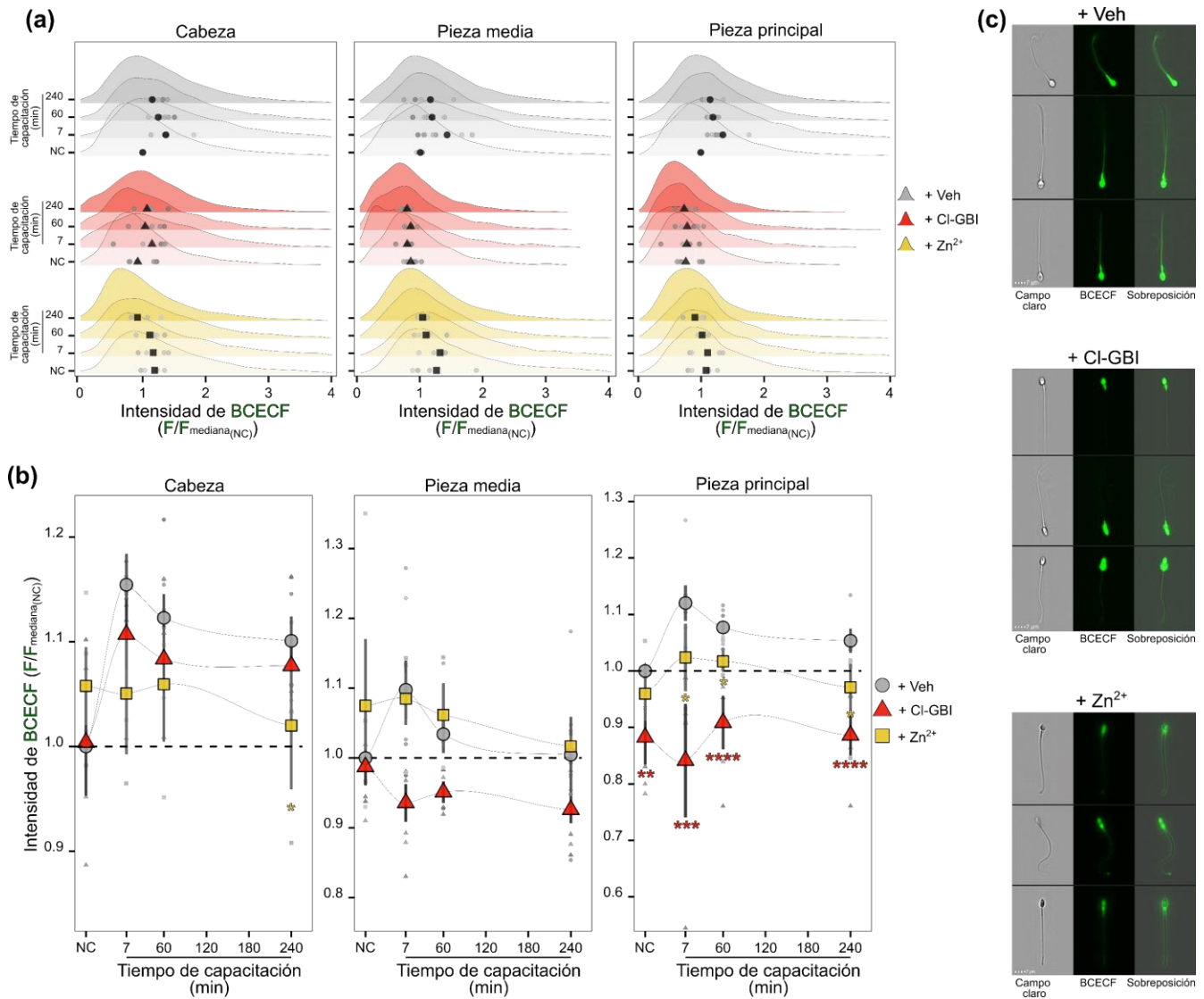
<sup>8</sup> En este tipo de experimentos, al establecerse el sello de alta resistencia entre la pipeta y la membrana, la solución contenida en la pipeta dializa la solución intracelular.



se encontró ningún reporte donde se utilice el CI-GBI en espermatozoides de humano. Por esta razón, en primera instancia se realizó un experimento incubando a los espermatozoides en presencia de 0, 2, 20, 40, 200, 400 y 1000  $\mu\text{M}$  de dicho compuesto y se evaluó su efecto en la viabilidad celular mediante el uso de la marca de PI. La concentración de 200  $\mu\text{M}$  mostró ser la concentración máxima que no provoca un efecto en la viabilidad ([Fig. S5a](#)). Por esta razón, se decidió emplearla para los experimentos de inhibición. De igual manera, se descartó la posibilidad de que este compuesto presentara algún tipo de interacción con el colorante BCECF de tal manera que afectara su espectro de fluorescencia de una manera independiente de los cambios de pHi en la célula. Para eso se disolvió 1  $\mu\text{M}$  de BCECF “libre”, es decir, el colorante sin el residuo acetometoxi ester en medio HTF no capacitante. Se realizó un registro de la fluorescencia de este colorante mediante espectrofluorimetría. Ninguna de las concentraciones utilizadas produjo cambios en el espectro de fluorescencia de este colorante ([Fig. S5b](#)). Una vez realizados estos controles, se procedió con el experimento de inhibición, para el cual se emplearon las mismas condiciones descritas para el experimento con  $\text{Zn}^{2+}$ . De manera interesante, al igual que el  $\text{Zn}^{2+}$ , el CI-GBI indujo una reducción significativa de la fluorescencia en la zona de a pieza principal tanto en condiciones no capacitantes ( $F_{\text{rel}(\text{CI-GBI-NC})} = 0.084 \pm 0.06$  vs  $F_{\text{rel}(\text{Veh-NC})} = 1.00 \pm 0.00$ ,  $p = 0.003$ ), como en condiciones de capacitación ( $F_{\text{rel}(\text{CI-GBI-7'})} = 0.84 \pm 0.2$  vs  $F_{\text{rel}(\text{Veh-7'})} = 1.12 \pm 0.04$ ,  $p = 0.0006$ ;  $F_{\text{rel}(\text{CI-GBI-60'})} = 0.91 \pm 0.06$  vs  $F_{\text{rel}(\text{Veh-60'})} = 1.08 \pm 0.01$ ,  $p = 6.1 \times 10^{-6}$ ; y  $F_{\text{rel}(\text{CI-GBI-240'})} = 0.89 \pm 0.06$  vs  $F_{\text{rel}(\text{Veh-240'})} = 1.06 \pm 0.01$ ,  $p = 2.8 \times 10^{-5}$ ). Al igual que el  $\text{Zn}^{2+}$ , no se observó que el CI-GBI produjera una reducción en los niveles de fluorescencia ni en la cabeza ni en la pieza media ([Fig. 9](#)).

Este resultado en conjunto con los mostrados en las secciones anteriores apoya la idea de que existe una regulación diferencial del pHi intracelular la cual depende en gran medida de la localización subcelular de las proteínas que participan en dicha regulación, así como de la región del espermatozoide en donde se encuentran (ver [Fig. 2](#)).





**Figura 9. El canal el Hv1 regula el pHi del flagelo, pero no de la cabeza.** (a) Histogramas de densidad de fluorescencia de BCECF de las células incubadas con los diferentes tratamientos: vehículo (Veh), y los inhibidores de Hv1,  $ZnCl_2$  ( $Zn^{2+}$ , 200  $\mu M$ ), y el Cl-GBI (30  $\mu M$ ). La información de la fluorescencia de BCECF se relativizó con respecto a la condición no capacitante incubadas con vehículo (NC-Veh) de acuerdo con la [ecuación 1](#). Cada histograma contiene la información de al menos 1000 células por donador. (b) Valores promedio de la fluorescencia relativizada de BCECF. Los puntos de colores indican el promedio  $\pm$  error estándar de la media. Las líneas curvadas en (b) corresponden al ajuste de un modelo de regresión local. Para las gráficas en (a) y (b) los puntos en escala de grises indican la mediana de la fluorescencia de cada donante ( $n = 5$ ). Se realizaron pruebas de Krustall-Wallis seguidas de comparaciones múltiples de cada tratamiento con respecto al vehículo para cada tiempo de incubación evaluado. \*  $p < 0.05$ , y \*\*  $p < 0.01$ . (c) Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con BCECF e incubados con los diferentes tratamientos empleados.



Los resultados de la sección anterior sugirieron que la vía de señalización que incluye la participación de la sAC y la PKA son fundamentales en la regulación polarizada del pHi. Considerando la evidencia de que el canal Hv1 también está involucrado en dicha regulación regionalizada del pHi es probable que, de alguna manera, Hv1 sea regulado por mecanismos río abajo de sAC/PKA. Hasta la fecha no hay reportes que indiquen que el canal Hv1 es blanco de fosforilación por PKA, ni que su actividad se regule de alguna manera por el AMPc. Una posibilidad es que existan proteínas intermediarias que se encuentran río abajo de la vía de  $\text{HCO}_3^-$ /sAC/AMPc/PKA, y cuya actividad converge de alguna manera en la activación de Hv1.

Dentro de los múltiples blancos que se encuentran río abajo de la activación de la vía de  $\text{HCO}_3^-$ /sAC/AMPc/PKA, se encuentra la activación de cinasas de tirosinas (TKs, por sus siglas en inglés), lo que provoca un aumento de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas [80,84,85], el cual ocurre mayoritariamente en la región del flagelo y en menor medida en la cabeza [73]. Recientemente, el grupo de la Dra. Vanina Da Ros (Universidad de Buenos Aires, Argentina) demostró que al incubar a los espermatozoides con antagonistas de las cinasas de tirosina PYK2 y FERT (responsables del aumento en la fosforilación de tirosinas asociada a la capacitación), se previene parcialmente la alcalinización intracelular asociada a la capacitación [86]. Dado que estos resultados se obtuvieron haciendo mediciones de la intensidad de fluorescencia de BCECF, pero utilizando citometría de flujo sin resolución espacial, surgió el interés de nuestro grupo de trabajo de evaluar si este efecto en el pHi tras el bloqueo de las TKs estaba también confinado al flagelo del espermatozoide. Por esta razón se estableció una colaboración con el grupo de la Dra. Da Ros para indagar la participación de PYK2 y FERT en la regulación subcelular del pHi en espermatozoides humanos y cuyos resultados describimos en esta tesis.

Para demostrar lo anterior, se realizó un experimento similar a los descritos anteriormente, con la diferencia que solo se evaluó la condición no capacitante y la condición de capacitación tras 240 min de incubación. La razón detrás de esto es que es necesario que pasen algunas horas de incubación en medio capacitante para que ocurra el aumento de residuos fosforilados en tirosinas controlado por las TKs. Por lo tanto, se incubaron espermatozoides cargados previamente con BCECF en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de PF431396, un antagonista con efecto inhibitorio tanto para la PYK2 como para FERT. De manera interesante, se observó que la incubación con este compuesto produjo una reducción de la  $F_{\text{rel}}$  con respecto a la incubación con vehículo (DMSO). Este efecto ocurrió en tanto en la pieza media como en la pieza principal, aunque solo fue estadísticamente significativa en esta última región ( $F_{\text{rel}}(\text{PF431396-240}') = 0.94 \pm 0.09$  vs  $F_{\text{rel}}(\text{Veh-240}') = 1.08 \pm 0.03$ ,  $p = 0.026$ ). Sin embargo, no se observó ninguna evidencia de un efecto inhibitorio en la región de la cabeza (Fig. 10).

Adicionalmente el grupo de la Dra. Da Ros también demostró que la inhibición de otra cinasa relevante en la fisiología espermática, la proteína cinasa C (PKC), también prevenía parcialmente el aumento del pHi asociado a la capacitación de espermatozoides humanos. A pesar de que se desconoce cuál es la cinética y la localización de las proteínas blanco de PKC, se sabe que esta cinasa se localiza tanto en el flagelo como en la



cabeza de los espermatozoides [87]. Adicionalmente, la actividad de la PKC en espermatozoides de cerdo está rí abajo de la activación de PKA [88]. Siguiendo con la colaboración establecida, se planteó determinar si el efecto de la inhibición de la PKC en el pHi también estaba confinado a la región del flagelo.

Para demostrar lo planteado anteriormente, se realizó el mismo tipo de experimento, pero incubando a los espermatozoides en presencia de 1  $\mu$ M de Gö6976, un inhibidor específico de PKC. El efecto producido por el Gö6976 resultó similar a lo observado con el PF431386, ya que también produjo una reducción de la fluorescencia con respecto a la condición control en la región de la pieza principal, aunque este resultado no fue estadísticamente diferente ( $F_{rel(PF431396-240')} = 1.00 \pm 0.04$  vs  $F_{rel(Veh-240')} = 1.08 \pm 0.03$ ,  $p = 0.061$ ). A su vez, no se observaron cambios considerables en la fluorescencia de BCECF ni en la zona de la cabeza ni en la pieza media. (Fig. 10).

Estas observaciones corroboran los datos obtenidos anteriormente que sugieren que las cinasas PKC, FERT y PYK2 participan en la regulación del pHi en los espermatozoides humanos. Además, refuerzan la noción de que la señalización que regula el pHi, se encuentra finamente regulada por diversas proteínas que requieren de una localización subcelular muy bien definida. Sin embargo, estos resultados abren la interrogante si el canal Hv1 se regula por fosforilación directa por estas cinasas, o bien, se requiere de algún mecanismo intermediario que converja en la regulación de Hv1 (ver discusión para mayor detalle).



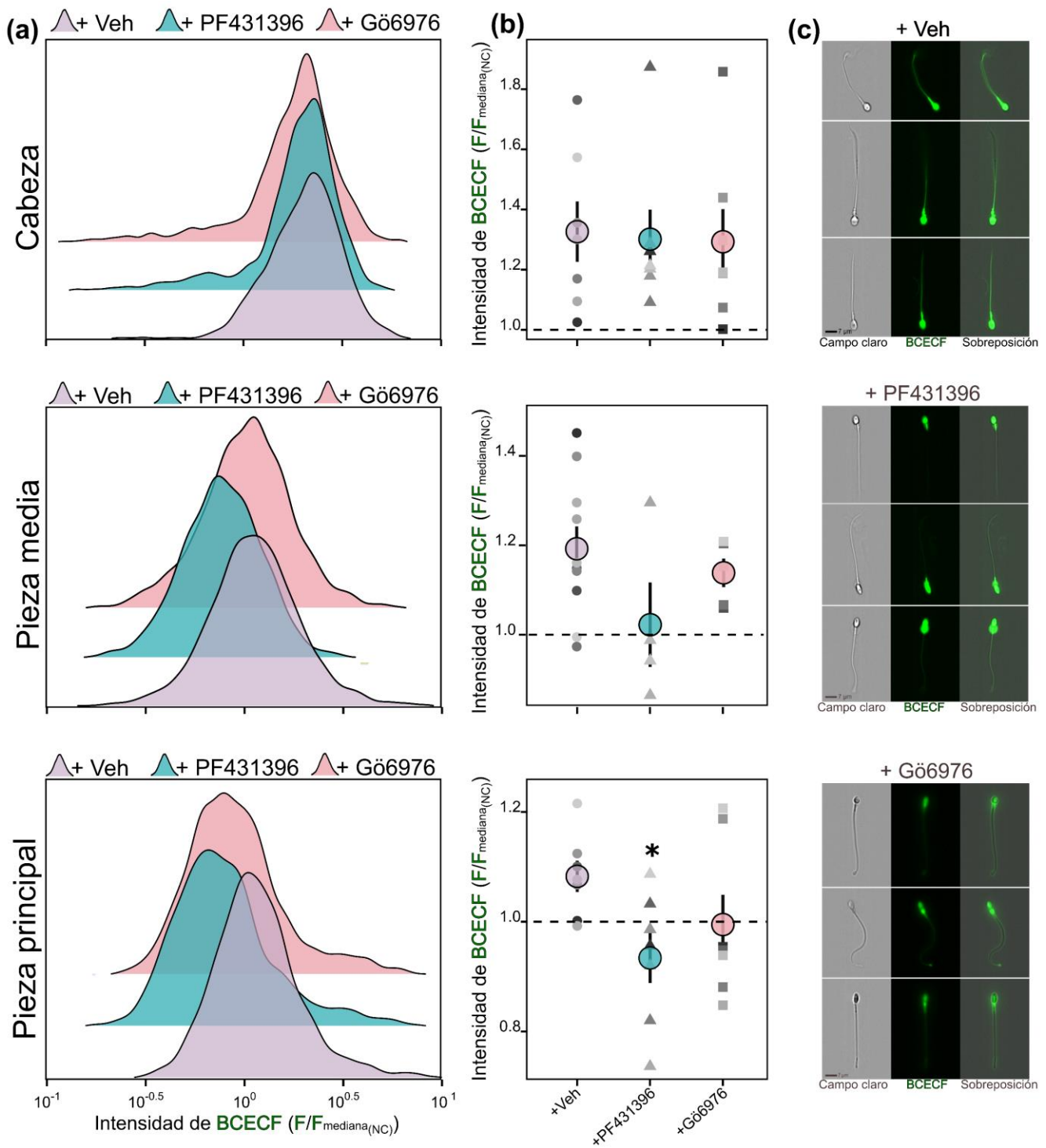


Figura 10. Las cinasas PYK2, FERT y PKC participan en la regulación regionalizada del pH durante la capacitación. (a) Histogramas de densidad de fluorescencia de BCECF de las células incubadas con los diferentes tratamientos: vehículo (Veh), inhibidor de PYK2 y de FERT (PF431396, 10  $\mu M$ ), o de la PKC (Gö6976, 1  $\mu M$ ). La información de la fluorescencia de BCECF se relativizó con respecto a la condición no capacitante incubadas con vehículo (NC-Veh, línea punteada) de acuerdo con la ecuación 1. Cada histograma contiene la información de al menos 1000 células por donador. (b) Valores promedio de la fluorescencia relativizada de BCECF. Los puntos de colores indican el promedio  $\pm$  error estándar de la media. Las líneas curvadas en (b) corresponden al ajuste de un modelo de regresión local. Para las gráficas en (a) y (b) los puntos en escala de grises indican la mediana de la fluorescencia de cada donante ( $n = 7$ ). Se realizaron pruebas de Krustall-Wallis seguidas de comparaciones múltiples de cada tratamiento con respecto al vehículo del tiempo 240 min. \*  $p < 0.05$  (c) Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con BCECF e incubados con los diferentes tratamientos empleados.



## Posible papel de la acetilación de lisinas como un mecanismo de regulación del pHi

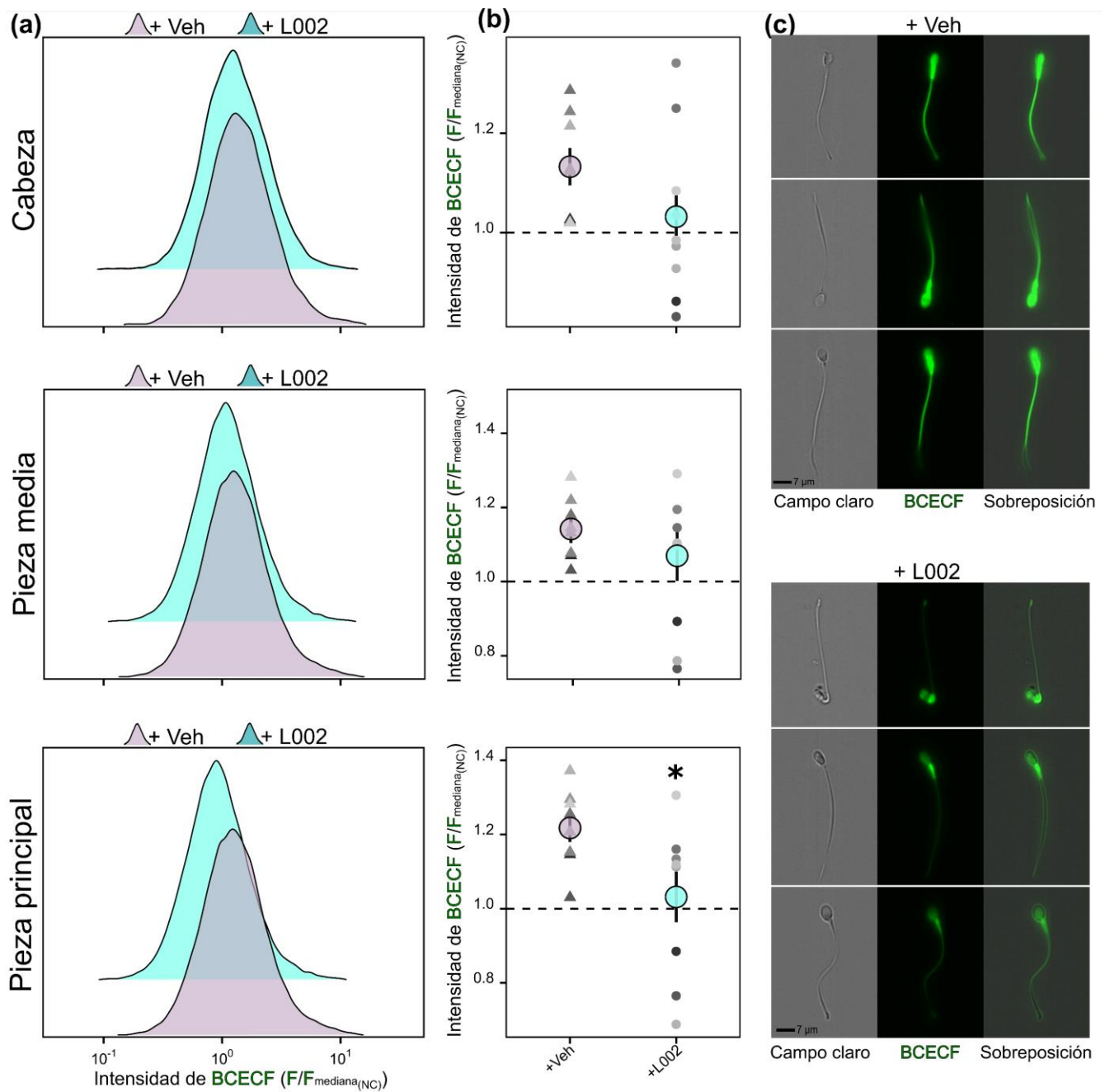
Anteriormente se describió que la vía de  $\text{HCO}_3^-/\text{sAC}/\text{AMPC}/\text{PKA}$  está involucrada en la regulación del pHi en espermatozoides humanos. Recientemente, el grupo del Dr. Darío Krapf (Universidad Nacional de Rosario, Argentina) demostró que durante la capacitación aumenta la proporción de proteínas acetiladas en residuos de lisinas en espermatozoides de ratón [14] y de humano (Darío Krapf, comunicación personal). Este tipo de modificación postraduccional favorece la aparición de procesos moleculares asociados a la capacitación, entre ellos el aumento en la actividad de a PKA. Aparentemente, el mecanismos de activación de PKA por acetilación es independiente del AMPC [14]. Toda esta evidencia sugiere que la acetilación de lisinas sea un mecanismo adicional que participa en la regulación del pHi durante la capacitación de los espermatozoides humanos. Por esta razón se estableció una colaboración con el grupo de la Dr. Krapf con el fin de indagar el papel de la acetilación de lisinas en la regulación subcelular del pHi en espermatozoides humanos.

