



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Posgrado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Biotecnología

Trabajo para optar por el grado de Maestría en Ciencias Bioquímicas

**“Evaluación simultánea de los cambios de calcio intracelular, potencial de membrana y pH intracelular durante la capacitación en espermatozoides de humano.”**

### **Presenta**

Lic. Emmanuel Rodríguez Zamarripa

### **Tutor principal**

Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Instituto de Biotecnología

### **Comité tutorial**

Dra. Lorraine Jaimes Hoy – Instituto de Biotecnología

Dr. Carlos Muñoz Garay – Instituto de Ciencias Físicas

**Cuernavaca, Morelos.**

**Noviembre 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **FINANCIAMIENTO**

El proyecto de maestría contó con los siguientes aportes económicos:

- Beca de manutención por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), No. de CVU: 1145041.
- Se recibió financiamiento de parte de DGAPA/UNAM con clave IN207122 para CT.
- Apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) para la asistencia a congreso nacional (XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica – Mérida, Yucatán) y la realización de una estancia de investigación en el extranjero (Instituto Gulbenkian de Ciência – Lisboa, Portugal).

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

- Un enorme agradecimiento a mi tutora la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz, por ser más que una guía académica con quien ha sido un placer trabajar, por dejarme compartir este tiempo para conocer la extraordinaria mujer que es y que admiro muchísimo.
- A los líderes académicos del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide, el Dr. Alberto Darszon y el Dr. Takuya Nishigaki, por todo el apoyo brindado a mi proyecto, sugerencias y observaciones que me ayudaron a desempeñar mejor mi trabajo.
- A los investigadores asociados, la Dra. Carmen Beltrán, el Dr. Julio Chávez y el Dr. Ignacio López, por contribuir de manera importante al desarrollo de mi trabajo de maestría.
- A los técnicos de laboratorio del CFE, la M. Paulina Torres, la M. Yoloxóchitl Sánchez y el Biol. José Luis de la Vega, por todo el apoyo para el desarrollo de mis experimentos y de que siempre tuviera lo necesario para poder trabajar.
- Al Dr. Arturo Matamoros Volante, porque además de ser un gran amigo fue mi principal mentor en todas las dudas de trabajo y crisis que los experimentos fallidos me causaban. Gracias por ayudarme a entender que así es la vida de un científico.

- Al Dr. Jorge Carneiro, con quien tuve oportunidad de trabajar durante mi estancia en Portugal. Gracias por permitirme explotar mis habilidades y descubrir mi gusto por la programación. Me siento muy afortunado de haber conocido a una persona tan increíble como usted.
- Al Dr. Andrés Aldana, exintegrante del CFE y ahora gran colaborador, por la disposición a mis dudas y por brindarme las herramientas necesarias para mis primeros encuentros con la programación.
- A la Dra. Marta Monteiro por haberme permitido trabajar y ser parte de la Unidad de Citometría en el Instituto Gulbenkian de Ciencia durante mi estancia en Portugal, darme la oportunidad de conocer de mi trabajo, sus sugerencias y herramientas brindadas para trabajar durante mi estancia.
- A las técnicas de la Unidad de Citometría de Flujo del IGC en Portugal, Telma Costa y Beatriz Texeira. Gracias por el apoyo brindado a mi proyecto, sus observaciones y las lecciones personales de FlowJo que me ayudaron muchísimo.
- A todo el personal del Laboratorio Nacional de Microscopía, el M. Andrés Saralegui, el Dr. Arturo Pimentel, la Dra. Verónica Rojo y el Dr. Adán Guerrero, por permitirme trabajar en sus instalaciones y estar siempre a disposición de mi trabajo.
- A la Dra. Lorraine Jaimes y el Dr. Carlos Garay, por ser parte de mi comité tutorial durante estos 2 años, gracias por todas las preguntas y sugerencias que hicieron que culminara de manera satisfactoria este proyecto.
- A todos los integrantes de mi comité revisor, la Dra. Rosa Navarro, la Dra. Denhi Schanbel, el Dr. Adán Guerrero, la Dra. Mayel Chirinos y el Dr. Juan José Acevedo, por sus muy valiosas observaciones y el tiempo dedicado a la revisión de todo el trabajo que realicé estos 2 años.
- Amplio agradecimiento al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) por brindarme los recursos necesarios para la asistencia al XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica en Mérida, Yucatán y la realización de una estancia de investigación en el Instituto Gulbenkian de Ciência en Lisboa, Portugal.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- A toda mi familia. A mis papás, gracias por siempre estar para mí, porque a la distancia sus llamadas y mensajes siempre me sirvieron mucho, en los mejores y en los peores momentos. Por ser mi principal soporte y alentarme a cumplir todos los propósitos que este trabajo conllevó en mi vida profesional y personal. A mis hermanos, por ser también parte de esta aventura, animándome y estando al pendiente de mí. Gracias por ser todo y más de lo que merezco.
- A mis abuelos, Tita, Tito, Quique y Nachita<sup>†</sup> por ser y estar siempre al pendiente de mí y de mi trabajo. Porque sus llamadas, sus palabras y su presencia significa todo para mí.
- A mis amigos de laboratorio: Erika, Mariana, Dani e Hiram. Gracias por todas las risas y aventuras juntos, por ser ahora una familia para mí y porque muchas veces que yo sentí que ya no podía, ustedes sin saberlo me hicieron sentir y saber que sí, que sí podía.
- A mis amigas de Aguascalientes que a la distancia nunca me soltaron: Joce, Paula y Diana. Gracias porque en mis peores momentos o cuando más quería soltar la toalla, estuvieron siempre para mí.
- A mis amigas de generación, Maura y Azeret. Gracias por ahora ser parte de mi vida, por las porras que entre nosotros nos dimos para culminar esta etapa tan importante y por las aventuras que fueron y que vendrán para nosotros, juntos y separados. Las quiero millones.
- A mis amigas Telma y Bea de la Unidad de Citometría, así como a los compañeros de la Unidad de Microscopía del Instituto Gulbenkian de Ciencia: Patricia, Manuel, Gabriel, Alex y Mariana. Gracias por recibirme con tanto cariño en el IGC, por los desayunos y meriendas juntos, las recomendaciones para conocer Portugal. Tienen un pedazo enorme de mi corazón.
- A mi psicóloga Angie, por acompañarme durante la mayoría de mi proyecto, ayudándome a ir contra esos monstruos que se involucraban en el desarrollo de mi trabajo. Gracias por ayudarme a estar aquí.