Para demostrar el rol de este tipo de modificación postraduccional, se realizó un experimento similar a los descritos anteriormente. Para ello, se incubaron espermatozoides en medio que promueve la capacitación durante 240 min en presencia de 10  $\mu\text{M}$  del inhibidor de las acetiltransferasas (enzimas encargadas de transferir grupos acetilo desde la Acetil-CoA a los residuos de lisina no terminales) denominado L002<sup>9</sup>, o bien, otro grupo de espermatozoides se incubó durante el mismo tiempo en presencia del vehículo (DMSO). El uso de este compuesto prevendría el aumento de acetilación en lisinas asociados a la capacitación, por lo que de estar involucrado en la regulación del pHi, se observaría una reducción de este. Interesantemente, se observó que el tratamiento con L002 produjo una reducción de la fluorescencia del BCECF en la cabeza, la pieza media y la pieza principal, siendo en esta ultima la única región donde se observó significancia estadística ( $F_{\text{rel(L002-240-Cabeza)}} = 1.02 \pm 0.04$  vs  $F_{\text{rel(Veh-240-Cab)}} = 1.14 \pm 0.03$ ,  $p = 0.068$ ;  $F_{\text{rel(L002-240-Pieza media)}} = 1.05 \pm 0.05$  vs  $F_{\text{rel(Veh-240-Pieza media)}} = 1.16 \pm 0.01$ ,  $p = 0.07$ ; y  $F_{\text{rel(L002-240-Pieza principal)}} = 1.01 \pm 0.08$  vs  $F_{\text{rel(Veh-240-Pieza principal)}} = 1.21 \pm 0.02$ ,  $p = 0.025$ ) (Fig. 11).

---

<sup>9</sup> L002 es un inhibidor de la acetiltransferasa conocida como P300, pero también tiene actividad contra otros tipos de acetiltransferasas.





**Figura 11.** La inhibición de las acetiltransferasas previene parcialmente la alcalinización del pHi asociada a la capacitación. **(a)** Histogramas de densidad de fluorescencia de BCECF de las células incubadas con los diferentes tratamientos: vehículo (Veh) o inhibidor de las acetiltransferasas (L002, 10  $\mu$ M). La información de la fluorescencia de BCECF se relativizó con respecto a la condición no capacitante incubadas con vehículo (NC-Veh, línea punteada) de acuerdo con la [ecuación 1](#). Cada histograma contiene la información de al menos 1000 células por donador. **(b)** Valores promedio de la fluorescencia relativizada de BCECF. Los puntos de colores indican el promedio  $\pm$  error estándar de la media. Las líneas curvadas en **(b)** corresponden al ajuste de un modelo de regresión local. Para las gráficas en **(a)** y **(b)** los puntos en escala de grises indican la mediana de la fluorescencia de cada donante ( $n = 7$ ). Se realizaron pruebas de Krustall-Wallis seguidas de comparaciones múltiples de cada tratamiento con respecto al vehículo del tiempo 240 min. \*  $p < 0.05$  **(c)** Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con BCECF e incubados con los diferentes tratamientos empleados.





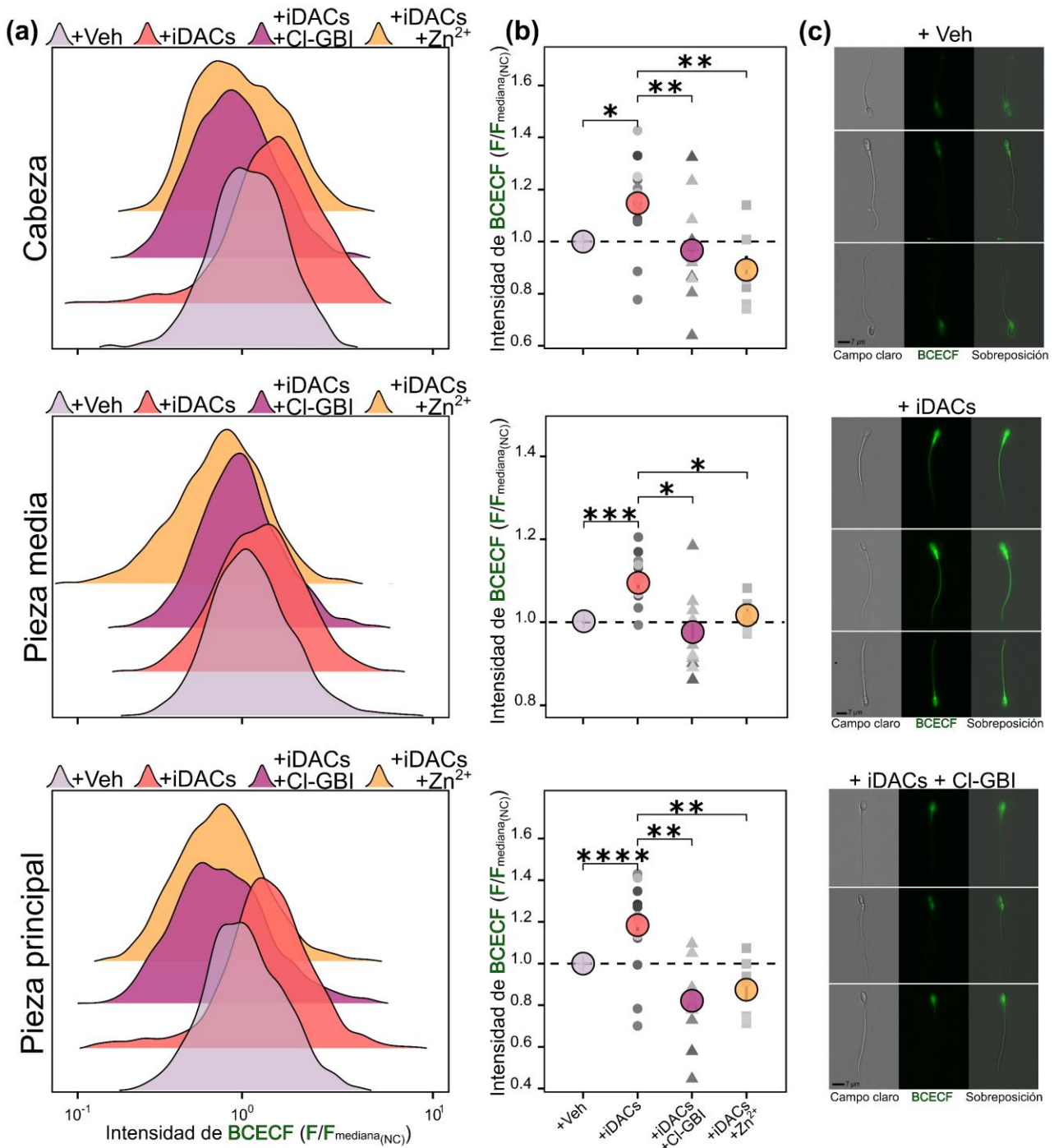
El resultado anterior sugiere que la acetilación de lisinas está relacionada con los procesos de regulación del pHi durante la capacitación. Con base en esta observación, se decidió realizar un experimento en donde se produjera un aumento de los residuos acetilados en lisinas en espermatozoides no capacitados. De esta manera, es posible general un estado de “hiperacetilación” como el que ocurriría en condiciones capacitantes. Para ello, los espermatozoides se utilizaron dos compuestos: el tricostatin A (TSA) y la nicotinamida (NAM). La combinación de estos fármacos inhibe la actividad de las enzimas conocidas como deacetilasas, y por lo tanto aumentan el grado de acetilación de las proteínas, induciendo un estado de hiperacetilación. En este sentido, catalizan la reacción contraria a las acetiltransferasas, las cuales remueven el grupo acetilo de los residuos de lisinas de las proteínas modificadas, y lo transfieren a la CoA. Para este experimento se emplearon espermatozoides cargados con BCECF e incubados en medio no capacitante durante 180 min en presencia de 25  $\mu\text{M}$  de TSA y 500  $\mu\text{M}$  de NAM. En adelante, a la combinación de TSA y NAM se le denominó como iDACs (inhibidores de deacetilasas). Sorpresivamente, estos compuestos que promueven la acetilación, produjeron un aumento estadísticamente significativo en la fluorescencia del BCECF en las tres regiones subcelulares del espermatozoide ( $F_{\text{rel(iDACs-180'-Cabeza)}} = 1.18 \pm 0.01$  vs  $F_{\text{rel(Veh-180'-Cab)}} = 1.00 \pm 0.00$ ,  $p = 0.025$ ;  $F_{\text{rel(iDACs-180'-Pieza media)}} = 1.09 \pm 0.01$  vs  $F_{\text{rel(Veh-180'-Pieza media)}} = 1.00 \pm 0.00$ ,  $p = 0.0004$ ; y  $F_{\text{rel(iDACs-180'-Pieza principal)}} = 1.19 \pm 0.02$  vs  $F_{\text{rel(Veh-180'-Pieza principal)}} = 1.00 \pm 0.00$ ,  $p = 3.21 \times 10^{-5}$ ) (Fig. 12).

Los resultados descritos previamente sugieren que la acetilación de proteínas en residuos de lisinas participa de alguna manera en la regulación del pHi. Sin embargo, aún resta determinar cuál o cuáles son las proteínas que son blancos de acetilación y/o fosforilación por PKA u otras cinasas que efectúan los cambios en las concentraciones de  $\text{H}^+$ . En relación con esto, mediante el uso de técnicas de proteómica se dio a conocer la identidad de las proteínas que sufren acetilación en espermatozoides humanos. Interesantemente, se encontró que en condiciones no capacitantes el canal Hv1 no se encuentra acetilado [89], pero tras un periodo de incubación en condiciones capacitante, aparentemente, el canal posee una acetilación en la lisina 252 [90]. Esta observación sugiere que posiblemente la actividad de esta proteína está regulada directamente por acetilación.

Por lo mencionado anteriormente, se realizó un experimento estimulando la “hiperacetilación” de lisinas mediante el tratamiento con iDACs en presencia de los inhibidores del canal Hv1, Cl-GBI y  $\text{Zn}^{2+}$ , ambos a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ . Interesantemente, el tratamiento con los inhibidores del canal previno el aumento de la fluorescencia del BCECF producido por los iDACs. Este efecto resultó ser estadísticamente significativo en todas las regiones subcelulares del espermatozoide (Fig. 12).

En conjunto, estos resultados confirman que la acetilación de lisinas es un mecanismo de señalización que participa en la regulación del pHi durante el proceso de capacitación, y que, probablemente Hv1 es blanco de acetilación durante la misma. Por esta razón, surge la necesidad de comprobar a nivel experimental si en efecto Hv1 es acetilado durante la capacitación y cuál es la consecuencia a nivel funcional de dicha modificación postraduccional.





**Figura 12.** La inducción farmacológica de un estado de hiperacetilación provoca un aumento del pHi. **(a)** Histogramas de densidad de fluorescencia de BCECF de las células incubadas con los diferentes tratamientos: vehículo (Veh), inhibidores de las deacetilasas (iDACs, 25 μM de TSA y 500 μM de NAM), inhibidores de Hv1 (200 μM) o ZnCl<sub>2</sub> (200 μM) en presencia de iDACs. La información de la fluorescencia de BCECF se relativizó con respecto a la condición no capacitante incubadas con vehículo (NC-Veh, línea punteada) de acuerdo con la [ecuación 1](#). Cada histograma contiene la información de al menos 1000 células por donador. **(b)** Valores promedio de la fluorescencia relativizada de BCECF. Los puntos de colores indican el promedio ± error estándar de la media. Las líneas curvadas en **(b)** corresponden al ajuste de un modelo de regresión local. Para las gráficas en **(a)** y **(b)** los puntos en escala de grises indican la mediana de la fluorescencia de cada donante (n = 11). Se realizaron pruebas de Krustall-Wallis seguidas de comparaciones múltiples de cada tratamiento con respecto al vehículo del tiempo 240 min. \* p<0.05 **(c)** Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con BCECF e incubados con los diferentes tratamientos empleados.



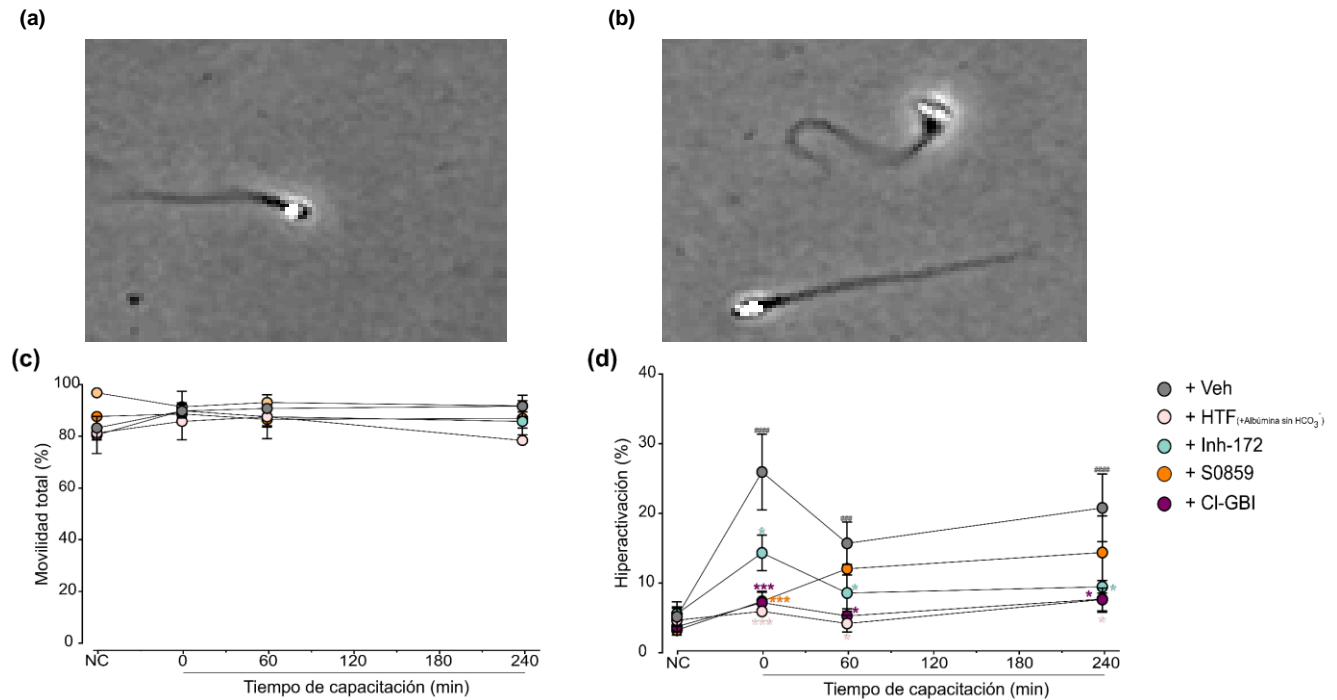
### *Participación de las proteínas de control del pHi en la regulación de la movilidad hiperactivada*

Los resultados descritos anteriormente indican que la regulación del pHi es bastante compleja, y que aparentemente requiere de la participación de múltiples proteínas, cuya actividad coincide de manera total o parcial con su localización subcelular. Como se mencionó en la introducción, un pHi alcalino es un mecanismo de señalización esencial para que ocurran múltiples procesos asociados a la capacitación, como el desarrollo de la movilidad hiperactivada [15,91]. Por esta razón, se decidió investigar si el bloqueo farmacológico de CFTR, NBC o Hv1 tenía algún efecto en la hiperactivación. Para ello, se empleó un sistema de medición automática de la movilidad espermática, y se midió el porcentaje de movilidad total (Fig. 13a) y de movilidad hiperactivada (Fig. 13b) en la población de espermatozoides en presencia o ausencia de Inh-172 (5  $\mu$ M), S0859 (5  $\mu$ M), CI-GBI (200  $\mu$ M), o bien la incubación en ausencia de  $\text{HCO}_3^-$  (ver detalles experimentales).

Sorpresivamente, ninguna de las condiciones evaluadas produjo un cambio en la movilidad total (Fig. 13c). Con respecto a la movilidad hiperactivada, se observó que en condiciones control (Veh) el porcentaje de células hiperactivadas aumentó de manera significativa tras a los 7 min del inicio de la capacitación ( $\%HA_{(\text{Cap-7-Veh})} = 26.2 \pm 12$ ) en comparación con la condición no capacitante ( $\%HA_{(\text{NC-Veh})} = 5.3 \pm 8$ ,  $p = 4.1 \times 10^{-6}$ ). Tras los 60 y 240 min de incubación en medio capacitante el porcentaje de células hiperactivada disminuyó, pero se mantuvo significativamente más alto que la condición NC ( $\%HA_{(\text{Cap-60-Veh})} = 16.4 \pm 8$ ,  $p = 0.0061$ ;  $\%HA_{(\text{Cap-240-Veh})} = 20.8 \pm 6$ ,  $p = 2.4 \times 10^{-5}$ ). Ninguno de los tratamientos empleados indujo un cambio significativo en la proporción de células hiperactivadas cuando los espermatozoides se incubaron en condiciones no capacitantes. En contraste, cuando los fármacos se emplearon en condiciones capacitantes, todos los tratamientos produjeron, a diferentes niveles, una reducción en la hiperactivación en comparación con las condiciones control. Por ejemplo, el tratamiento con el CI-GBI previno completamente el desarrollo de la hiperactivación ( $\%HA_{(\text{CI-GBI})} = 8.2 \pm 4$ ,  $5.7 \pm 3$ , y  $8.9 \pm 4$  para los 7, 60 y 240 min de capacitación respectivamente). Resultados similares se obtuvieron cuando las células se incubaron en un medio HTF suplementado con albúmina, pero no con  $\text{HCO}_3^-$  ( $\%HA_{(+\text{albúmina sin HCO}_3^-)} = 5.9 \pm 1$ ,  $4.4 \pm 3$ , y  $8.9 \pm 3$  para los 7, 60 y 240 min de capacitación respectivamente). Por otro lado, tras 7 min de incubación en medio capacitante en presencia del Inh-172, el porcentaje de hiperactivación aumento con respecto a la condición NC, aun así, resulto ser estadísticamente menor que la condición control ( $\%HA_{(\text{Inh-172-7'})} = 14.6 \pm 5$ ,  $p = 0.033$ ). Tras 60 y 240 min de incubación en estas condiciones la hiperactivación disminuyó siendo estadísticamente diferentes en comparación con el vehículo ( $\%HA_{(\text{Inh-172-60'})} = 9.2 \pm 5$ ,  $p = 0.031$ ; ( $\%HA_{(\text{Inh-172-240'})} = 9.3 \pm 2$ ,  $p = 0.039$ m respectivamente). Finalmente, en los espermatozoides que se incubaron en condiciones capacitantes en presencia de S0859, se observó una reducción en el número de células hiperactivas que fue significativamente a los 7 min de incubación ( $\%HA_{(\text{S0859-7'})} = 8.1 \pm 3$ ,  $p = 0.0005$ ). A los 60 y 240 min de incubación en estas condiciones, se observó que el porcentaje de hiperactivación aumentó y ya no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo (Fig. 13d).



El desequilibrio del pH<sub>i</sub> provocado por los diferentes compuestos evaluados generó diferentes niveles de inhibición de la hiperactivación, pero no de la movilidad total. Todo esto sugiere que se requiere de una adecuada regulación del pH<sub>i</sub> para que el espermatozoide pueda llevar a cabo funciones tan importantes como este tipo de tan especial del batido flagelar.



**Figura 13.** La inhibición de algunas de las proteínas que regulan el pH<sub>i</sub> durante la capacitación repercute en la movilidad hiperactivada. Video de células representativa que ilustran la movilidad progresiva no hiperactivada (a), hiperactivada (b, arriba) e inmóvil (b, abajo) (dar clic en las imágenes para reproducir el video). (c) Gráfica de puntos que ilustra la proporción de células que presentan cualquier tipo de movilidad de las células incubadas con los diferentes tratamientos: vehículo (Veh), medio HTF suplementado con albúmina, pero no con HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (HTF +albúmina sin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), inhibidor del canal CFRT (Inh-172, 5 μM), antagonista de los transportadores NBC (S0859, 5 μM), y bloqueador del canal Hv1 (Cl-GBI, 200 μM). (d) Proporción de hiperactivación de células tratadas en las condiciones antes descritas. Los puntos representan el promedio ± el error estándar de la media de al menos 5 experimentos independientes por cada condición. Los datos se analizaron mediante una prueba de ANOVA, comparando los niveles de movilidad en presencia del vehículo con respecto a la condición NC-Veh (####*p*<0.001 y #####*p*<0.0001). O bien, los datos de las condiciones en presencia de los fármacos se compararon con su respectivo tiempo en presencia del vehículo (\**p*<0.05 y \*\*\**p*<0.001).



## DISCUSIÓN

### *El pHi durante la capacitación y su regulación espaciotemporal*

La alcalinización del pHi durante el proceso de capacitación se considera como un marcador molecular de este proceso. Desde 1997 se reportó que el pHi de los espermatozoides humanos aumenta en aproximadamente 0.2 unidades tras 24 horas de incubación en un medio que promueve el proceso de capacitación *in vitro* [33]. Sorpresivamente, a pesar del avance en el entendimiento de la capacitación, y sobre todo, la aceptación generalizada de que el pHi es un marcador de la ocurrencia de este proceso [10,72], hasta el momento del inicio de este proyecto diversos aspectos relacionados con la regulación a nivel molecular del pHi aún se desconocían. Especialmente aquellos relacionados con dinámica temporal, la regionalización, y los mecanismos de control de este fenómeno.

Durante el periodo de realización de este trabajo se publicó un estudio en donde se analizó cómo el pHi cambia durante la capacitación. Los autores reportaron que el pHi intracelular<sup>10</sup> presenta un aumento tan pronto como a los 10 min del inicio de la incubación en medio capacitante. Tras 60 min de incubación se alcanza un pico, el cual se mantiene relativamente constante hasta completar 240 min de capacitación [86]. Para el momento en que fue publicado dicho trabajo, nosotros ya contábamos con las mediciones ilustradas en la [figura 3](#). Si bien nuestros resultados coinciden con dicho reporte, en este trabajo se añadió un nuevo nivel de detalle a dicho análisis que no se había abordado anteriormente, el cual consistió en la observación de que los cambios de pHi intracelular ocurren de manera diferencial en cada región subcelular. A partir de dicho análisis con resolución subcelular, se encontró que es en la región de la cabeza y de la pieza principal es donde se observaron los cambios de pHi más relevantes, mientras que, sorpresivamente, en la pieza media no se detectaron cambios durante el transcurso de la capacitación. El conjunto de estos resultados sugiere que, durante la capacitación de los espermatozoides humanos, los mecanismos que gobiernan el balance de la concentración de H<sup>+</sup> son reguladores de manera tal que existen variaciones no solo a nivel temporal, sino también a nivel subcelular, sugiriendo la presencia de mecanismos de regulación altamente polarizados en este tipo celular.

Retomando la observación que demuestra la aparente ausencia de cambios de fluorescencia de la sonda sensible a pH en la región de la pieza media. Es importante mencionar que es en esta zona donde se encuentra la gota citoplásmica, así mismo, es el único lugar del espermatozoide en donde se localizan sus mitocondrias (ver [Fig. 1](#) para una ilustración detallada de esta región). Debido a la naturaleza de esta región subcelular sumada a la estructura química del colorante empleado (BCECF), no es posible descartar la posibilidad de que esta molécula se pueda distribuir tanto en el citoplasma de la pieza media como el citoplasma contenido en la gota citoplásmica, y posiblemente en el espacio intermembrana (im) y la matriz de la mitocondria (mat).

---

<sup>10</sup> Los autores de dicho trabajo también emplearon el colorante sensible a pH BCECF para evaluar los cambios en el pHi. No obstante, no se emplearon mediciones regionalizadas.



Adicionalmente, el pH reportado para estos dos últimos compartimientos ( $pH_{im} = 7.7$  y  $pH_{mat} = 6.8$  respectivamente [92]) está dentro del intervalo que puede ser detectado por el BCECF dado su  $pK_a = 7.2$ . No hay reportes en donde se evalúe el pH de la gota citoplásmica ( $pH_{gc}$ ) por lo que se desconoce cuál puede ser su contribución a la señal de fluorescencia del BCECF. Por otro lado, en la región de la cabeza también se encuentran estructuras intracelulares como lo es el núcleo y el acrosoma (ver Fig. 1). Con respecto a este último, se determinó que el pH acrosomal ( $pH_{acr}$ ) es más bien ácido ( $pH_{acr} \approx 5.0$  [93]<sup>11</sup>), por lo que la interferencia de esta región en las mediciones de fluorescencia del BCECF puede ser descartada. Dada la naturaleza del núcleo, en donde los poros nucleares permiten el paso de moléculas de hasta 9 nm de diámetro, es posible que el BCECF también pueda ingresar a su interior. Se considera que el pH nuclear ( $pH_{nuc}$ ) es igual al pH del citoplasma ( $pH_{cit}$ ) ya que los  $H^+$  serían capaces de difundir libremente dentro del núcleo [94], aunque existen reportes que en células musculares hay un gradiente de  $H^+$  entre el citoplasma y el interior nuclear de aproximadamente 0.15 unidades de pH [95]. Por lo que, en caso de que el BCECF sea capaz de difundir al interior del núcleo del espermatozoide, esto generaría una interferencia adicional en las mediciones de la fluorescencia del BCECF. Para el caso de los espermatozoides no hay estudios en donde se explore el  $pH_{nuc}$ . Por todo esto, en caso de que las moléculas de BCECF difundan al interior de estos organelos, esto generaría señales mixtas de fluorescencia, causando artefactos experimentales e impediría la correcta interpretación de los resultados. Para poder distinguir la señal de fluorescencia del citoplasma con respecto a la de la mitocondria u otros organelos, sería necesario contar con aproximaciones experimentales que permitan el análisis con mayor resolución espacial, sondas o proteínas fluorescentes<sup>12</sup> sensibles al pH con una localización específica hacia un organelo particular.

Considerando lo expuesto en el párrafo anterior, es pertinente mencionar que, en cualquier intento de evaluación del  $pH_i$ , a menos que se empleen herramientas que permitan discernir entre el  $pH_{cit}$  y el pH en el resto de los organelos, las mediciones obtenidas corresponderán a la señal mezclada del citoplasma y los organelos (especialmente cuando se usen colorantes fluorescentes sin especificidad hacia un organelo particular). En adelante, cada vez que se haga referencia al pH intracelular ( $pH_i$ ) se debe de considerar que esto representa el balance entre los distintos niveles de fluorescencia detectados con el colorante BCECF, los cuales tienen su origen en la regulación diferencial de la concentración de  $H^+$  dentro de cada organelo. No obstante, el hecho de que en este trabajo fue posible realizar mediciones de fluorescencia de BCECF en tres regiones subcelulares del espermatozoide (la cabeza, la pieza media, y la pieza principal), representó una ventaja con respecto a trabajos previos, ya que permitió encontrar diferencias significativas en la regulación del pH en cada una de estas regiones.

---

<sup>11</sup> Este dato se calculó para espermatozoides de ratón.

<sup>12</sup> El uso de proteínas fluorescentes que puedan ser dirigidas hacia algún organelo es un herramienta que exclusivamente puede ser utilizada en modelos animales debido a que no es posible realizar este tipo de edición genética en humanos.



Como ejemplo de esto, en las mediciones del pHi obtenidas con una técnica de citometría que carece de resolución espacial, se observó que el pHi incrementó en promedio 0.18 unidades tras la capacitación (Fig. 5). No obstante, este aumento no resultó ser estadísticamente significativo. Una posible explicación es que debido a que las señales de la cabeza, la pieza media<sup>13</sup> y la pieza principal están mezcladas en una sola lectura, esto puede minimizar los cambios observados regionalizados reportados en la figura 3.

Si se considera la tasa de difusión de los H<sup>+</sup> en medio acuoso ( $93 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ), sería posible suponer que el pHi sería equilibrado rápidamente en el interior celular. No obstante, dentro del citoplasma existen componentes que, entre otras cosas, reducen la tasa de difusión de los H<sup>+</sup> casi 68 veces en medio ácido y neutro ( $1.4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ), o 22 veces en medio alcalino ( $4.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) [96]. No obstante, esta reducción en la velocidad de difusión en los H<sup>+</sup>, no explicaría el origen de la heterogeneidad observada en los cambios de pHi en cada región del espermatozoide durante la capacitación. Una explicación alternativa es que cada región subcelular posee un conjunto único de proteínas y mecanismos de amortiguación del pHi que, en su conjunto, generan esta regulación diferencial del pH. Con respecto a esto, es altamente probable que la acción de diversas proteínas pueda influir en este proceso. Existen reportes que indican que la actividad de ciertos intercambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> [97,98], de algunas anhidrasas carbónicas [99], e inclusive del canal Hv1 [100] generan cambios muy localizados en la concentración de H<sup>+</sup>, lo que tiene como consecuencia, la formación de micro y nanodominios de pHi [65,100]. Aunado a esto, algunas de estas proteínas presentan una distribución diferencial en el espermatozoide de humano (ver Fig. 2). Por todo lo anterior, en este estudio se consideró la hipótesis de que la localización diferencial de estas proteínas podría explicar, de manera total o parcial, la heterogeneidad observada de los niveles de pHi durante la capacitación. A continuación se discuten algunos aspectos en relación con los resultados obtenidos considerando esta premisa.

### *Regulación a nivel molecular del pHi en los espermatozoides humanos*

El influjo de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es necesario para que ocurra la alcalinización del pHi durante la capacitación: rol de los cotransportadores de Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NBC), y del canal de Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (CFTR)

Como se describió anteriormente, la albúmina y el anión HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> son dos de los componentes que desencadenan vías de señalización que permiten promover la capacitación espermática. Previamente, en experimentos realizados con espermatozoides de ratón midiendo el pHi mediante la fluorescencia de BCECF, se reportó que la adición de 15 mM de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> al medio no produjo cambios en el pHi [101]. En un trabajo más reciente, nuestro grupo de trabajo demostró que la adición de 10 mM de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> del lado extracelular provocaron un aumento en el pHi de espermatozoides de ratón y de humano [102]. De manera interesante, en este trabajo se observó que no ocurrieron cambios en el pHi de los espermatozoides incubados en un medio suplementado únicamente con

---

<sup>13</sup> Considerar lo reportado en la figura 3, de que la fluorescencia de BCECF en la pieza media tiende a presentar una disminución en vez de un aumentar.



albúmina, pero no con  $\text{HCO}_3^-$ , ni cuando se incubaron en presencia del inhibidor general del transporte aniónico, DIDS ([Fig. 6](#)).

A raíz de estos resultados se planteó indagar el posible rol del transporte de  $\text{HCO}_3^-$  a través de proteínas transmembranales sensibles a DIDS. Un trabajo reciente de nuestro grupo puntualizó el papel de los cotransportadores de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  de la familia SLC4, mejor conocidos como los NBC, como las proteínas responsables de inducir un influjo de  $\text{HCO}_3^-$  tras la exposición a un medio capacitante, y cuya actividad es inhibida por DIDS [\[48\]](#). Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que el bloqueo farmacológico con el antagonista específico de los NBC, el S0859, produce una disminución del pHi en condiciones no capacitantes. Es importante mencionar que durante la eyaculación, los espermatozoides entran contacto con una mayor concentración de  $\text{HCO}_3^-$  con respecto al fluido del epidídimo [\[78,103\]](#). Sin embargo, cuando se realiza el protocolo de aislamiento de los espermatozoides del fluido seminal, se utilizó el medio HTF que no promueve la capacitación al ser libre de  $\text{HCO}_3^-$  (ni albúmina). De tal manera que, esta disminución en la concentración de este anión puede tener como consecuencia una reducción del pHi. Posiblemente, la inhibición de los NBC exacerba la acidificación provocada por la remoción del  $\text{HCO}_3^-$  extracelular. Tras la adición de medio capacitante, se restauraría la presencia de  $\text{HCO}_3^-$  en el medio, lo que estimularía nuevamente la actividad de los NBC. Sin embargo, la presencia del antagonista de los NBC, S0859 no impidió el aumento del pHi estimulado por el medio de capacitación. Aunque después de 60 y 240 min de capacitación en presencia de dicho antagonista el nivel de pHi fue menor que la condición control, especialmente en la pieza principal. En relación a esto, se sabe que la incubación en medio capacitante durante 60 min en presencia del inhibidor de los NBC previene el aumento de residuos fosforilados por la PKA [\[48\]](#). Esto cobra relevancia ya que ambos eventos dependen del ingreso de  $\text{HCO}_3^-$  al citoplasma de los espermatozoides. Hasta la fecha, se desconoce la identidad de los transportadores NBC presentes en los espermatozoides. Por lo que sería relevante hacer estudios que corroboren su expresión y localización. Entre los posibles candidatos que cumplirían con las características de los NBC en espermatozoides se encuentran el NBCe1 o el NBCe2 (SLC4A4 y SLC4A5 respectivamente) cuya estequiometría induciría un transporte electrogénico de  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  [\[35,53\]](#). En conjunto, estos resultados sugieren que el influjo de  $\text{HCO}_3^-$  mediado por la actividad de los cotransportadores NBC es relevante tras varias horas de incubación en medio capacitante, sin embargo, parece que otra proteína capaz de transportar  $\text{HCO}_3^-$  y cuya actividad es sensible a DIDS sería la responsable de generar el aumento de la concentración de este anión que ocurre en los primeros minutos de capacitación.

Reportes previos indicaron que los espermatozoides humanos incubados durante 300 min en presencia de Inh-172, un antagonista del canal de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ , CFTR, previene el aumento de pHi inducido por el medio capacitante [\[59\]](#). Al igual que el tratamiento con S0859, la incubación con el antagonista del canal CFTR, Inh-172, también previno el aumento en la fosforilación de residuos de serina y treonina mediado por PKA [\[59\]](#). Todo esto supone que la participación de CFTR en la capacitación, podría estar relacionada con su actividad de transporte





de  $\text{HCO}_3^-$ , convirtiéndolo en un candidato para fungir como la proteína responsable de generar el aumento en la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  intracelular que ocurre dentro de los primeros minutos de capacitación. Los resultados obtenidos en este trabajo corroboraron la observación de que la participación de CFTR en la regulación del  $\text{pHi}$  durante la capacitación cobra relevancia solamente después de 240 min de incubación en condiciones capacitantes. Experimentos realizados en espermatozoides de ratón han determinado que la corriente de aniónica mediada por el CFTR es más selectiva a  $\text{Cl}^-$  que a  $\text{HCO}_3^-$  [104]. Por otro lado, la evidencia obtenida a través de la expresión heteróloga de CFTR sugiere que el canal conduce  $\text{Cl}^-$  al interior celular mientras que el  $\text{HCO}_3^-$  es extruido al exterior [105]. La evidencia también indica que esta salida de  $\text{HCO}_3^-$  puede ser mediada por el propio canal, o bien, por algún otro transportador. En ese sentido, se sabe que en espermatozoides de ratón, los intercambiadores de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  sensibles a DIDS miembros de la familia SLC26, el SLC26A3 y el SLC26A6, interactúan directamente con el CFTR [43]. Se postula que la entrada de  $\text{Cl}^-$  a través de CFTR es necesaria para que ocurra la entrada de  $\text{HCO}_3^-$  mediada por SLC26A3 o SLC26A6 [43,45]. Esta evidencia se apoya con los resultados obtenidos de la incubación de los espermatozoides en medios con bajo contenido de  $\text{Cl}^-$  extracelular, en donde no ocurren diversos fenómenos asociados a la capacitación como el aumento de residuos fosforilados por PKA [59] o el aumento del  $\text{pHi}$  inducido por el medio capacitante [45]. Aunque se sabe que estos transportadores están presentes en el espermatozoide humano [49], se desconoce si estos interactúan con el CFTR. Actualmente no existen antagonistas específicos para estos transportadores lo que dificulta su estudio. Por otro lado, la inhibición de CFTR por acción del Inh-172 demostró tener un mayor efecto en la cabeza, lo que coincide con la localización de este presunto transportador en la región de la zona ecuatorial de la cabeza [58,68,69]. De manera interesante se demostró que un miembro de la familia SLC4, el intercambiador de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  independiente de  $\text{Na}^+$ , también conocido como intercambiador aniónico 1 (AE1) o SLC4A1, se expresa en espermatozoides humanos y su localización coincide con el CFTR en la zona ecuatorial de la cabeza [54]. Cabe destacar que la actividad del AE1 también es sensible a DIDS, por lo que es otra proteína que puede estar participando en la regulación del  $\text{pHi}$ . No obstante, es importante mencionar que el Inh-172, también produjo (aunque de manera no significativa) una reducción del  $\text{pHi}$  en la pieza media y en la pieza principal. De manera interesante, el canal CFTR y los transportadores también se localizan en la pieza media de los espermatozoides humanos [49,58,68,69], aunque estos últimos también se localizan en la pieza principal [49]. Es necesario obtener mayor evidencia que permita determinar cuál es la participación del canal CFTR y de los transportadores SLC26A3, SLC26A6 y AE1 en la regulación del  $\text{pHi}$  en espermatozoides de humano, especialmente, sería interesante indagar si la localización heterogénea de estos últimos afecta la regulación subcelular del  $\text{pHi}$ .



## Posible rol de la albúmina en el incremento de pHi asociado a la capacitación

Retomando los resultados descritos en la [figura 6](#), se encontró que la incubación en presencia de albúmina durante 240 indujo un incremento en el pHi localizado únicamente en la región de la pieza media<sup>14</sup> ([Fig. 6](#)). Durante mucho tiempo se consideró que el papel de la albumina en la regulación molecular de la capacitación de los espermatozoides subyacía en su cualidad de ser un aceptor de esteroides. Se considera que la remoción del colesterol de la membrana plasmática es un mecanismo de señalización que favorece el proceso de capacitación [[106](#)]. Cuando los espermatozoides se capacitan en un medio con una elevada concentración de colesterol extracelular, se impide el desarrollo de múltiples aspectos asociados a la capacitación [[107](#)], incluyendo el aumento del pHi [[33](#)]. En relación con esto, recientemente nuestro grupo de trabajo demostró que la albúmina se une al canal Hv1, lo que induce un aumento en su conductividad. Este efecto de la albúmina sobre Hv1, es independiente de la capacidad de la albúmina de unirse al colesterol [[108](#)]. La activación de este canal por la albúmina podría explicar la observación de que la incubación con albumina en ausencia de  $\text{HCO}_3^-$  induce un aumento del pHi en la pieza media, aunque no explicaría por qué no se observa este incremento en la pieza principal, ya que, la evidencia actual apunta a que Hv1 se localiza exclusivamente en la pieza principal [[64,65](#)]. Sin embargo, tras una examinación más profunda de los reportes que sustentan tal afirmación, se vuelve evidente que Hv1 también se localiza en la pieza media (ver la segunda figura suplementaria de la referencia [[65](#)]). En este sentido, nuestro grupo realizó experimentos de inmunolocalización de Hv1 en espermatozoides humanos, corroborando que Hv1 no solo se localiza en la pieza principal sino también en pieza media (Oliveros-Urbano, tesis de maestría en proceso). Sin embargo, no queda claro si esta señal corresponde realmente a la presencia del canal o es un artefacto de las técnicas empleadas. Adicionalmente, de ser real la observación de que Hv1 se localiza en la pieza media, eso no comprobaría que el efecto de la albúmina en el pHi sea a través del canal, ni explicaría la ausencia de efecto en la pieza principal. Se requiere de mayor profundización para discernir el papel de la albumina en la regulación del pHi en los espermatozoides humanos.

Toda esta evidencia indica que tanto la albúmina como el  $\text{HCO}_3^-$ , producen de manera individual cambios en el pHi del espermatozoide, no obstante, queda la interrogante de cómo estos estímulos se integran para generar el comportamiento observado en presencia de un medio suplementado con ambos compuestos.

## Más allá de su naturaleza iónica, el $\text{HCO}_3^-$ es fundamental en la regulación del pHi

Como se mencionó anteriormente, el aumento en el pHi asociada a la capacitación, aparentemente, depende del ingreso del  $\text{HCO}_3^-$  al citoplasma a través de transportadores aniónicos sensibles al inhibidor DIDS. Sin embargo, el solo aumento de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  no es suficiente para generar un aumento del pHi. Para que esto ocurra es necesario que este anión reaccione con los  $\text{H}^+$  del medio formando  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CO}_2$ , reacción

---

<sup>14</sup> Al hablar del pHi en la pieza media, es necesario considerar lo discutido con respecto a la distribución del colorante BCECF y la heterogeneidad del pH en los organelos del espermatozoide.



química que es catalizada por la actividad de enzimas conocidas como anhidrasas carbónicas (CAs) localizadas en el citoplasma del espermatozoide. Por esta razón, resulta relevante realizar experimentos que permitan determinar el papel de estas enzimas en la regulación del pH<sub>i</sub>.