## DEDICATORIA

*A mis padres, mis principales motores, que siempre me han apoyado para que mis sueños y metas se cumplan.*

*A mí, porque en todo este viaje de aprendizaje, de crecimiento personal y profesional, muchas veces creí que no iba a poder. Y sí, sí pude.*

*Gracias*

*Emmi*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS .....	8
RESUMEN.....	10
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 La fecundación.....	12
1.1.1 El espermatozoide en el proceso de fecundación .....	12
1.2 El espermatozoide.....	12
1.2.1 Anatomía del espermatozoide .....	13
1.3 La capacitación .....	14
1.3.1 Base molecular de la capacitación.....	14
1.4 Papel del Ca <sup>2+</sup> y el pH <sub>i</sub> en la capacitación.....	15
1.5 Papel del potencial de membrana en la capacitación.....	17
2. ANTECEDENTES .....	18
3. HIPÓTESIS .....	21
4. OBJETIVOS.....	21
5. METODOLOGÍA.....	22
5.1 Materiales.....	22
<i>Medio HTF NC y CAP.....</i>	<i>22</i>
5.2 Métodos .....	22
<i>Obtención de muestras.....</i>	<i>22</i>
<i>Cuádruple tinción .....</i>	<i>22</i>
<i>Citometría de flujo .....</i>	<i>23</i>
<i>Identificación de la población de espermatozoide segmentada .....</i>	<i>25</i>
<i>Identificación de subpoblaciones de espermatozoides.....</i>	<i>26</i>
<i>Algoritmos de agrupamiento.....</i>	<i>27</i>
6. RESULTADOS.....	28
<i>La segmentación e identificación de los compartimentos subcelulares de los espermatozoides es posible en el AMNIS. ....</i>	<i>28</i>
<i>La tinción cuádruple permitió el monitoreo de los parámetros bioquímicos de espermatozoides sin el sobrelape de fluorescencia .....</i>	<i>30</i>
<i>La centrifugación tiene un efecto despolarizante en la membrana plasmática del espermatozoide.....</i>	<i>39</i>

<i>El inicio de la capacitación desencadena los cambios más importantes en <math>[Ca^{+2}]_i</math>, <math>pH_i</math> y <math>Em</math> en el espermatozoide, coincidiendo en algunos de sus segmentos.....</i>	42
<i>La detección de una subpoblación con aumento en <math>[Ca^{+2}]_i</math> y <math>pH_i</math>, pero despolarización de <math>Em</math>, abre la exploración de más parámetros importantes asociados a la capacitación .....</i>	47
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<i>El análisis de los parámetros característicos de la capacitación sirve como herramienta para el análisis de la fertilidad masculina .....</i>	52
<i>El inicio de la capacitación constituye el arranque más importante de los cambios fisiológicos que le suceden al espermatozoide.....</i>	54
<i>Los algoritmos de agrupamiento contribuyen en la búsqueda de subpoblaciones de espermatozoides ante los cambios inducidos por la capacitación.....</i>	56
<i>El análisis de subpoblaciones arrojó una gran heterogeneidad celular y la formación de un grupo de espermatozoides con características particulares.....</i>	58
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>62</b>
<b>FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. El espermatozoide humano.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 2. Modelo de la vía de señalización del <math>Ca^{+2}</math> y <math>HCO_3^-</math> en la capacitación.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 3. Esquema general inicial de la metodología propuesta para la cuádruple tinción de espermatozoides y adquisición de imágenes en el citómetro de flujo AMNIS.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 4. Segmentación de espermatozoides en sus diferentes porciones subcelulares.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 5. Artefacto detectado en la identificación de la pieza media de los espermatozoides en las imágenes adquiridas en el AMNIS. ....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 6. Compensación de la fluorescencia de los colorantes usados en la tinción cuádruple. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 7. Comparación de las imágenes del espermatozoide teñido con la combinación de colorantes 2 en los canales de emisión de fluorescencia del AMNIS. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 8. Comportamiento de los colorantes de <math>[Ca^{+2}]_i</math> en la población de espermatozoides en condiciones NC y CAP. ....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 9. Comportamiento de los colorantes de <math>pH_i</math> en la población de espermatozoides en condiciones NC y CAP. ....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 10. Comportamiento de los colorantes de <math>Em</math> en la población de espermatozoides en condiciones NC y CAP. ....</b>	<b>38</b>