Sin embargo, la importancia del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la fisiología del espermatozoide no solamente se debe a su capacidad de reaccionar con los H<sup>+</sup>, ya que este anión es fundamental para activar a la adenilil ciclasa soluble (sAC) [78]. La alta afinidad de la sAC hacia HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> propicia que las concentraciones de AMPc aumenten rápidamente tras el inicio de la capacitación. Este segundo mensajero se une a la subunidad regulatoria de la proteína cinasa dependiente de AMPc, la PKA(R), lo que propicia la separación de subunidad catalítica, la PKA(C) [11]. Este evento tiene como consecuencia la activación de esta cinasa, la cual, en cuestión de un minuto, induce la aparición de proteínas fosforiladas en residuos de treonina y serina [80]. De manera interesante, se demostró que la incubación por 300 min en medio capacitante en presencia de un antagonista de la PKA, el H89, acidifica el pH<sub>i</sub> de los espermatozoides humanos [59]. Mientras se realizaba este trabajo, se describió que la incubación durante 60 min en presencia del antagonista de reciente creación de la sAC, el TDI-10229, impide el aumento del pH<sub>i</sub> inducido por el medio capacitante [109]. En el presente trabajo, se demostró que el KH7, un compuesto que también inhibe a la sAC produjo una reducción del pH<sub>i</sub>. Interesantemente, este efecto inhibitorio ocurrió únicamente en la pieza media y pieza principal pero no en la cabeza. El inhibidor de la sAC, el KH7, también produjo una acidificación localizada del pH<sub>i</sub>, aunque en menor magnitud en comparación con el H89 (Fig. 8 y Fig. S4).

A través de experimentos realizados en espermatozoides de ratón, se describió que la producción de AMPc ocurre de manera compartimentada. Esto se refiere a que a producción de AMPc en la cabeza se da principalmente por la actividad de una adenilil ciclasa transmembranal (tmAC) no identificada, mientras que en el flagelo, la producción de este segundo mensajero estaría controlada por la sAC [110]. En este sentido, se reportó que el TDI-10229 no afecta la actividad de la tmAC, lo que presumiblemente, tendría un efecto más relevante en la concentración de AMPc del flagelo [109]. Con respecto a la localización subcelular de PKA en espermatozoides humanos, se demostró que el aumento en la fosforilación de sustratos de PKA ocurre mayoritariamente en la pieza principal [80]. Esto abre la siguiente interrogante ¿cuáles son las proteínas que se localizan en el flagelo del espermatozoide cuya actividad depende de AMPc y/o que son blanco de PKA que efectúan los cambios de pH<sub>i</sub> asociados a la capacitación? A continuación, se discuten algunas posibilidades.

Como se mencionó anteriormente, la inhibición del canal CFTR como de los transportadores NBC reducen significativamente la fosforilación de blancos de PKA [48,59], presumiblemente porque se reduciría la concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el interior celular. Adicionalmente, se sabe que la actividad de CFTR se regula positivamente tanto por AMPc como por fosforilación por PKA [111–113]. Todo esto sugiere que existe una interrelación entre la actividad de estos transportadores y de PKA que de alguna manera participa en la regulación del pH<sub>i</sub>.



Por otro lado, una propuesta alternativa de regulación del pHi involucra el aumento de concentración del AMPc. Esto involucra la participación del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exclusivo del espermatozoide, el sNHE, el cual posee un dominio de unión a nucleótidos cíclicos. Se reportó que la unión del AMPc a este dominio aumenta la actividad del sNHE en espermatozoides de ratón [62]. Durante el periodo de realización de este trabajo se describió que el sNHE se expresa en espermatozoides humanos específicamente en la zona del flagelo. Adicionalmente, se demostró que mutaciones en el gen que codifica para esta proteína están relacionados con problema de fertilidad debido a defectos en la movilidad [63]. Toda esta evidencia sugiere que esta proteína podría ser relevante en la capacitación, posiblemente a través de la regulación en del pHi en los espermatozoides humanos. Recientemente, en un trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Takuya Nishigaki del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se describió que en espermatozoides humanos, el pHi no aumenta tras la hiperpolarización del potencial de la membrana, el cual es un mecanismo conservado evolutivamente de activación del sNHE, al menos para los espermatozoides de ratón [114] y los de erizo de mar [115]<sup>15</sup>. Actualmente se sigue explorando la hipótesis de que, en espermatozoides humanos, la actividad del sNHE se regule por AMPc en vez de hiperpolarización.

#### El rol del canal Hv1 en el control del pHi intracelular en espermatozoides humanos

La evidencia obtenida en este trabajo indica que la vía de señalización mediada por el  $\text{HCO}_3^-$ , la sAC y la PKA participa en la regulación polarizada del pHi en los espermatozoides humanos. Por esta razón, la o las proteínas responsables de efectuar el aumento del pHi, posiblemente se regulan directamente por PKA, o en su defecto, por alguna proteína intermediaria blanco de esta cinasa. Adicionalmente, estas proteínas deberían de localizarse en el flagelo de los espermatozoides, y su inhibición farmacológica debería de producir un efecto similar al de los bloqueadores de la vía de PKA. Una proteína que cumple con la mayoría de estos requisitos es el canal de  $\text{H}^+$ , conocido como Hv1. Como se mencionó anteriormente, esta proteína se localiza la pieza principal del flagelo de los espermatozoides de humano [64,65], y la corriente iónica conducida a través de este aumenta tras la capacitación [64]. En este trabajo reportamos que la inhibición farmacológica de este canal produce una acidificación del pHi exclusivamente en la pieza principal de los espermatozoides humanos (Fig. 9).

Hasta donde se revisó la literatura, esta es la primera vez que se establece la participación de Hv1 en la regulación del pHi en el espermatozoide. Aunque al mismo tiempo abre la interrogante de cómo se regula la actividad de este canal durante la capacitación de los espermatozoides humanos. Es particularmente intrigante como ocurre la apertura del canal, ya que se sabe que esta ocurre a potenciales despolarizantes [116], mientras que el potencial de membrana de los espermatozoides esta hiperpolarizado, especialmente durante la

---

<sup>15</sup> El dominio sensible a voltaje del sNHE de humanos presenta algunas diferencias en su secuencia con respecto a la de ratón y de erizo de mar, que podrían ser la causa de esta insensibilidad a voltaje.



capacitación<sup>16</sup> [117–121]. En este sentido, se sabe que Hv1 es capaz de percibir la presencia de gradientes de H<sup>+</sup> en la membrana plasmática mediante la acción de residuos situados en el cuarto dominio transmembranal del dominio sensor de voltaje [122]. Algo importante sobre esta cualidad del Hv1, es que la dirección del gradiente de pH tiene que ser de la siguiente manera  $pH_e - pH_i > 0$ . Esto implica que mientras mayor sea este gradiente, el canal puede abrirse en valores negativos de potencial de membrana [123]. Diferentes estudios demostraron que el pH<sub>i</sub> de espermatozoides humanos se encuentra entre 6.5 y 7.0, cuando estos se incuban en medios con un pH<sub>e</sub> ajustado a 7.4 [33,77,121,124]. En estas condiciones podría existir el gradiente de pH idóneo que permita la activación de Hv1 en potenciales negativos. De acuerdo con esta observación, se sabe que el pH<sub>i</sub> varía linealmente en función del pH<sub>e</sub> [124]. Por otro lado, se encontró que en espermatozoides humanos existe una variante de Hv1, llamada Hv1Sper, que sufrió un corte proteolítico de los primeros 69 aminoácidos de su región amino terminal [82]. Se demostró que Hv1Sper tiene una alteración en su dependencia al voltaje y al pH para su apertura, ya que es capaz de conducir H<sup>+</sup> a potenciales menos despolarizados (< 0 mV) aun en ausencia de gradiente de pH [82]. Otra posibilidad subyace en que el canal es activado por estímulos mecánicos, y cuando se combina dicho estímulo con un gradiente de pH, el canal conduce H<sup>+</sup> aún en voltajes negativos (-20 mV) [125]. Se desconoce si en espermatozoides de humano los estímulos mecánicos activan al canal, pero cabe destacar que el propio batido flagelar podría generar un movimiento tal en la membrana plasmática que podrá ser suficiente para activar a Hv1. Adicionalmente, actualmente se establece la posibilidad de que la hiperpolarización de la membrana plasmática no es algo que sea estable a través del tiempo, ya que puede variar de un momento a otro. En este sentido, existen canales iónicos en el espermatozoide, como el miembro de la familia de receptores de potencial transitorio, el TRPV4, cuya apertura produciría una despolarización [126], lo que podría ser un mecanismo adicional de regulación de la actividad de Hv1. Se requiere de mayor investigación para demostrar estas propuestas, aunque es probable que, durante la capacitación de los espermatozoides humanos, múltiples estímulos estén participando simultáneamente en la regulación de la apertura de Hv1.

Regulación del canal Hv1 mediante modificaciones postraduccionales: fosforilación mediada por las cinasas FER, PYK2 y PKC.

En este trabajo, se exploró la hipótesis de que la actividad de Hv1 podría estar regulada por modificaciones postraduccionales mediadas por enzimas (quinasas) cuya actividad se encuentra río abajo de la PKA. Considerando lo anterior, se sabe que tras la capacitación de los espermatozoides de mamífero hay un aumento importante en la cantidad de proteínas que se fosforilan en residuos de tirosina, y la mayoría de estas proteínas blanco de cinasas de tirosina (TKs) se localizan en la pieza principal [73,80]. Adicionalmente, se demostró que la activación de las TKs y el subsecuente aumento en la fosforilación de residuos de tirosina, se encuentran río abajo de la

---

<sup>16</sup> Los valores estimados del potencial de membrana en reposo en espermatozoides humanos capacitados varían entre -20 y -70 mV [117–121].



activación de la PKA [80,127,128]. Se sabe que las TKs responsables de este proceso son la cinasas conocidas como FERT [73,129], y la PYK2 [84]. Asimismo, se demostró que la inhibición farmacológica de estas TKs previene parcialmente la alcalinización intracelular asociada a la capacitación [86]. En este trabajo, se demostró que el efecto de la inhibición de estas cinasas se da con mayor magnitud en la pieza principal del flagelo (Fig. 10), esto sugiere que la activación de PKA podría estar involucrada en la vía de señalización que conduce a la actividad de Hv1. No existen reportes de que el canal se regule mediante fosforilación en tirosinas, sin embargo, un análisis de predicción de sitios de fosforilación (usando el algoritmo GPS 5.0 <http://gps.biocuckoo.cn>) reveló que existe una alta probabilidad que el canal sea blanco de fosforilación en la tirosina 134 por la acción de FER. Resta determinar de manera experimental si esto realmente ocurre en espermatozoides humanos, y especialmente indagar cual sería la consecuencia de esta fosforilación en la actividad del canal y en el pHi.

Derivado de este mismo análisis, se reveló que el canal Hv1 puede ser blanco de fosforilación por una cinasa de residuos de treonina y serina, como la PKC. De manera interesante, se encontró que en un modelo de células LK35.2 (un hibridoma de linfocitos B murinos) el canal Hv1 se fosforila en el residuo de treonina en la posición 29. Siendo la PKC la cinasa responsable de dicha fosforilación. A nivel funcional, esta modificación tiene como consecuencia un aumento de la actividad de Hv1 [130]. Aunque no se sabe si esta fosforilación ocurre en espermatozoides humanos, se describió que la PKC se expresa en la región ecuatorial de la cabeza y en el flagelo en espermatozoides de humano [131,132]. Por otro lado, experimentos realizados con espermatozoides porcinos revelaron que la activación de esta cinasa podría estar río abajo de PKA [88]. En este trabajo, se demostró que la inhibición de PKC inhibió significativamente el aumento del pHi en la pieza principal, pero no de la cabeza (Fig. 10).

Como se mencionó anteriormente, se desconoce si en los espermatozoides humanos, el canal Hv1 sufre algún tipo de fosforilación. Sin embargo, con base en resultados de análisis proteómicos, no se detectó la presencia de la fosforilación en la treonina 29 del canal Hv1, ni de algún residuo de tirosina. Solamente se reporta la presencia de fosforilación en la treonina y la serina en las posiciones 60 y 63, respectivamente [133,134]. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en algún momento de la capacitación esto pueda tener lugar.

Aunque los resultados obtenidos son de carácter preliminar, proveen ideas acerca de la complejidad de la regulación del pHi en los espermatozoides. Aparentemente en la pieza principal se requiere de la participación de múltiples proteínas que de alguna manera convergen en la modulación de la actividad del canal de H<sup>+</sup>. Es necesario realizar mayor experimentación para determinar los elementos faltantes que conectan la vía de PKA con la activación de Hv1. Así mismo, resultaría relevante indagar cual es el efecto de las modificaciones postraduccionales que putativamente ocurren en el canal, y especialmente cuál es su relevancia dentro del contexto de la función espermática.



Reportes previos indicaron la relevancia en el proceso de capacitación de otro tipo de modificación postraducciona, la acetilación de lisinas. Dentro de estas evidencias, destaca la observación de que la incubación con inhibidores de deacetilasas además de promover un aumento generalizado en la acetilación de proteínas, induce un aumento en la actividad de la PKA que es independiente del AMPc [14]. Esto, al involucrar la participación de PKA, permitió suponer que quizá este tipo de modificación postraducciona podría, de alguna manera, también estar involucrado en la regulación del pHi. En este sentido, los resultados que se obtuvieron en esta investigación sugieren que el tratamiento con los inhibidores de deacetilasas induce un aumento en el pHi de los espermatozoides humanos incubados en un medio no capacitante (Fig. 12). El caso contrario ocurrió cuando los espermatozoides se incubaron en condiciones que promueven la capacitación en presencia de un inhibidor general de acetiltransferasas (Fig. 11). Cabe destacar que el efecto de estos tratamientos provocó respuestas similares en el pHi de la cabeza y del flagelo. Actualmente se desconoce cuál es la localización subcelular de las proteínas que son blanco de acetilación, y tampoco se conoce la identidad ni localización de la o las acetiltransferasas involucradas en este proceso. No se descarta la posibilidad que el efecto sobre el pHi se deba a que la acetilación de lisinas afecta la actividad de otras proteínas además de PKA.

Como se mencionó anteriormente, mediante la información obtenida de análisis proteómicos se reportó que el propio canal Hv1 podría ser blanco directo de las acetiltransferasas, ya que aparentemente, la lisina en la posición 252 se encuentra acetilación. Interesantemente, se reportó que este tipo de modificación se encuentra únicamente en espermatozoides capacitados [90]. En este trabajo se observó que los antagonistas de Hv1 previnieron el aumento de pHi evocado por el tratamiento con los inhibidores de deacetilasas. Este efecto ocurrió con mayor magnitud en la región de la pieza principal (Fig. 12). Actualmente, no existe evidencia que compruebe el efecto de este tipo de modificación postraducciona en la actividad de Hv1. Aunque estos datos son de carácter preliminar, sugieren que los mecanismos de regulación de la actividad de Hv1 son complejos, y posiblemente, más de una vía de señalización converge en este canal. Por esta razón, es relevante investigar con mayor profundidad cuál sería la relevancia de la acetilación de lisinas en el proceso de regulación del pHi y de la capacitación espermática.

### *El pHi alcalino es necesario para que ocurra la hiperactivación*

A lo largo de este trabajo de investigación se describieron y discutieron múltiples resultados que señalan la complejidad que existe con relación a la regulación del pHi durante el proceso de capacitación. Sin embargo, toda evidencia generó la interrogante ¿cuál es la consecuencia funcional de la alcalinización regionalizada del pHi durante la capacitación? Por esta razón, se decidió indagar el efecto en la movilidad espermática de los distintos fármacos empleados. Esta decisión se sustenta en las observaciones que indican que la alcalinización del pHi es una condición necesaria para que se pueda llevar a cabo el batido flagelar de tipo hiperactivado al



menos en espermatozoides bovinos [135]. Los resultados obtenidos indicaron que la inhibición del CFTR, de los NBC, y del canal Hv1 afectaron, aunque en diferentes niveles, el desarrollo de la movilidad hiperactivada. Aunque no se demostró en este trabajo, la inhibición tanto de la sAC como de la PKA previenen la hiperactivación de la movilidad promovida por el medio capacitante [109,136], lo mismo que el tratamiento con DIDS [136].

Curiosamente, la magnitud en la reducción de la hiperactivación causada por los fármacos empleados asemejó, en cierta medida, el comportamiento inhibitorio observado en los experimentos de medición de pHi mediante la fluorescencia del BCECF (ver Figs. 6, 7, y 9). Al hacer un análisis de correlación de los porcentajes de hiperactivación en función de la fluorescencia de BCECF ( $F_{rel}$ ) en la pieza principal (región subcelular donde algunos de los compuestos tuvieron un efecto más pronunciado), se observó que ambas variables presentaban una correlación fuerte y positiva (coeficiente de correlación de Pearson,  $r = 0.76$ ,  $p = 4.2 \times 10^{-5}$ ) (Fig. 14).

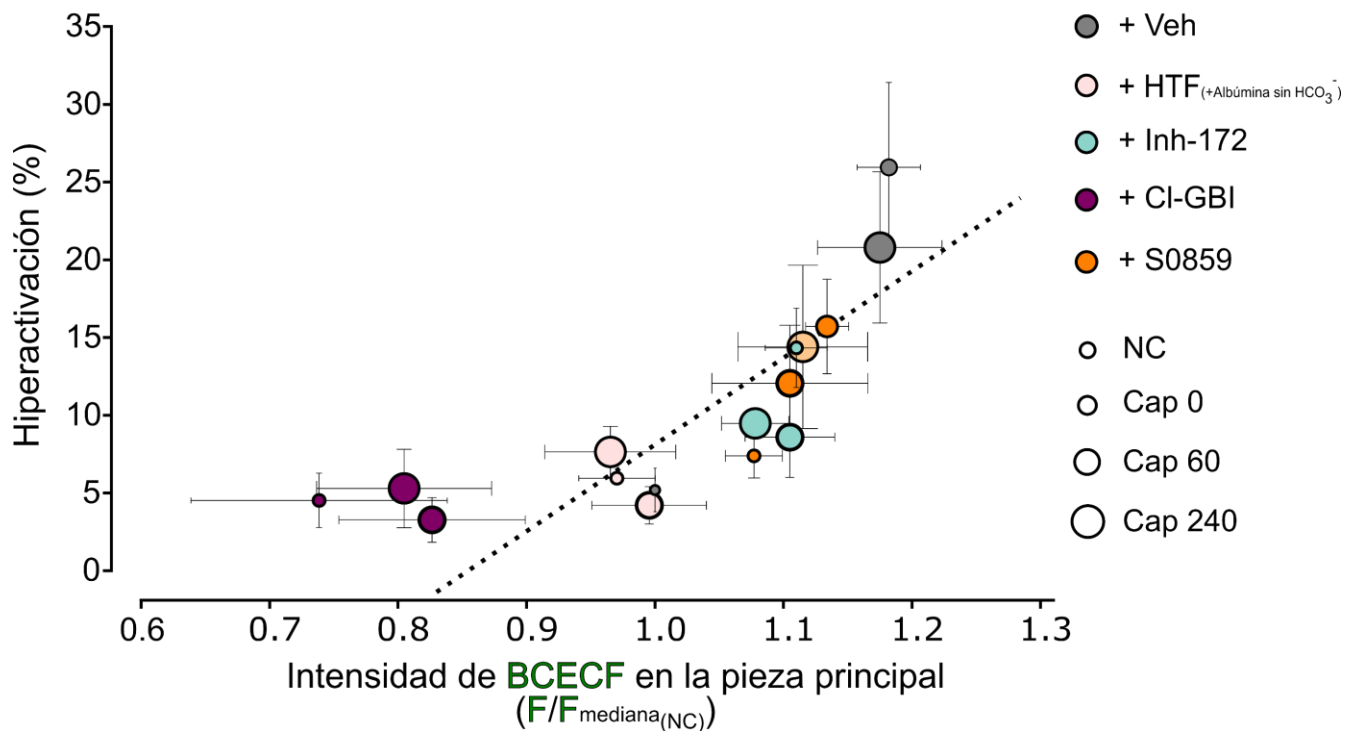


Figura 14. Correlación de la hiperactivación en función de la fluorescencia de BCECF (nivel de pHi). Gráfica de puntos que ilustra la proporción de células que presentan movilidad hiperactivada en función del nivel de fluorescencia relativizada de acuerdo con la ecuación 1. Las células se incubaron con los siguientes tratamientos: vehículo (Veh), medio HTF suplementado con albúmina, pero no con HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (HTF +albúmina sin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), inhibidor del canal CFRT (Inh-172, 5 μM), antagonista de los transportadores NBC (S0859, 5 μM), y bloqueador del canal Hv1 (Cl-GBI, 200 μM). Los puntos representan el promedio ± el error estándar de la media de al menos 5 experimentos independientes por cada condición. El tamaño de los puntos hace referencia al tipo y al tiempo de incubación empleada. Los datos se analizaron mediante una prueba de correlación de Pearson.

Esta asociación entre los niveles de fluorescencia de BCECF y la hiperactivación sugiere que la presencia de un ambiente alcalino, especialmente en la región de la pieza principal, es un necesario para que ocurra la hiperactivación de la movilidad. Un posible escenario que explique la asociación de la alcalinización con el





desarrollo de este tipo de movilidad requiere la participación del canal multímero de  $\text{Ca}^{2+}$  exclusivo de los espermatozoides, CatSper. Mutaciones que afecten la función o el correcto ensamblaje de cualquiera de las subunidades que forman este canal, tanto en ratones como en humanos, producen infertilidad masculina debido a la imposibilidad de los espermatozoide para llevar a cabo la hiperactivación [23,137]. Desde hace tiempo se reportó que la actividad de CatSper es fuertemente aumentada por alcalinización intracelular [138]. Recientemente se demostró que, entre las subunidades que conforman a CatSper, la proteína intracelular conocida como EFCAB9 funciona como un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  y pHi, la cual, al estimularse por una disminución en la concentración de  $\text{H}^+$  (alcalinización), propicia el aumento en la conductancia del canal [139]. El complejo de proteínas que conforman a CatSper (incluyendo a EFCAB9) presentan un arreglo estructural formando dos pares de bandas paralelas que corren a lo largo de toda la pieza principal [8,139,140]. Con relación a esto, se propone que el ambiente alcalino generado por la actividad de Hv1 es un estímulo que induciría el aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  por acción de CatSper. En ese sentido, se describió que al igual que CatSper, el canal Hv1 presenta una distribución ultraestructural formando un solo par de bandas paralelas que también corren por la longitud de pieza principal del flagelo [65]. La distribución tan detallada de estas proteínas podría generar nanodominios de pHi alcalino y de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo que implicaría la existencia de un nivel de regulación de la actividad de estas proteínas no solo a nivel micro, sino a nivel nanoscópico.

## CONCLUSIÓN

En resumen, en este trabajo se demostró que existe un aumento del pH intracelular (pHi) que ocurre dentro de los primeros minutos de incubación en condiciones que estimulan la capacitación *in vitro*, el cual se mantiene relativamente constante durante todo el transcurso de la capacitación. Este aumento en el pHi ocurre de manera regionalizada ya que se da mayoritariamente en la cabeza y en la pieza principal del espermatozoide, pero no en la pieza media. Adicionalmente, la regulación del pH intracelular en los espermatozoides humanos requiere de la participación de múltiples proteínas, las cuales, aparentemente, ejercen un efecto en el pHi de tal manera que coincide con su localización subcelular en el espermatozoide, lo que sugiere que existe un cierto grado de compartimentación en las señales que regulan el pH intracelular. Además, se encontró que la alcalinización intracelular asociada a la capacitación es una señal de vital importancia para que el espermatozoide pueda desarrollar la movilidad hiperactivada. En conjunto, estos resultados revelan la complejidad y relevancia de la dinámica en la regulación del pHi durante la capacitación. Se requiere de mayor investigación para conocer como es la comunicación, y la regulación de la señalización entre las regiones del espermatozoide, y como es la relación a nivel molecular entre el pHi y la hiperactivación.



## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### *Medios de cultivo*

El medio de incubación para los espermatozoides empleado en este trabajo consistió en una modificación del medio llamado *Human Tubal Fluid* (HTF), el cual se compone de (en mM): NaCl 90, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.6, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.314, Glucosa 2.8, piruvato de sodio 3.4, lactato de sodio 48 y HEPES 23.8. A esta formulación se le denominó como medio no capacitante (NC). Este medio se suplementó con 25 mM de NaHCO<sub>3</sub> y 0.5% (p/v) de albúmina sérica de bovino (BSA por sus siglas en inglés). El medio suplementado con estos dos compuestos recibió el nombre de medio capacitante (CAP). Ambos medios se ajustaron a un pH de 7.4 con NaOH y la osmolaridad se mantuvo alrededor de 330 mOsm Kg<sup>-1</sup>. [Ir al texto principal](#)

### *Obtención de muestras*

Las muestras de semen se obtuvieron de donadores voluntarios previo consentimiento informado. Se incluyeron únicamente aquellas muestras que cumplían con las estipulaciones indicadas por la OMS para ser considerados como normozoospermicos [76]. Tras la colecta vía masturbación, se permitió la licuefacción del semen durante 30 min a 37°C a una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire. Los espermatozoides se separaron del semen mediante selección por movilidad usando la técnica de nado ascendente, incubando durante 60 min en medio HTF-NC. Se colectó la fracción de células con mayor movilidad, y se descartaron las células y el semen sobrante. [Ir al texto principal](#)

### *Incorporación de colorantes fluorescentes*

Se utilizaron espermatozoides purificados incubados en medio NC a una concentración de 10-20x10<sup>6</sup> células por mL. Se les adicionaron 300 nM de BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y-6)-carboxifluoresceína acetoximetil éster) durante 15 min a 37°C cubierto de la luz. Posteriormente, el exceso de colorante se lavó por centrifugación (300 x g durante 5 min). Las células se resuspendieron nuevamente en medio NC. Previo a la medición, las células se concentraron por centrifugación para dejarlas en un volumen de 50 a 100 µL. A esta nueva suspensión, se le añadieron 200 nM del colorante de viabilidad yoduro de propidio (PI) durante 5 min. [Ir al texto principal](#)

### *Tratamientos farmacológicos*

Para las condiciones que requirieron el uso de antagonistas farmacológicos, se emplearon células incubadas en medio NC previamente cargadas con el colorante sensible a cambios en el pH<sub>i</sub>, BCECF. Inicialmente, se añadió la concentración indicada de fármacos a una suspensión de 10-20x10<sup>6</sup>/mL y se incubaron durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de células tratadas con los distintos fármacos, y se procedió a su medición (condición NC + tratamiento). Como control, las células se incubaron en presencia del compuesto utilizado para diluir el tratamiento farmacológico empleado, ya sea dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración similar a la contenida en la solución con inhibidores (sin rebasar la concentración máxima de 0.05% v/v). Estas



condiciones se emplearon cuando se utilizaron los siguientes inhibidores: DIDS, Inh-172, S0859, KH7, H89, Cl-GBI, PF43396, Gö6976, L002, y TSA. Por otro lado, en otro conjunto de tratamientos ( $Zn^{2+}$  y NAM) en los cuales el compuesto inhibitorio se diluyó en agua y/o en medio HTF, se utilizaron estos últimos como control. A estas condiciones se les denominó Vehículo o Veh).

A las células restantes, se les añadió el medio suplementado con  $HCO_3^-$  y albúmina (medio capacitante), lo que marcó el inicio de la capacitación. Para esta serie de experimentos se evaluó la fluorescencia de las células tras 7, 60 y 240 min de incubación en dicho medio capacitante ya sea en presencia o ausencia de los fármacos.

Los diferentes fármacos empleados en este trabajo fueron: el ácido 4,4'-diisotiocianato estilbino-2,2'-disulfónico (DIDS) a una concentración de 100  $\mu M$ , la 5-[(4-Carboxifenil)metileno]-2-tioxo-3-[(3-trifluorometil)fenil-4-tiazolidinona (Inh-172) concentración 5  $\mu M$ , la 2-Cloro-N-[[2'-[(Cianoamino)sulfonil] [1,1'-bifenil]-4-il]metil]-N-[(4-metilfenil)metil]-benzamida (S0859) 5  $\mu M$ , el ácido 2-(1H-benzimidazol-2-iltio) propanoico 2-[(5-bromo-2-hidroxifenil)metileno] hidrácido (KH7) concentración 50  $\mu M$ , la 2-((p-Bromocinamil)amino)etil]-5-isoquinolinasulfonamida (H89) a una concentración de 30  $\mu M$ , el polipéptido TTYANPIASGRTGRRNAIHN (PKI) a una concentración de 1  $\mu M$ , el polipéptido miristoilado en la posición 1: GRTGRRNAI (S-PKI) 1  $\mu M$ , el 5-cloro-2-guanidinobenzimidazol (Cl-GBI) 200  $\mu M$ ,  $ZnCl_2$  ( $Zn^{2+}$ ) 200  $\mu M$ , la N-[2-[[[2-[(2,3-dihidro-2-oxo-1H-indol-5-il)amino] -5-(trifluorometil)- 4-pirimidinil]amino]metil]fenil]- N-metil Metano sulfonamida (PF431356) 10  $\mu M$ , 12-(2-Cianoetil)-6,7,12,13-tetrahidro-13-metil-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pirrolo(3,4-c)-carbazol (Gö6976) 1  $\mu M$ .

[Ir al texto principal](#)

#### *Adquisición de imágenes mediante citometría de flujo basada en imágenes*

Se empleó el citómetro *ImageStream MK II* (Luminex, USA). La configuración usada para la captura de imágenes se describe a continuación. Se utilizó el objetivo de 60x de magnificación con apertura numérica de 0.9, tamaño de píxel de  $0.3 \times 0.3 \mu m$ , y campo de visión de aproximadamente  $40 \times 170 \mu m$ . Se empleó el láser de 488 nm a una potencia de 20 mW) para la excitación de BCECF, y el de 561 nm (100 mW) para excitar a PI. Se utilizaron los filtros de emisión paso banda de 528/65 nm (llamado canal 2 en el software del equipo) para coleccionar la emisión del BCECF, y el filtro de 610/30 nm (denominado canal 4) para coleccionar la emisión del PI. De igual manera se emplearon los leds de iluminación para generar las imágenes de campo claro, las cuales se capturaron en el canal 1. Previo a la adquisición, las diferentes poblaciones de espermatozoides a evaluar (aproximadamente entre  $5$  y  $10 \times 10^6$  células por mililitro) se centrifugaron durante 5 min a  $300 \times g$  con el fin de incrementar su concentración. Durante la adquisición, se establecieron diferentes parámetros para realizar una discriminación preliminar de agregados o restos celulares, células que no correspondieran a espermatozoides (ej. células redondas), eventos fuera de foco. Por cada condición evaluada, se capturaron un mínimo de 10,000 imágenes evaluada.

[Ir al texto principal](#)



## Análisis de imágenes

Los datos obtenidos se analizaron en el software IDEAS (Luminex, USA) versión 6.2. En primera instancia se realizó un proceso de discriminación de eventos que no correspondieran a espermatozoides individuales, células fuera de foco, y de espermatozoides no viables (positivos a PI).

Una vez obtenidas las mejores imágenes de espermatozoides individuales, se aplicó la estrategia de segmentación que permite realizar el análisis de la fluorescencia de cada región subcelular de los espermatozoides: la cabeza, la pieza media y la pieza principal. Para ello, se emplea la función *Mask Generator* del software IDEAS. Con esta función se establece una región de interés considerando las imágenes de campo claro (canal 1 y canal 9), esto permite desarrollar lo que se conoce como “máscara” del **espermatozoide completo**. Esto se refiere a una manera en que el software reconoce una zona dentro de la imagen donde se encuentran los píxeles con intensidades que sobresalen de las del fondo de la imagen (la célula). Posteriormente con esta misma función se genera una máscara que detecta regiones semicirculares dentro de la imagen, lo cual es útil para reconocer y generar una máscara para la región de la cabeza. Posteriormente, a la máscara de la cabeza se le realiza un proceso de dilatación<sup>17</sup> de 13 píxeles. A la máscara del espermatozoide completo se le sustrae<sup>18</sup> la máscara dilatada de la cabeza lo que da como resultado una máscara de la pieza principal. Por último, a la máscara de célula completa se le hizo a sustracción de las máscaras de la cabeza y de la pieza principal, lo que da como resultado una máscara utilizada para reconocer la región de la **pieza media** (en la [figura S1d](#) se muestran algunos ejemplos de esta segmentación). Finalizado el proceso de generación de máscaras, se realizan una serie de discriminaciones que permiten seleccionar solamente aquellas células que fueron segmentadas satisfactoriamente. Después de todo este procesamiento, se obtienen entre 1000 y 3000 imágenes adecuadas para el análisis.

Los detalles para realizar la selección de poblaciones se obtuvieron del trabajo previo que desarrollé durante mi tesis de maestría. Para mayor información consultar las referencias [\[73,141\]](#). [Ir al texto principal](#)

## Determinación del pH absoluto en espermatozoides humanos mediante citometría de flujo de adquisición continua

### Equipo utilizado

Se empleó el citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences). La particularidad de este equipo es que posee una bomba peristáltica para crear el flujo que permite hacer las mediciones de las células en suspensión, y a diferencia de otros citómetros no hay necesidad de crear un vacío. Esta sencilla diferencia abre la posibilidad de

[Ir al texto principal](#)

---

<sup>17</sup> Procesos que implica el crecimiento en  $n$  píxeles de todos la zona del borde de una máscara dada.

<sup>18</sup> Durante la generación de máscaras se pueden emplear operaciones *Booleanas* lo que permite la combinación o sustracción de dos o más máscaras individuales para crear nuevas versiones.



seguir el curso temporal de los registros de fluorescencia para poder realizar adiciones de compuestos en tiempo real sin necesidad de interrumpir el registro (a diferencia de otros equipos de citometría).

#### Adquisición de datos mediante la citometría de adquisición continua

Los registros se realizaron empleando una tasa de flujo de 14  $\mu\text{L}/\text{min}$  a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). Se colectaron los datos correspondientes a la dispersión frontal y lateral de la luz (FSC y SSC por sus siglas en inglés respectivamente), con los cuales se crearon umbrales para descartar el *debris* y los agregados celulares. Los ajustes de adquisición del citómetro fueron los siguientes: para detectar BCECF se empleó el láser de 488 nm como fuente de excitación. Mientras que su emisión se detectó en el canales FL-1 (filtro paso banda de 533/30 nm). Por otro lado, para el PI se excitó con el mismo láser de 488nm y su emisión se detectó en el canal FL-3 (filtro paso banda de 590/50 nm). Al igual que con la citometría acoplada a imágenes. Las células no viables fueron descartadas si es que presentaban positividad al PI.

#### Protocolo de calibración para la determinación de pHi absoluto

Para obtener valores absolutos del pHi, los espermatozoides incubados ya sea en medio NC o CAP, se cargaron con BCECF a una concentración de 250 nM durante 10 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las muestras teñidas se dividieron en dos partes iguales. A la primera de estar fracciones de células se le hizo un registro de la fluorescencia como se indicó anteriormente. Se obtuvo un registro de la fluorescencia basal durante 150 s seguido de un registro de la fluorescencia tras la adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , una base débil que se sabe que induce un aumento de pHi en alrededor de 0.4 unidades [74]. Esta adición indujo un aumento de la fluorescencia de BCECF indicativo de una alcalinización (Fig. S3a).

La fracción de células restante que fue previamente cargada con BCECF se incubó durante 15 min en un medio de calibración denominado en adelante como  $\text{H}^+\text{Cal}^{19}$ , el cual se compone de (en mM): 120 KCl, 25 HEPES, 1  $\text{MgCl}_2$ , y 0.01 nigericina, ajustado a pH 6.0 con KOH. La presencia de nigericina, un fármaco que medía el intercambio de  $\text{K}^+$  por  $\text{H}^+$  permite que el pHi se equilibre con el pH extracelular (pHe). Una vez que se incubaron en el medio  $\text{H}^+\text{Cal}$ , se hizo el registró de la fluorescencia de BCECF a pH 6.0 durante 120 s. Posteriormente, se hicieron adiciones secuenciales (cada 120 s) de soluciones con diferentes concentraciones de KOH. La cantidad de equivalentes de  $\text{OH}^-$  que se añadieron a la suspensión de espermatozoides se calcularon para que el pHe aumentase 0.25 unidades<sup>20</sup>. Esto se realizó ocho veces hasta conseguir a un pHe de 8.0 (Fig. S3b). Cuando la fluorescencia del BCECF llegó a una fase de meseta tras cada adición de KOH, se obtuvo la mediana de fluorescencia de todas las células contenidas en ese lapso. Este valor se transformó a logaritmo base 10 y

---

<sup>19</sup> El nombre  $\text{H}^+\text{Cal}$  es un término acuñado para este trabajo y viene del acrónimo que se refiere a un medio de Calibración (Cal) de pH ( $\text{H}^+$ ).

<sup>20</sup> La cantidad de KOH necesario para provocar el aumento indicado en el pHe fue obtenido mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach considerando el valor pKa para el HEPES a  $25^\circ\text{C}$  (7.55).

[Ir al texto principal](#)



posteriormente se graficó en función de los valores de pHe alcanzados después de cada adición de KOH ([Fig. S3c](#)). A estos datos se les hizo un ajuste de un modelo lineal que sirvió para poder interpolar el valor de pHi de la condición basal y el tratamiento con NH<sub>4</sub>Cl ([Fig. S3d](#)). Este procesamiento se realizó tanto para condiciones NC como en células incubadas en medio CAP. Para más información, ver la referencia [\[121\]](#).

#### *Análisis de movilidad asistido por computadora*

Para analizar la movilidad espermática se utilizaron espermatozoides incubados en las mismas condiciones evaluadas en los experimentos de análisis de pHi, es decir, espermatozoides incubados ya sea en medio no capacitante o medio de capacitación durante 7, 60 y 240 min, en presencia o ausencia de los diferentes fármacos. A partir de una suspensión de espermatozoides incubados a una concentración de  $1 \times 10^6$  por mL, se colocaron 7  $\mu$ L sobre un porta y un cubreobjetos de 18 x 18 mm. Las células se visualizaron con un objetivo de magnificación 10x (Nikon, Japón), utilizando una iluminación de contraste de fases. La captura de las imágenes se realizó con una cámara Basler controlada por el software SCA (MicroOptics, España). Se tomaron 25 imágenes a una frecuencia de 50 imágenes por segundo. Al menos 500 espermatozoides se capturaron por cada condición. Para determinar si un espermatozoide se encontraba o no hiperactivado, se consideraron los siguientes parámetros: la velocidad curvilínea debería ser mayor a los 150  $\mu$ m/s, la linealidad menor al 50 %, y finalmente, la amplitud lateral de la cabeza mayor a 7  $\mu$ m. [Ir al texto principal](#)

#### *Análisis de datos e inferencias estadísticas*

##### *Gráficas de densidad de fluorescencia*

Los resultados de la citometría de flujo se analizaron se presentaron como gráficos de densidad plasmando la fluorescencia de cada región y de cada tratamiento. Dentro de estas gráficas se ilustró el valor de la mediana de fluorescencia para cada donador en cada tratamiento y en cada región (puntos en escala de grises), así como el valor promedio de todos los donadores (puntos negros). Para la construcción de estas gráficas, la distribución de los datos de fluorescencia se dividió en diferentes intervalos de tamaño variable. Para cada intervalo se calculó la densidad de células que caen en dicho intervalo. Para la creación de estas gráficas se utilizaron las paqueterías *ggridges* y *ggplot2* [\[142\]](#) perteneciente al lenguaje de programación R (versión 4.0.4) [\[143\]](#). [Ir al texto principal](#)

##### *Análisis de promedios de fluorescencia, pHi y movilidad*

Los resultados obtenidos se analizaron calculando el promedio de la fluorescencia relativizada (de acuerdo con la [ecuación 1](#)), el promedio del pHi absoluto, o el promedio del porcentaje de movilidad total o hiperactivada. Dicho promedio se calculó para cada donador y cada tratamiento (además de cada región subcelular cuando fuese necesario). Posteriormente, se obtuvo un resultado general de todas las muestras analizadas al obtener la media de todos los promedios de cada donador, a los que se les añadió una barra que indica el error estándar

[Ir al texto principal](#)



de la media. Para la creación de estas gráficas se utilizó la paquetería *ggplot2* [142] perteneciente al lenguaje de programación R.



## Ajustes de regresión local

Con el fin de determinar el comportamiento cinético de los cambios de fluorescencia durante la capacitación, a los datos de fluorescencia promedio obtenidos como se indicó en la sección anterior, se les aplicó un ajuste de regresión local. Este ajuste se realizó considerando una ventana del del 10 al 25 % de los datos. El resultado final fue plasmado como curvas negras en las gráficas promedio. Adicionalmente se plasmó el intervalo de confianza al 95% de cada ajuste. Este procesamiento se realizó para cada condición y cada región subcelular. Para la realización de estos cálculos se utilizó la función `geom_smooth(method = "loess", span = 0.25, se = T o F)` de la paquetería `ggplot2` [142] perteneciente al lenguaje de programación R. [Ir al texto principal](#)

## Obtención de significancia estadística

Para establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas, en primer lugar, se determinó si los datos obtenidos cumplían con las condiciones de una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para esto se empleó la función `shapiro_test()` contenida dentro de la paquetería `rstatix` perteneciente al lenguaje de programación R. Una vez establecido o rechazado la normalidad, las diferencias estadísticas fueron obtenidas mediante pruebas de ANOVA de un factor o Kruskal-Wallis respectivamente. Para determinar las diferencias entre tratamientos se realizó una prueba de comparaciones múltiples con corrección del valor de  $p$  mediante el método de Holm. En la mayoría de los casos, se consideró como condición control a la población de células incubadas en condiciones NC ( $F_{rel} = 1$ , de acuerdo con la [ecuación 1](#)). Se consideró que un valor de significancia menor a 0.05 como umbral para establecer las diferencias estadísticamente significativas. En las figuras se utilizó la siguiente nomenclatura para indicar el nivel de dicha significancia:  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$  y  $****p < 0.0001$ . Todos los cálculos se realizaron con las funciones `anova_test()` o `kruskal_test()` y la función `adjust_pvalue(method="holm")` de la paquetería `rstatix` dentro del lenguaje de programación R.

## Creación de figuras

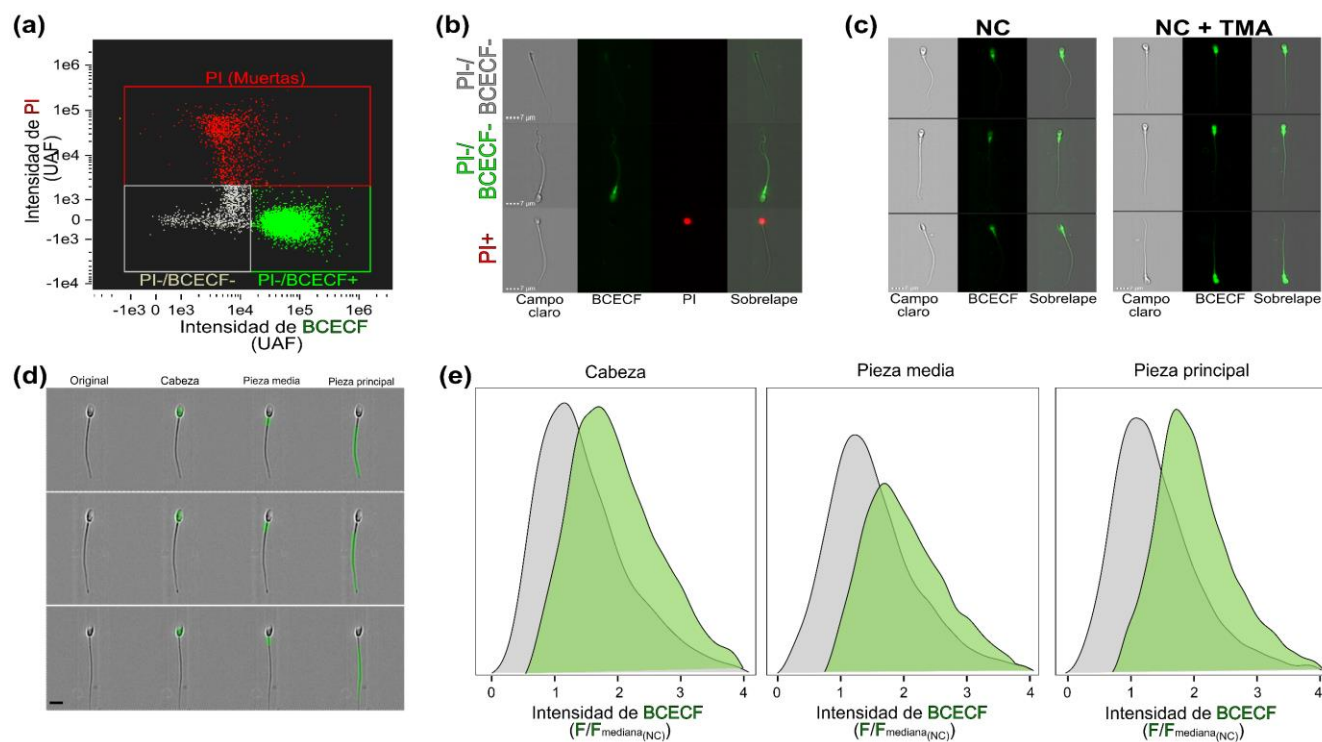
Como se mencionó todas las gráficas fueron hechas en el software R. Una vez creadas, estas se exportaron en formato .SVG y fueron editadas para su versión final en el software Inkscape 0.91.





## FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura Suplementaria 1



**Fig. S1. Medición del pH intracelular mediante citometría de flujo basada en imágenes.** (a) Diagrama de puntos comparando la fluorescencia de BCECF con la de ioduro de propidio (PI). Según los niveles de fluorescencia, tres poblaciones diferentes fueron seleccionadas: PI+ (células muertas), PI-/BCECF- (no teñidas o residuos), y PI-/BCECF+ (vivas y teñidas). (b) Imágenes representativas de las diferentes poblaciones mencionadas en (a). (c) Imágenes representativas de espermatozoides tratados en presencia (der.) o ausencia (izq.) de 20 mM de TMA. (d) Imágenes representativas de tres espermatozoides visualizados en campo claro antes (original) y después del proceso de segmentación. Las máscaras de cabeza, pieza media y pieza principal se ilustran en color verde. La barra negra indica 7  $\mu$ m. (e) Gráficas de densidad de fluorescencia de BCECF. Los datos se normalizaron de acuerdo con la [ecuación 1](#), cada valor de fluorescencia se dividió por entre el valor de la mediana de fluorescencia de la condición control (sin TMA). Esto se hizo por cada región subcelular. Datos representativos de un donante. Los datos representan al menos 1000 células ( $n = 4$ ). [Volver al texto principal](#)



Figura Suplementaria 2

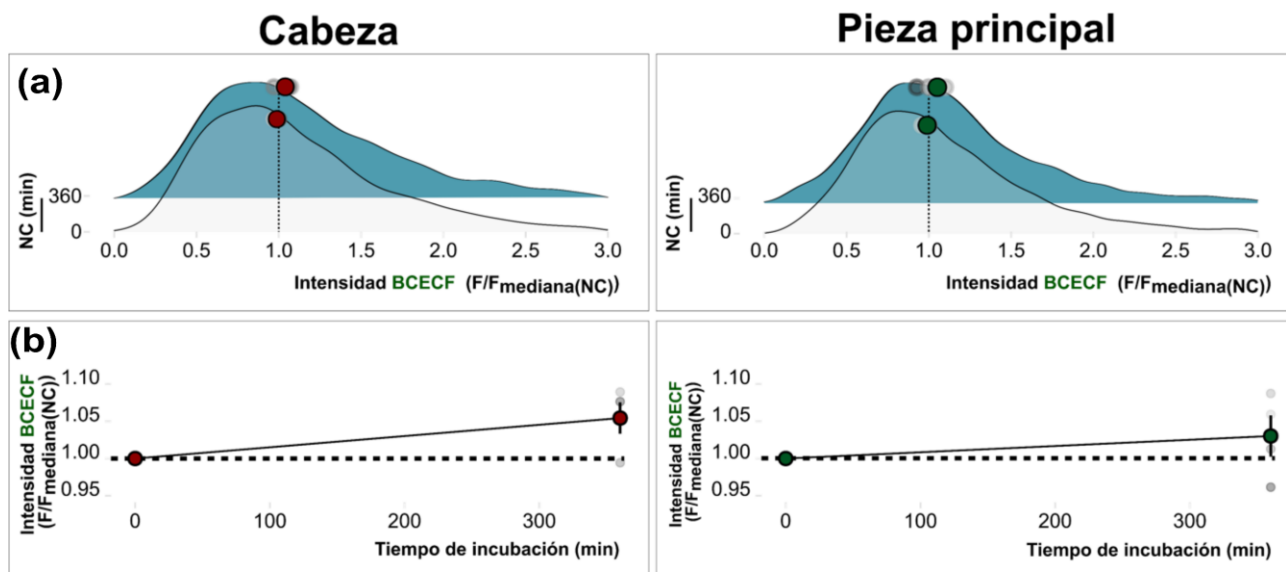
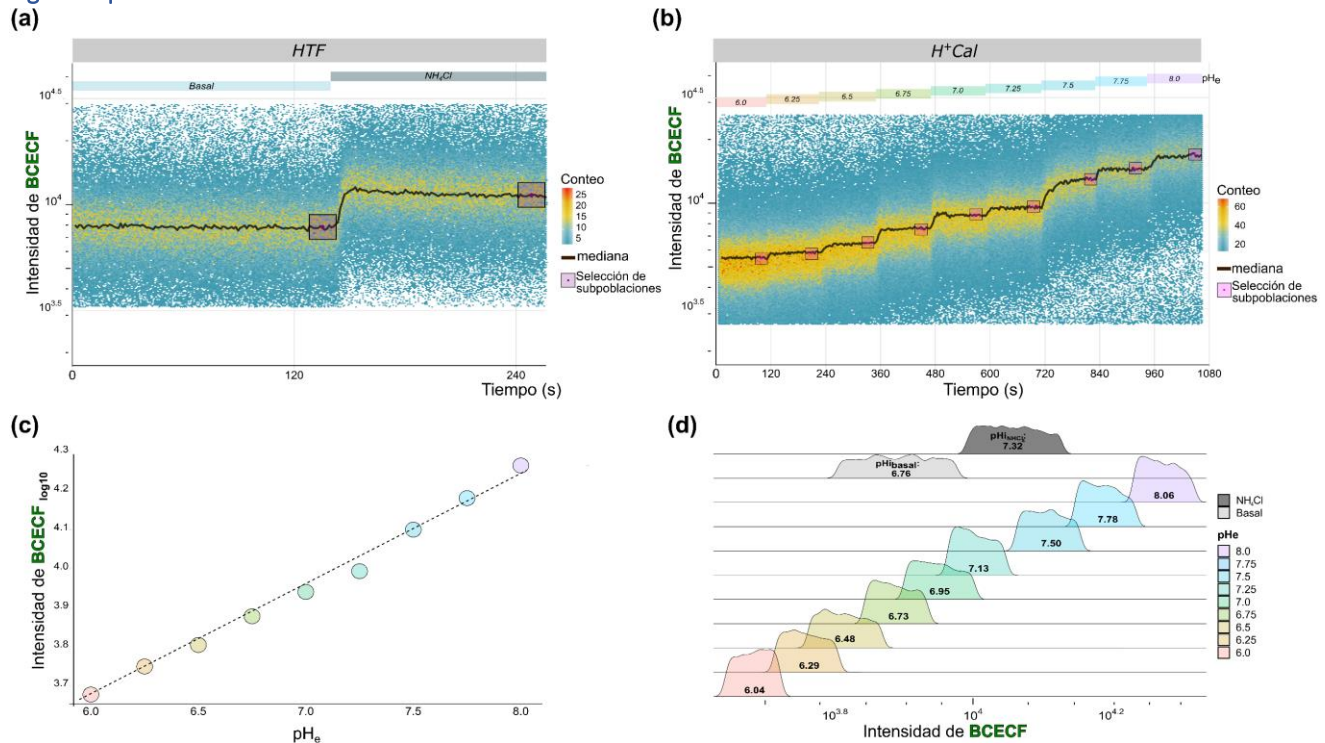


Fig. S2. La incubación prolongada en medio no capacitante no provoca cambios en el pH<sub>i</sub>. (a). Gráficas de densidad de fluorescencia de BCECF relativizadas con la condición NC inicial (60 min). Los gráficos están construidos con al menos 1000 células por donador y por cada condición. (b). Valores promedio de la fluorescencia relativizada de BCECF en condiciones NC inicial (60 min) y NC después de 360 min de incubación. Los puntos en escala de grises dentro de los cuadros la mediana de fluorescencia de cada donante (n = 5). Los datos representan la media ± SEM. [Volver al texto principal](#)



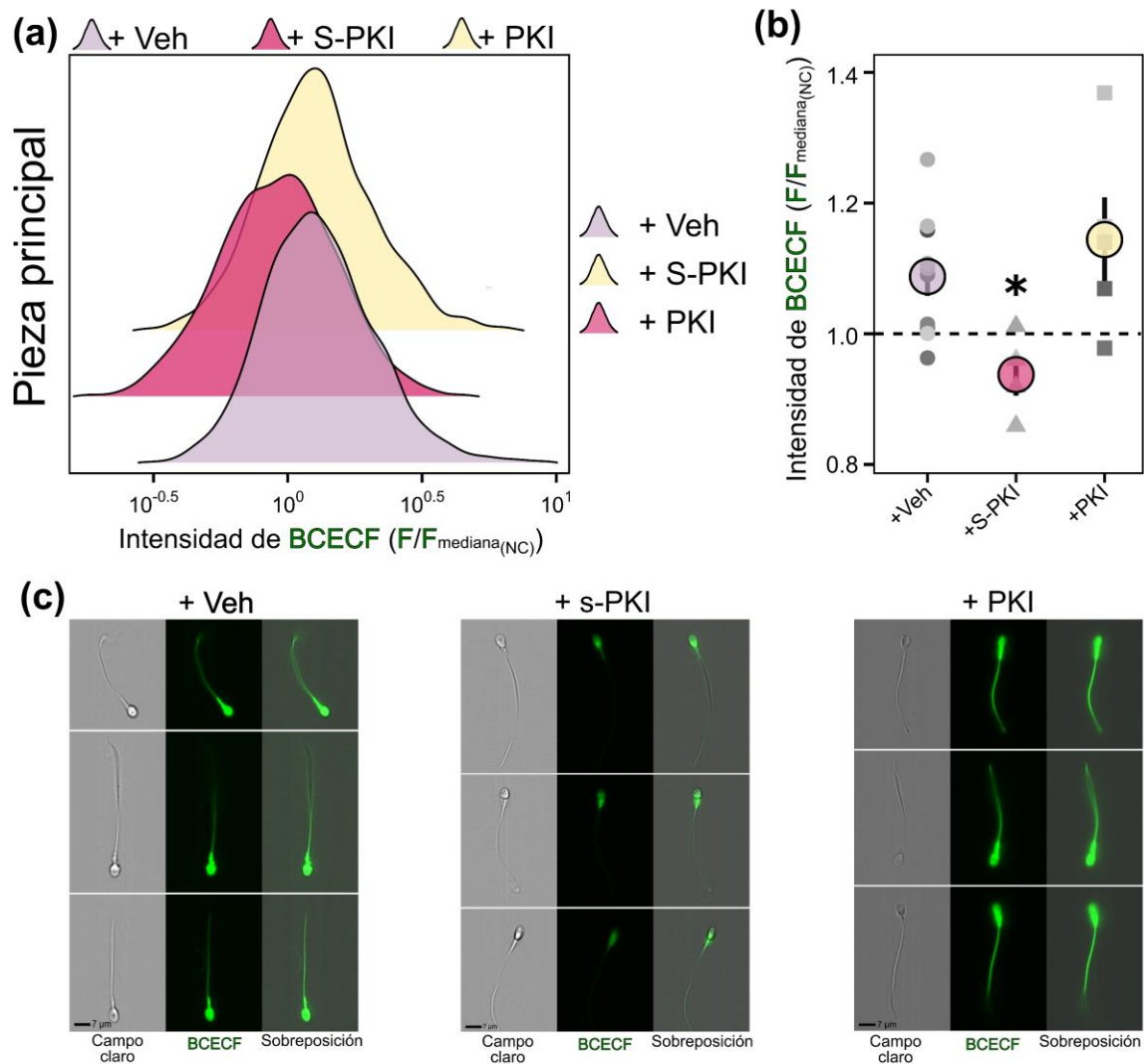
### Figura Suplementaria 3



[Volver al texto principal](#)



Figura Suplementaria 4



**Fig. S4. Efecto del inhibidor específico de PKA, el PKI, en el pHi de los espermatozoides humanos.** (a) Histogramas de densidad de fluorescencia de BCECF de las células incubadas con los diferentes tratamientos: vehículo (Veh), inhibidor permeable de PKA (S-PKI, 1μM), o el inhibidor impermeable de PKA (PKI, 1μM). La información de la fluorescencia de BCECF se relativizó con respecto a la condición no capacitante incubadas con vehículo (NC-Veh) de acuerdo con la [ecuación 1](#) (El promedio de la población NC-Veh (1.00) se representa con la línea punteada). Cada histograma contiene la información de al menos 1000 células por donador. (b) Valores promedio de la fluorescencia relativizada de BCECF. Los puntos de colores indican el promedio ± error estándar de la media. Las líneas curvadas en (b) corresponden al ajuste de un modelo de regresión local. Para las gráficas en (a) y (b) los puntos en escala de grises indican la mediana de la fluorescencia de cada donante (n = 5). Se realizaron pruebas de Krustall-Wallis seguidas de comparaciones múltiples de cada tratamiento con respecto al vehículo del tiempo 240 min. \*  $p < 0.05$  (c) Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con BCECF e incubados con los diferentes tratamientos empleados. [Volver al texto principal](#)



Figura Suplementaria 5

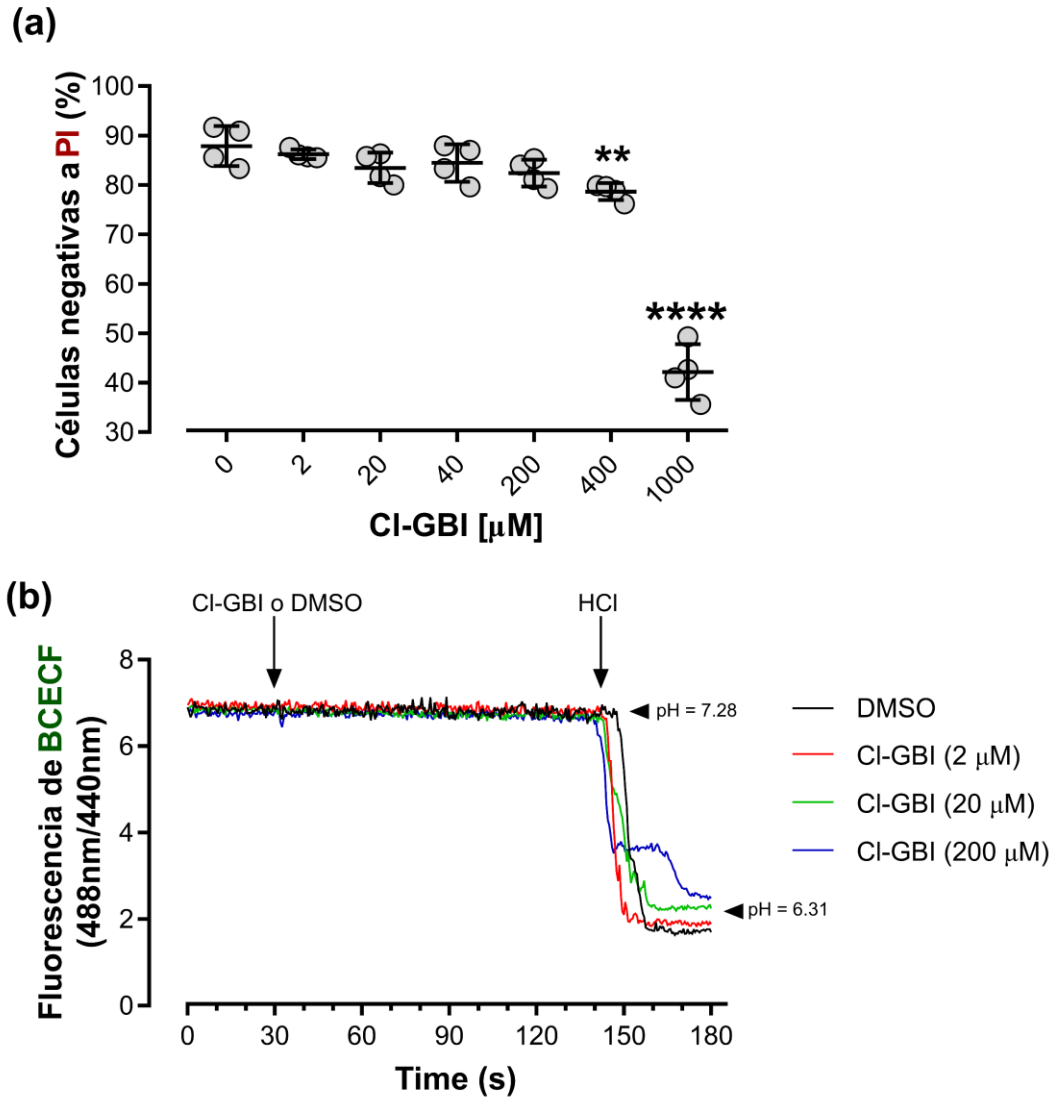


Fig. S5. Efecto del C-GBI en la viabilidad y a fluorescencia de BCECF diluido en medio. (a) Gráfica de puntos que muestra el porcentaje de células negativas a la marca de yoduro de propidio (PI) como un indicio de su viabilidad. Las células se incubaron en presencia de diferentes concentraciones del antagonista de Hv1, el 5-Cloro-Guanidinobenzimidazol (CI-GBI) durante 240 min en medio no capacitante. Los puntos grises representan el porcentaje de viabilidad de cuatro donadores independientes. Las líneas negras horizontales y verticales representan el promedio  $\pm$  el error estándar de la media respectivamente. Se realizó una prueba de ANOVA seguidas de comparaciones múltiples para detectar diferencias estadísticamente significativas.  $**p < 0.01$  y  $****p < 0.0001$  (b) Análisis temporal de la intensidad de fluorescencia de BCECF libre, es decir, solamente el colorante disuelto en medio NC. Se observa la razón de la fluorescencia obtenida al dividir la emisión producto de la excitación a 488 nm (pH dependiente) entre la emisión generada por la excitación a 440 nm (pH independiente). Tras 30 s de medición se hizo la adición de vehículo (DMSO) o diferentes concentraciones de CI-GBI. A los 150 s de medición se realizó la adición de 5 mM de HCl para inducir una acidificación del medio. Los valores en las flechas indican el pH del medio (medido con un potenciómetro convencional) antes y después de la adición de HCl. Datos representativos de uno de cuatro experimentos independientes. [Volver al texto principal](#)



## PRODUCTIVIDAD

### Publicaciones en revistas especializadas

La publicación de los principales resultados de esta tesis se publicó en el año 2020. Desde ese entonces, al mes de julio de 2022, dicho artículo se ha citado un total de 21 veces (de acuerdo con [Google Scholar](#)), indicando la relevancia del trabajo en el campo.

- **Matamoros-Volante, A.**; Treviño, C. L. (2020). Capacitation-associated alkalization in human sperm is differentially controlled at the subcellular level. *J. Cell Sci.* <https://doi.org/10.1242/jcs.238816>

Por otro lado, parte de los resultados de esta tesis aunado a trabajo realizado en colaboración con integrantes del laboratorio permitieron la publicación adicional de dos artículos

- **Matamoros-Volante, A.**; Castillo-Viveros, V.; Torres-Rodríguez, P.; Treviño, M. B.; Treviño, C. L. (2021). Time-lapse flow cytometry: A robust tool to assess physiological parameters related to the fertilizing capability of human sperm. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms22010093>
- Hernández-Garduño, S.; Chavez, J.C.; Matamoros-Volante, A.; Sánchez-Guevara, Y.; Torres, P.; Treviño, C.L.; Nishigaki, T. (2022). Hyperpolarization induces cytosolic alkalization of mouse sperm flagellum probably through sperm Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Reproduction.* <https://doi.org/10.1530/REP-22-0101>

Adicionalmente, trabajos realizados en colaboración abordando temáticas independientes tuvieron como resultado tres artículos de investigación.

- Espadas-Álvarez, H.; Martínez-Rendón, J.; Larre, I.; **Matamoros-Volante, A.**; Romero-García, T.; Rosenbaum, T.; Rueda, A.; García-Villegas, R. (2020). TRPV4 activity regulates nuclear Ca<sup>2+</sup> and transcriptional functions of  $\beta$ -catenin in a renal epithelial cell model. *J. Cell. Physiol.* <https://doi.org/10.1002/jcp.30096>.
- Moreno-Irusta, A.; Domingues, E.; Marín, C.; **Matamoros-Volante, A.**; Lucchesi, O.; Thomes, C.; Treviño, C.L.; Buffone, M.; Lascano, R.; Giojalas, L. (2020). Reactive oxygen species are involved in the signaling of equine sperm chemotaxis. *Reproduction.* <https://doi.org/10.1530/REP-14-0260>
- Moreno-Irusta, A.; Kembro, J.M.; Domínguez, E.M.; **Matamoros-Volante, A.**; Gallea, M.N.; Molina, R.; Guidobaldi, H.A.; Treviño, C.L.; Figueras, M.J.; Babini, A.; et al. (2019). Sperm physiology varies according to ultradian and infradian rhythms. *Sci. Rep.*



### Participación en congresos internacionales

Algunos resultados obtenidos en este trabajo se presentaron en dos congresos internacionales:

- 6<sup>th</sup> International Workshop in Molecular Andrology, septiembre 2019, Giessen, Alemania. Presentación de póster.
- EMBO|FEBS Lecture Course “Ion channels and Transporters: from molecular to human” mayo 2022, Sicilia, Italia. Presentación oral y póster.

### Participación en congresos nacionales

Adicionalmente, parte de los resultados de este trabajo se presentaron en un congreso nacional:

- XXXII Congreso Nacional de Bioquímica, noviembre de 2018, Ixtapa Zihuatanejo, México. Presentación oral.

En el contexto de este congreso obtuve la **mención honorífica** en el concurso “Socios Fundadores” organizado por la Sociedad Mexicana de Bioquímica.

### Nuevos proyectos de investigación

Finalmente, algunas de las observaciones derivadas en esta tesis sentaron las bases ya sea teóricas o metodológicas para el establecimiento de nuevos proyectos de investigación que están desarrollándose en el laboratorio. Estos se incluyen como parte de la tesis de maestría de tres estudiantes de maestría y una estudiante de licenciatura.

- Mariana Olivares (Tesis de Maestría). En su tesis, Mariana está intentando averiguar el papel de la oxidasa de NADPH (NOX5) en la capacitación de los espermatozoides humanos, especialmente si su actividad tiene relación con la función de Hv1. También está aplicando los desarrollos técnicos relacionados con la citometría de flujo acoplada a imágenes, así como de la citometría de adquisición continua.
- Daniel Pérez (Tesis de Maestría). En su tesis, Daniel está realizando mediciones de potencial de membrana y de Ca<sup>2+</sup> intracelular, haciendo uso de la citometría de adquisición continua.
- Emmanuel Rodríguez (Tesis de Maestría). Utilizando la herramienta de citometría de flujo acoplada a imágenes, Emmanuel está haciendo análisis simultáneos de los cambios de pHi, potencial de membrana y Ca<sup>2+</sup> intracelular durante la capacitación de espermatozoides humanos.
- Maritza Soriano (Tesis de Licenciatura). En su tesis, Maritza hará uso de la citometría de adquisición continua para evaluar pHi, potencial de membrana y Ca<sup>2+</sup> intracelular de muestras de espermatozoides de pacientes bajo tratamiento de fertilidad (en una colaboración con una clínica la clínica de reproducción asistida CITMER).



## REFERENCIAS

1. Mortimer, D. The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* **2018**, 0–2, doi:10.1002/pip.452.
2. Chang, M. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature* **1951**, *168*, 697–698.
3. Austin, C.R. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. B.* **1951**, *4*, 581–596, doi:10.1071/bi9510581.
4. Gervasi, M.G.; Visconti, P.E. Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Mol. Reprod. Dev.* **2016**, *83*, 860–874, doi:10.1002/mrd.22663.
5. Steptoe, P.C.; Edwards, R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* **1978**, *2*, 366.
6. Darszon, A.; Nishigaki, T.; Beltran, C.; Trevino, C.L. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 1305–1355, doi:10.1152/physrev.00028.2010.
7. Lishko, P. V.; Kirichok, Y.; Ren, D.; Navarro, B.; Chung, J.-J.; Clapham, D.E. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **2012**, *74*, 453–75, doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153258.
8. Wang, H.; McGoldrick, L.L.; Chung, J.J. Sperm ion channels and transporters in male fertility and infertility. *Nat. Rev. Urol.* **2021**, *18*, 46–66, doi:10.1038/s41585-020-00390-9.
9. Ritagliati, C.; Baro, C.; Stival, C.; Krapf, D. Mechanisms of Development Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mech. Dev.* **2018**, *154*, 33–43, doi:10.1016/j.mod.2018.04.004.
10. Nishigaki, T.; José, O.; González-Cota, A.L.; Romero, F.; Treviño, C.L.; Darszon, A. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *450*, 1149–1158, doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.100.
11. Buffone, M.G.; Krapf, D. Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation. **2020**, *518*, doi:10.1016/j.mce.2020.110992.
12. Ickowicz, D.; Finkelstein, M.; Breitbart, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J. Androl.* **2012**, *14*, 816–821, doi:10.1038/aja.2012.81.
13. Brohi, R.D.; Huo, L.J. Posttranslational Modifications in Spermatozoa and Effects on Male Fertility and Sperm Viability. *Omi. A J. Integr. Biol.* **2017**, *21*, 245–256, doi:10.1089/omi.2016.0173.
14. Ritagliati, C.; Luque, G.M.; Stival, C.; Baro Graf, C.; Buffone, M.G.; Krapf, D. Lysine acetylation modulates mouse sperm capacitation. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–14, doi:10.1038/s41598-018-31557-5.
15. Suarez, S.S. Control of hyperactivation in sperm. *Hum. Reprod. Update* **2008**, *14*, 647–657.
16. Suarez, S.S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J. Dev. Biol.* **2008**, *52*, 455–462, doi:10.1387/ijdb.072527ss.
17. Harper, C. V.; Cummerston, J.A.; White, M.R.H.; Publicover, S.J.; Johnson, P.M. Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 2130–5, doi:10.1242/jcs.030379.
18. Patrat, C.; Serres, C.; Jouannet, P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Cell* **2000**, *92*, 255–266, doi:10.1016/S0248-4900(00)01072-8.
19. Okabe, M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* **2013**, *140*, 4471–9, doi:10.1242/dev.090613.
20. Sun, X.; Zhu, Y.; Wang, L.; Liu, H.; Ling, Y.; Li, Z.; Sun, L. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2017**, *15*, 65, doi:10.1186/s12958-017-0281-2.
21. Zeng, X.-H.; Navarro, B.; Xia, X.-M.; Clapham, D.E.; Lingle, C.J. Simultaneous knockout of Slo3 and CatSper1 abolishes all alkalization- and voltage-activated current in mouse spermatozoa. *J. Gen. Physiol.* **2013**, *142*, 305–13, doi:10.1085/jgp.201311011.
22. Navarro, B.; Kirichok, Y.; Clapham, D.E. KSper, a pH-sensitive K<sup>+</sup> current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 7688–7692, doi:10.1073/pnas.0702018104.
23. Qi, H.; Moran, M.M.; Navarro, B.; Chong, J.A.; Krapivinsky, G.; Krapivinsky, L.; Kirichok, Y.; Ramsey, I.S.; Quill, T. a; Clapham, D.E. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 1219–23, doi:10.1073/pnas.0610286104.
24. Santi, C.M.; Martínez-López, P.; de la Vega-Beltrán, J.L.; Butler, A.; Alisio, A.; Darszon, A.; Salkoff, L. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1041–6, doi:10.1016/j.febslet.2010.02.005.
25. Giroux-Widemann, V.; Jouannet, P.; Pignot-Paintrand, I.; Feneux, D. Effects of pH on the reactivation of human spermatozoa demembrated with triton X-100. *Mol. Reprod. Dev.* **1991**, *29*, 157–162, doi:10.1002/mrd.1080290211.
26. Shapiro, B.M.; Tombes, R.M. A biochemical pathway for a cellular behaviour: pHi, phosphorylcreatine shuttles, and sperm motility. *BioEssays* **3**, 100–103.
27. Hereng, T.H.; Elgstøen, K.B.P.; Eide, L.; Rosendal, K.R.; Skålhegg, B.S. Serum albumin and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> regulate separate





- pools of ATP in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* **2014**, *29*, 918–930, doi:10.1093/humrep/deu028.
28. Mannowetz, N.; Wandernoth, P.M.; Wennemuth, G. Glucose is a pH-dependent motor for sperm beat frequency during early activation. *PLoS One* **2012**, *7*, e41030, doi:10.1371/journal.pone.0041030.
  29. Carrasquel Martínez, G.; Aldana, A.; Carneiro, J.; Treviño, C.L.; Darszon, A. Acrosomal alkalinization occurs during human sperm capacitation. *Mol. Hum. Reprod.* **2022**, *28*, gaac005, doi:10.1093/molehr/gaac005.
  30. Chávez; L., D. la V.J.; Omar, J.; Paulina, T.; Takuya, N.; L., T.C.; Alberto, D. Acrosomal alkalization triggers Ca<sup>2+</sup> release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 4735–4747, doi:10.1002/jcp.26262.
  31. Davis, B.K. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 7560–7564, doi:10.1073/pnas.78.12.7560.
  32. Visconti, P.E. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 667–668, doi:10.1073/pnas.0811895106.
  33. Cross, N.L.; Razy-Faulkner, P. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol. Reprod.* **1997**, *56*, 1169–1174, doi:10.1095/biolreprod56.5.1169.
  34. Casey, J.R. Why bicarbonate? *Biochem. Cell Biol.* **2006**, *84*, 930–939, doi:10.1139/o06-184.
  35. Liu, Y.; Wang, D.-K.D.-K.; Chen, L.-M. The Physiology of Bicarbonate Transporters in Mammalian Reproduction. *Biol. Reprod.* **2012**, *86*, 99–99, doi:10.1095/biolreprod.111.096826.
  36. Ali Akbar, S.; Nicolaidis, K.; Brown, P.. Carbonic anhydrase isoenzymes CAI and CAII in semen, decidua, chorionic villi and various fetal tissues. *Early Hum. Dev.* **1998**, *51*, 205–211, doi:10.1016/S0378-3782(97)00119-9.
  37. José, O.; Torres-Rodríguez, P.; Forero-Quintero, L.S.; Chávez, J.C.; De la Vega-Beltrán, J.L.; Carta, F.; Supuran, C.T.; Deitmer, J.W.; Treviño, C.L. Carbonic anhydrases and their functional differences in human and mouse sperm physiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *468*, 713–718, doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.021.
  38. Parkkila, S.; Kaunisto, K.; Kellokumpu, S.; Rajaniemi, H. A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa. *Histochemistry* **1991**, *95*, 477–482, doi:10.1007/BF00315743.
  39. Mezquita, P. Novel transcripts of carbonic anhydrase II in mouse and human testis. *Mol. Hum. Reprod.* **1999**, *5*, 199–205, doi:10.1093/molehr/5.3.199.
  40. Wandernoth, P.M.; Raubuch, M.; Mannowetz, N.; Becker, H.M.; Deitmer, J.W.; Sly, W.S.; Wennemuth, G. Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. *PLoS One* **2010**, *5*, e15061, doi:10.1371/journal.pone.0015061.
  41. Halmi, P.; Lehtonen, J.; Waheed, A.; Sly, W.S.; Parkkila, S. Expression of hypoxia-inducible, membrane-bound carbonic anhydrase isozyme XII in mouse tissues. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **2004**, *277*, 171–7, doi:10.1002/ar.a.20001.
  42. Lehtonen, J.; Shen, B.; Vihinen, M.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T.; Parkkila, A.-K.; Saarnio, J.; Kivelä, A.J.; Waheed, A.; et al. Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 2719–27, doi:10.1074/jbc.M308984200.
  43. Chávez, J.C.; Hernández-González, E.O.; Wertheimer, E.; Visconti, P.E.; Darszon, A.; Treviño, C.L. Participation of the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl<sup>-</sup> channel CFTR, and the regulatory factor SLC9A3R1 in mouse sperm capacitation. *Biol. Reprod.* **2012**, *86*, 1–14, doi:10.1095/biolreprod.111.094037.
  44. Touré, A.; Lhuillier, P.; Gossen, J.A.; Kuil, C.W.; Lhôte, D.; Jégou, B.; Escalier, D.; Gacon, G. The testis anion transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 1783–93, doi:10.1093/hmg/ddm117.
  45. Chen, W.Y.; Xu, W.M.; Chen, Z.H.; Ni, Y.; Yuan, Y.Y.; Zhou, S.C.; Zhou, W.W.; Tsang, L.L.; Chung, Y.W.; Höglund, P.; et al. Cl<sup>-</sup> Is Required for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Entry Necessary for Sperm Capacitation in Guinea Pig: Involvement of a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Exchanger (SLC26A3) and CFTR1. *Biol. Reprod.* **2009**, *80*, 115–123, doi:10.1095/biolreprod.108.068528.
  46. Zeng, Y.; Oberdorf, J.A.; Florman, H.M. pH regulation in mouse sperm: identification of Na<sup>(+)</sup>-, Cl<sup>(-)</sup>-, and HCO<sub>3</sub><sup>(-)</sup>-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev. Biol.* **1996**, *173*, 510–520.
  47. Demarco, I.A.; Espinosa, F.; Edwards, J.; Sosnik, J.; de la Vega-Beltrán, J.L.; Hockensmith, J.W.; Kopf, G.S.; Darszon, A.; Visconti, P.E. Involvement of a Na<sup>+</sup> /HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7001–7009, doi:10.1074/jbc.M206284200.
  48. Puga Molina, L.C.; Pinto, N.A.; Torres, N.I.; González-Cota, A.L.; Luque, G.M.; Balestrini, P.A.; Romarowski, A.; Krapf, D.; Santi, C.M.; Treviño, C.L.; et al. CFTR/ENaC-dependent regulation of membrane potential during human sperm capacitation is initiated by bicarbonate uptake through NBC. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 9924–9936, doi:10.1074/jbc.RA118.003166.
  49. Puga Molina, L. del C. Mecanismos moleculares asociados a la entrada de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> durante la capacitación espermática humana. *Tesis Dr. Fac. Farm. y Bioquímica, Univ. Buenos Aires* **2018**, *17*.
  50. El Khouri, E.; Whitfield, M.; Stouvenel, L.; Kini, A.; Riederer, B.; Loes, P.; Romermann, D.; di stefano, G.; Drevet, J.R.;



- Saez, F.; et al. Slc26a3 Deficiency is Associated with Epididymis Dysplasia and Impaired Sperm Fertilization Potential in the Mouse. *Mol. Reprod. Dev.* **2018**, 1–14, doi:10.1002/mrd.23055.
51. Dirami, T.; Rode, B.; Jollivet, M.; Da Silva, N.; Escalier, D.; Gaitch, N.; Norez, C.; Tuffery, P.; Wolf, J.P.; Becq, F.; et al. Missense mutations in SLC26A8, encoding a sperm-specific activator of CFTR, are associated with human asthenozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* **2013**, 92, 760–766, doi:10.1016/J.AJHG.2013.03.016.
  52. Höglund, P.; Hihnala, S.; Kujala, M.; Tiitinen, A.; Dunkel, L.; Holmberg, C. Disruption of the SLC26A3-mediated anion transport is associated with male subfertility. *Fertil. Steril.* **2006**, 85, 232–235, doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2005.06.043.
  53. Liu, Y.; Yang, J.; Chen, L.M. Structure and function of SLC4 family HCO<sub>3</sub>-transporters. *Front. Physiol.* **2015**, 6, 1–20, doi:10.3389/fphys.2015.00355.
  54. Parkkila, S.; Rajaniemi, H.; Kellokumpu, S. Polarized expression of a band 3-related protein in mammalian sperm cells. *Biol. Reprod.* **1993**, 49, 326–331, doi:10.1095/biolreprod49.2.326.
  55. Reithmeier, R.A.F.; Casey, J.R.; Kalli, A.C.; Sansom, M.S.P.; Alguel, Y.; Iwata, S. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2016**, 1858, 1507–1532, doi:10.1016/J.BBAMEM.2016.03.030.
  56. Maruyama, S.-Y.; Ito, M.; Ikami, Y.; Okitsu, Y.; Ito, C.; Toshimori, K.; Fujii, W.; Yogo, K. A critical role of solute carrier 22a14 in sperm motility and male fertility in mice. **2016**, doi:10.1038/srep36468.
  57. Ito, M.; Unou, M.; Higuchi, T.; So, S.; Ito, M.; Yogo, K. Dysregulation of intracellular pH is a cause of impaired capacitation in Slc22a14-deficient mice. *Reproduction* **2022**, 163, 23–32, doi:10.1530/REP-21-0135.
  58. Xu, W.M.; Shi, Q.X.; Chen, W.Y.; Zhou, C.X.; Ni, Y.; Rowlands, D.K.; Yi Liu, G.; Zhu, H.; Ma, Z.G.; Wang, X.F.; et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 9816–21, doi:10.1073/pnas.0609253104.
  59. Puga Molina, L.C.; Pinto, N.A.; Torres Rodríguez, P.; Romarowski, A.; Vicens Sanchez, A.; Visconti, P.E.; Darszon, A.; Treviño, C.L.; Buffone, M.G. Essential Role of CFTR in PKA-Dependent Phosphorylation, Alkalinization, and Hyperpolarization During Human Sperm Capacitation. *J. Cell. Physiol.* **2017**, 232, 1404–1414, doi:10.1002/jcp.25634.
  60. Li, C.Y.; Jiang, L.Y.; Chen, W.Y.; Li, K.; Sheng, H.Q.; Ni, Y.; Lu, J.X.; Xu, W.X.; Zhang, S.Y.; Shi, Q.X. CFTR is essential for sperm fertilizing capacity and is correlated with sperm quality in humans. *Hum. Reprod.* **2010**, 25, 317–327, doi:10.1093/humrep/dep406.
  61. Chen, S.-R.; Chen, M.; Deng, S.-L.; Hao, X.-X.; Wang, X.-X.; Liu, Y.-X. Sodium–hydrogen exchanger NHA1 and NHA2 control sperm motility and male fertility. *Cell Death Dis.* **2016**, 7, e2152, doi:10.1038/cddis.2016.65.
  62. Wang, D.; King, S.M.; Quill, T.A.; Doolittle, L.K.; Garbers, D.L. A new sperm-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat. Cell Biol.* **2003**, 5, 1117–1122, doi:10.1038/ncb1072.
  63. Cavarocchi, E.; Whitfield, M.; Chargui, A.; Stouvenel, L.; Lorès, P.; Coutton, C.; Arnoult, C.; Santulli, P.; Patrat, C.; Thierry-Mieg, N.; et al. The sodium/proton exchanger SLC9C1 (sNHE) is essential for human sperm motility and fertility. *Clin. Genet.* **2021**, 99, 684–693, doi:10.1111/cge.13927.
  64. Lishko, P. V.; Botchkina, I.L.; Fedorenko, A.; Kirichok, Y. Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. *Cell* **2010**, 140, 327–337, doi:10.1016/j.cell.2009.12.053.
  65. Miller, M.R.; Kenny, S.J.; Mannowetz, N.; Mansell, S.A.; Wojcik, M.; Mendoza, S.; Zucker, R.S.; Xu, K.; Lishko, P. V. Asymmetrically Positioned Flagellar Control Units Regulate Human Sperm Rotation. *Cell Rep.* **2018**, 24, 2606–2613, doi:10.1016/j.celrep.2018.08.016.
  66. Ohyoshi, E.; Hamada, Y.; Nakata, K.; Kohata, S. The interaction between human and bovine serum albumin and zinc studied by a competitive spectrophotometry. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, 75, 213–218, doi:10.1016/S0162-0134(99)00090-2.
  67. Lishko, P. V.; Kirichok, Y. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J. Physiol.* **2010**, 588, 4667–4672, doi:10.1113/jphysiol.2010.194142.
  68. Hernández-González, E.O.; Treviño, C.L.; Castellano, L.E.; de la Vega-Beltrán, J.L.; Ocampo, A.Y.; Wertheimer, E.; Visconti, P.E.; Darszon, A. Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 24397–406, doi:10.1074/jbc.M701603200.
  69. Diao, R.; Fok, K.L.; Zhao, L.; Chen, H.; Tang, H.; Chen, J.; Zheng, A.; Zhang, X.; Gui, Y.; Chan, H.C.; et al. Decreased expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impairs sperm quality in aged men. *Reproduction* **2013**, 146, 637–645, doi:10.1530/REP-13-0146.
  70. Darszon, A.; Nishigaki, T.; López-González, I.; Visconti, P.E.; Treviño, C.L. Differences and similarities: The richness of comparative sperm physiology. *Physiology* **2020**, 35, 196–208, doi:10.1152/physiol.00033.2019.
  71. Miller, M.R.; Mansell, S.A.; Meyers, S.A.; Lishko, P. V. Cell Calcium Flagellar ion channels of sperm : similarities and differences between species. *Cell Calcium* **2015**, 58, 105–113, doi:10.1016/j.ceca.2014.10.009.
  72. Mishra, A.K.; Kumar, A.; Swain, D.K.; Yadav, S.; Nigam, R. Insights into pH regulatory mechanisms in mediating



- spermatozoa functions. *Vet. World* **2018**, *11*, 852–858, doi:10.14202/vetworld.2018.852-858.
73. Matamoros-Volante, A.; Moreno-Irusta, A.; Torres-Rodriguez, P.; Giojalas, L.; Gervasi, M.G.; Visconti, P.E.; Treviño, C.L. Semi-automatized segmentation method using image-based flow cytometry to study sperm physiology: the case of capacitation-induced tyrosine phosphorylation. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* **2018**, *24*, 64–73, doi:10.1093/molehr/gax062.
  74. Alasmari, W.; Costello, S.; Correia, J.; Oxenham, S.K.; Morris, J.; Fernandes, L.; Ramalho-Santos, J.; Kirkman-Brown, J.; Michelangeli, F.; Publicover, S.; et al. Ca<sup>2+</sup> Signals Generated by CatSper and Ca<sup>2+</sup> Stores Regulate Different Behaviors in Human Sperm. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 6248–6258, doi:10.1074/jbc.M112.439356.
  75. Dickens, C.J.; Maguiness, S.D.; Comer, M.T.; Palmer, A.; Rutherford, A.J.; Leese, H.J. Physiology: Human tubal fluid: Formation and composition during vascular perfusion of the fallopian tube. *Hum. Reprod.* **1995**, *10*, 505–508, doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a135978.
  76. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. *WHO Press* **2010**, *FIFTH EDIT*, 286, doi:10.1038/aja.2008.57.
  77. Gunderson, S.J.; Puga Molina, L.C.; Spies, N.; Balestrini, P.A.; Buffone, M.G.; Jungheim, E.S.; Riley, J.; Santi, C.M. Machine-learning algorithm incorporating capacitated sperm intracellular pH predicts conventional in vitro fertilization success in normospermic patients. *Fertil. Steril.* **2021**, *115*, 930–939, doi:10.1016/j.fertnstert.2020.10.038.
  78. Okamura, N.; Tajima, Y.; Soejima, A.; Masuda, H.; Sugita, Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 9699–9705, doi:10.1007/BF01744498.
  79. Buffone, M.G.; Wertheimer, E. V.; Visconti, P.E.; Krapf, D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 2610–20, doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.013.
  80. Battistone, M.A.; Da Ros, V.G.; Salicioni, A.M.; Navarrete, F.A.; Krapf, D.; Visconti, P.E.; Cuasnicú, P.S. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Mol. Hum. Reprod.* **2013**, *19*, 570–80, doi:10.1093/molehr/gat033.
  81. Qiu, F.; Chamberlin, A.; Watkins, B.M.; Ionescu, A.; Perez, M.E.; Barro-Soria, R.; González, C.; Noskov, S.Y.; Larsson, H.P. Molecular mechanism of Zn<sup>2+</sup> inhibition of a voltage-gated proton channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E5962–E5971, doi:10.1073/pnas.1604082113.
  82. Berger, T.K.; Fußhöller, D.M.; Goodwin, N.; Bönigk, W.; Müller, A.; Dokani Khesroshahi, N.; Brenker, C.; Wachten, D.; Krause, E.; Kaupp, U.B.; et al. Post-translational cleavage of Hv1 in human sperm tunes pH- and voltage-dependent gating. *J. Physiol.* **2017**, *00*, 1–14, doi:10.1113/JP273189.
  83. Hong, L.; Kim, I.H.; Tombola, F. Molecular determinants of Hv1 proton channel inhibition by guanidine derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 9971–6, doi:10.1073/pnas.1324012111.
  84. Battistone, M.A.; Alvau, A.; Salicioni, A.M.; Visconti, P.E.; Da Ros, V.G.; Cuasnicú, P.S. Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase a activation during human sperm capacitation. *Mol. Hum. Reprod.* **2014**, *20*, 1054–1066, doi:10.1093/molehr/gau073.
  85. Alvau, A.; Battistone, M.A.; Gervasi, M.G.; Navarrete, F.A.; Xu, X.; Sánchez-Cárdenas, C.; De la Vega-Beltran, J.L.; Da Ros, V.G.; Greer, P.A.; Darszon, A.; et al. The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation- associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development* **2016**, *143*, 2325–2333, doi:10.1242/dev.136499.
  86. Brukman, N.G.; Nuñez, S.Y.; Puga Molina, L. del C.; Buffone, M.G.; Darszon, A.; Cuasnicu, P.S.; Da Ros, V.G. Tyrosine phosphorylation signaling regulates Ca<sup>2+</sup> entry by affecting intracellular pH during human sperm capacitation. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 5276–5288.
  87. Rotem, R.; Pazt, G.F.; Homonnait, Z.T.; Kalinat, M.; Naor, Z. *Protein kinase C is present in human sperm: Possible role in flagellar motility (immunohistochemistry/phorbol ester)*; 1990; Vol. 87;.
  88. Teijeiro, J.M.; Marini, P.E.; Bragado, M.J.; Garcia-Marin, L.J. Protein kinase C activity in boar sperm. *Andrology* **2017**, *5*, 381–391, doi:10.1111/andr.12312.
  89. Yu, H.; Diao, H.; Wang, C.; Lin, Y.; Yu, F.; Lu, H.; Xu, W.; Li, Z.; Shi, H.; Zhao, S.; et al. Acetylproteomic analysis reveals functional implications of lysine acetylation in human spermatozoa (sperm). *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14*, 1009–1023, doi:10.1074/mcp.M114.041384.
  90. Sun, G.; Jiang, M.; Zhou, T.; Guo, Y.; Cui, Y.; Guo, X.; Sha, J. Insights into the lysine acetylproteome of human sperm. *J. Proteomics* **2014**, *109*, 199–211, doi:10.1016/j.jprot.2014.07.002.
  91. Marquez, B.; Suarez, S.S. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline-Stimulated Ca<sup>2+</sup> Influx1. *Biol. Reprod.* **2007**, *76*, 660–665, doi:10.1095/biolreprod.106.055038.
  92. Santo-Domingo, J.; Demareux, N. The renaissance of mitochondrial pH. *J. Gen. Physiol.* **2012**, *139*, 415–423, doi:10.1085/JGP.201110767.



93. Sun-Wada, G.-H.; Imai-Senga, Y.; Yamamoto, A.; Murata, Y.; Hirata, T.; Wada, Y.; Futai, M. A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 18098–105, doi:10.1074/jbc.M111567200.
94. Casey, J.R.; Grinstein, S.; Orłowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 50–61, doi:10.1038/nrm2820.
95. Dubbin, P.N.; Cody, S.H.; Williams, D.A. Intracellular pH mapping with SNARF-1 and confocal microscopy. II: pH gradients within single cultured cells. *Micron* **1993**, *24*, 581–586, doi:10.1016/0968-4328(93)90035-Y.
96. al-Baldawi, N.F.; Abercrombie, R.F. Cytoplasmic hydrogen ion diffusion coefficient. *Biophys. J.* **1992**, *61*, 1470–1479, doi:10.1016/S0006-3495(92)81953-7.
97. Ludwig, F.T.; Schwab, A.; Stock, C. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger (NHE1) generates pH nanodomains at focal adhesions. *J. Cell. Physiol.* **2013**, *228*, 1351–1358, doi:10.1002/jcp.24293.
98. Martin, C.; Pedersen, S.F.; Schwab, A.; Stock, C. Intracellular pH gradients in migrating cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2011**, *300*, 490–495, doi:10.1152/ajpcell.00280.2010.
99. Ro, H.A.; Carson, J.H. pH microdomains in oligodendrocytes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 37115–37123, doi:10.1074/jbc.M403099200.
100. De-la-Rosa, V.; Suárez-Delgado, E.; Rangel-Yescas, G.E.; Islas, L.D. Currents through Hv1 channels deplete protons in their vicinity. *J. Gen. Physiol.* **2016**, *147*, 127–136, doi:10.1085/jgp.201511496.
101. Carlson, A.E.; Hille, B.; Babcock, D.F. External Ca<sup>2+</sup> acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev. Biol.* **2007**, *312*, 183, doi:10.1016/J.YDBIO.2007.09.017.
102. Chávez, J.C.; Darszon, A.; Treviño, C.L.; Nishigaki, T. Quantitative Intracellular pH Determinations in Single Live Mammalian Spermatozoa Using the Ratiometric Dye SNARF-5F. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *7*, 1–13, doi:10.3389/fcell.2019.00366.
103. Owen, D.H.; Katz, D.F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J. Androl.* **2005**, *26*, 459–469, doi:10.2164/jandrol.04104.
104. Figueiras-Fierro, D.; Acevedo, J.J.; Martínez-López, P.; Escoffier, J.; Sepúlveda, F. V.; Balderas, E.; Orta, G.; Visconti, P.E.; Darszon, A. Electrophysiological evidence for the presence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in mouse sperm. *J. Cell. Physiol.* **2013**, *228*, 590–601, doi:10.1002/jcp.24166.
105. Massey, M.K.; Reiterman, M.J.; Mourad, J.; Luckie, D.B. Is CFTR an exchanger?: Regulation of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Transport and extracellular pH by CFTR. *Biochem. Biophys. Reports* **2021**, *25*, 100863, doi:10.1016/j.bbrep.2020.100863.
106. Gadella, B.; Leahy, T. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian J. Androl.* **2015**, *17*, 561, doi:10.4103/1008-682X.153309.
107. Buffone, M.G.; Verstraeten, S. V.; Calamera, J.C.; Doncel, G.F. High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *J. Androl.* **2009**, *30*, 552–558, doi:10.2164/jandrol.108.006551.
108. Zhao, R.; Dai, H.; Arias, R.J.; De Blas, G.A.; Orta, G.; Pavarotti, M.A.; Shen, R.; Perozo, E.; Mayorga, L.S.; Darszon, A.; et al. Direct activation of the proton channel by albumin leads to human sperm capacitation and sustained release of inflammatory mediators by neutrophils. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41467-021-24145-1.
109. Balbach, M.; Ghanem, L.; Rossetti, T.; Kaur, N.; Ritagliati, C.; Ferreira, J.; Krapf, D.; Puga Molina, L.C.; Santi, C.M.; Hansen, J.N.; et al. Soluble adenylyl cyclase inhibition prevents human sperm functions essential for fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* **2021**, *27*, 1–13, doi:10.1093/molehr/gaab054.
110. Wertheimer, E.; Krapf, D.; De La Vega-Beltran, J.L.; Sánchez-Cárdenas, C.; Navarrete, F.; Haddad, D.; Escoffier, J.; Salicioni, A.M.; Levin, L.R.; Buck, J.; et al. Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 35307–35320, doi:10.1074/jbc.M113.489476.
111. King, J.D.; Fitch, A.C.; Lee, J.K.; McCane, J.E.; Mak, D.-O.D.; Foskett, J.K.; Hallows, K.R. AMP-activated protein kinase phosphorylation of the R domain inhibits PKA stimulation of CFTR. *AJP Cell Physiol.* **2009**, doi:10.1152/ajpcell.00677.2008.
112. Chin, S.; Yang, D.; Miles, A.J.; Eckford, P.D.W.; Molinski, S.; Wallace, B.A.; Bear, C.E. Attenuation of Phosphorylation-dependent Activation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) by Disease-causing Mutations at the Transmission Interface. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 1988–1999, doi:10.1074/jbc.M116.762633.
113. Chappel, V.; Irvine, T.; Liao, J.; Evagelidis, A.; Hanrahan, J.W. Phosphorylation of CFTR by PKA promotes binding of the regulatory domain. *EMBO J.* **2005**, *24*, 2730–40, doi:10.1038/sj.emboj.7600747.
114. Hernández-Garduño, S.; Chavez, J.C.; Matamoros-Volante, A.; Sánchez-Guevara, Y.; Torres, P.; Treviño, C.L.; Nishigaki, T. Hyperpolarization induces cytosolic alkalization of mouse sperm flagellum probably through sperm Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Reproduction* **2022**, *1*, doi:10.1530/REP-22-0101.
115. Windler, F.; Bönigk, W.; Körschen, H.G.; Grahn, E.; Strünker, T.; Seifert, R.; Kaupp, U.B. The solute carrier SLC9C1 is a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger gated by an S4-type voltage-sensor and cyclic-nucleotide binding. **2021**, doi:10.1038/s41467-



018-05253-x.

116. Takeshita, K.; Sakata, S.; Yamashita, E.; Fujiwara, Y.; Kawanabe, A.; Kurokawa, T.; Okochi, Y.; Matsuda, M.; Narita, H.; Okamura, Y.; et al. X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 352–7, doi:10.1038/nsmb.2783.
117. Baro Graf, C.; Ritagliati, C.; Torres-Monserrat, V.; Stival, C.; Carizza, C.; Buffone, M.G.; Krapf, D. Membrane Potential Assessment by Fluorimetry as a Predictor Tool of Human Sperm Fertilizing Capacity. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *7*, 1–10, doi:10.3389/fcell.2019.00383.
118. Puga-Molina, L.C.P.; Gunderson, S.; Riley, J.; Lybaert, P.; Borrego-Alvarez, A.; Jungheim, E.S.; Santi, C.M. Membrane Potential Determined by Flow Cytometry Predicts Fertilizing Ability of Human Sperm. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *7*, 1–12, doi:10.3389/fcell.2019.00387.
119. Patrat, C.; Serres, C.; Jouannet, P. Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* **2002**, *66*, 1775–1780, doi:10.1095/biolreprod66.6.1775.
120. Brown, S.G.; Publicover, S.J.; Mansell, S.A.; Lishko, P. V.; Williams, H.L.; Ramalingam, M.; Wilson, S.M.; Barratt, C.L.R.; Sutton, K.A.; Da Silva, S.M. Depolarization of sperm membrane potential is a common feature of men with subfertility and is associated with low fertilization rate at IVF. *Hum. Reprod.* **2016**, *31*, 1147–1157, doi:10.1093/humrep/dew056.
121. Matamoros-Volante, A.; Castillo-Viveros, V.; Torres-Rodríguez, P.; Treviño, M.B.; Treviño, C.L. Time-lapse flow cytometry: A robust tool to assess physiological parameters related to the fertilizing capability of human sperm. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–18, doi:10.3390/ijms22010093.
122. Moritz Schladt, T.; Berger, T.K. Voltage and pH difference across the membrane control the S4 voltage-sensor motion of the Hv1 proton channel. **2020**, doi:10.1038/s41598-020-77986-z.
123. Cherny, V. V.; Markin, V.S.; DeCoursey, T.E. The voltage-activated hydrogen ion conductance in rat alveolar epithelial cells is determined by the pH gradient. *J. Gen. Physiol.* **1995**, *105*, 861–96.
124. Hamamah, S.; Magnoux, E.; Royere, D.; Barthelemy, C.; Dacheux, J.L.; Gatti, J.L. Internal pH of human spermatozoa: effect of ions, human follicular fluid and progesterone. *Mol. Hum. Reprod.* **1996**, *2*, 219–224.
125. Pathak, M.M.; Tran, T.; Hong, L.; Joós, B.; Morris, C.E.; Tombola, F. The Hv1 proton channel responds to mechanical stimuli. *J. Gen. Physiol.* **2016**, *148*, 405–418, doi:10.1085/jgp.201611672.
126. Mundt, N.; Spehr, M.; Lishko, P. V. TRPV4 is the temperature-sensitive ion channel of human sperm. *Elife* **2018**, *7*, doi:10.7554/eLife.35853.
127. Visconti, P.E.; Bailey, J.L.; Moore, G.D.; Pan, D.; Olds-Clarke, P.; Kopf, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa: II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **1995**, *121*, 1129–1137.
128. Morgan, D.J.; Weisenhaus, M.; Shum, S.; Su, T.; Zheng, R.; Zhang, C.; Shokat, K.M.; Hille, B.; Babcock, D.F.; McKnight, G.S. Tissue-specific PKA inhibition using a chemical genetic approach and its application to studies on sperm capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, doi:10.1073/pnas.08109711105\r0810971105 [pii].
129. Alvau, A.; Battistone, M.A.; Gervasi, M.G.; Navarrete, F.A.; Xu, X.; Sánchez-Cárdenas, C.; De la Vega-Beltran, J.L.; Da Ros, V.G.; Greer, P.; Darszon, A.; et al. The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development* **2016**, dev.136499, doi:10.1242/dev.136499.
130. Musset, B.; Capasso, M.; Cherny, V. V.; Morgan, D.; Bhamrah, M.; Dyer, M.J.S.; DeCoursey, T.E. Identification of Thr29 as a critical phosphorylation site that activates the human proton channel Hvcn1 in leukocytes. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 5117–5121, doi:10.1074/jbc.C109.082727.
131. Rotem, R.; Pazt, G.F.; Homonnait, Z.T.; Kalinat, M.; Naor, Z. Protein kinase C is present in human sperm: Possible role in flagellar motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 7305–7308.
132. Kalina, M.; Socher, R.; Rotem, R.; Naor, Z. Ultrastructural localization of protein kinase C in human sperm. *J. Histochem. Cytochem.* **1995**, *43*, 439–445, doi:10.1177/43.4.7897184.
133. Samanta, L.; Swain, N.; Ayaz, A.; Venugopal, V.; Agarwal, A. Post-Translational Modifications in sperm Proteome: The Chemistry of Proteome diversifications in the Pathophysiology of male factor infertility. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2016**, *1860*, 1450–1465, doi:10.1016/j.bbagen.2016.04.001Review.
134. Wang, Y.; Wan, J.; Ling, X.; Liu, M.; Zhou, T. The human sperm proteome 2.0: An integrated resource for studying sperm functions at the level of posttranslational modification. *Proteomics* **2016**, *16*, 2597–2601, doi:10.1002/PMIC.201600233.
135. Ho, H.-C.; Granish, K.A.; Suarez, S.S. Hyperactivated Motility of Bull Sperm Is Triggered at the Axoneme by Ca<sup>2+</sup> and Not cAMP. *Dev. Biol.* **2002**, *250*, 208–217, doi:10.1006/dbio.2002.0797.
136. Luconi, M.; Porazzi, I.; Ferruzzi, P.; Marchiani, S.; Forti, G.; Baldi, E. Tyrosine Phosphorylation of the A Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and Soluble Adenylate Cyclase Are Involved in the Increase of Human Sperm Motility by Bicarbonate. *Biol. Reprod.* **2005**, *72*, 22–32, doi:10.1095/BIOLREPROD.104.032490.



137. Avenarius, M.R.; Hildebrand, M.S.; Zhang, Y.; Meyer, N.C.; Smith, L.L.H.; Kahrizi, K.; Najmabadi, H.; Smith, R.J.H. Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *Am. J. Hum. Genet.* **2009**, *84*, 505–510, doi:10.1016/j.ajhg.2009.03.004.
138. Kirichok, Y.; Navarro, B.; Clapham, D.E. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature* **2006**, *439*, 737–740, doi:10.1038/nature04417.
139. Hwang, J.Y.; Mannowetz, N.; Zhang, Y.; Everley, R.A.; Gygi, S.P.; Bewersdorf, J.; Lishko, P. V.; Chung, J.J. Dual Sensing of Physiologic pH and Calcium by EFCAB9 Regulates Sperm Motility. *Cell* **2019**, *177*, 1480-1494.e19, doi:10.1016/j.cell.2019.03.047.
140. Chung, J.-J.J.; Shim, S.-H.H.; Everley, R.A.; Gygi, S.P.; Zhuang, X.; Clapham, D.E. Structurally distinct Ca<sup>2+</sup> signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell* **2014**, *157*, 808–822, doi:10.1016/j.cell.2014.02.056.
141. Matamoros-Volante, A. Cambios de pH intracelular durante el proceso de capacitación en espermatozoides humanos (Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas), Universidad Nacional Autónoma de México, 2017.
142. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer-Verlag New York, 2009; ISBN 978-0-387-98140-6.
143. R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing 2018.