Figura 11. Comportamiento de la fluorescencia de los colorantes de $[Ca^{+2}]_i$ , pHi y Em bajo las condiciones NC y CAP's.....	40
Figura 12. Fluorescencia normalizada de las condiciones NC y CAP de la cinética sin centrifugación.....	41
Figura 13. Comportamiento de la población de espermatozoides respecto al cambio en los parámetros $[Ca^{+2}]_i$ , pHi y Em a distintas condiciones NC y CAP. ....	42
Figura 14. Distribución de la población de espermatozoides respecto al cambio en los parámetros $[Ca^{+2}]_i$ , pHi y Em a distintas condiciones NC y CAP. ....	43
Figura 15. Valores normalizados del cambio en los parámetros $[Ca^{+2}]_i$ , pHi y Em a distintas condiciones NC y CAP, en los segmentos celulares del espermatozoide. ....	45
Figura 16. Representación gráfica de los datos en 3D y bajo el uso de algoritmos de reducción de dimensionalidad (PCA, t-SNE y UMAP). ....	47
Figura 17. Identificación de las células dentro de la subpoblación segregada en capacitación.....	48
Figura 18. Heterogeneidad y distribución biparamétrica de los espermatozoides en función de los cambios bioquímicos de la capacitación.....	50
Figura 19. Comparación del cambio en el porcentaje de población para la aparición de señal de pHi, $[Ca^{+2}]_i$ y Em, entre la población y subpoblación de espermatozoides. ....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características y condiciones de análisis de los colorantes en el citómetro de flujo AMNIS. ....	23
Tabla 2. Concentración final de los colorantes para la tinción de espermatozoides humanos.....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1. Diseño de panel de colorantes en Spectrum Viewer. ....	63
Figura suplementaria 2. Tamizaje de la población de espermatozoides. ....	64
Figura suplementaria 3. Comparación de la señal de fluorescencia a diferentes concentraciones de colorantes para $[Ca^{+2}]_i$ y pHi en espermatozoide humano. ....	65
Figura suplementaria 4. Histogramas normalizados de $[Ca^{+2}]_i$ y pHi a los diferentes tratamientos no capacitantes y capacitantes. ....	66
Figura suplementaria 5. Adición de CCCP en espermatozoides teñidos con DiSC <sub>3</sub> . ....	67
Figura suplementaria 6. Simulación de datos para la corrección del spillover de los colorantes utilizados. ....	68

## ABREVIATURAS

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración de calcio intracelular
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion calcio
<b>cAMP</b>	AMP cíclico
<b>CAP0</b>	Tiempo 0/incial de capacitación
<b>CAP1</b>	Tiempo 1 hr de capacitación
<b>CAP3</b>	Tiempo 3 hr de capacitación
<b>CAP6</b>	Tiempo 6 hr de capacitación
<b>Em</b>	Potencial de membrana
<b>H<sup>+</sup></b>	Ion hidrógeno
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Ion bicarbonato
<b>IVF</b>	Fertilización in vitro
<b>ICSI</b>	Inyección intracitoplásmica de espermatozoides
<b>K<sup>+</sup></b>	Ion potasio
<b>μM</b>	Micromolar
<b>μL</b>	Microlitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ion sodio
<b>NC</b>	No capacitante / No capacitación
<b>pHi</b>	Potencial de hidrógeno intracelular
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>pTyr</b>	Fosforilación de tirosinas
<b>Pg</b>	Progesterona
<b>RA</b>	Reacción acrosomal
<b>sAC</b>	Adenil ciclasa soluble

## RESUMEN

El proceso de capacitación del espermatozoide humano es un conjunto de cambios fisiológicos que ocurren en estas células durante su trayecto por el tracto reproductivo femenino, preparándolos para la fertilización. Este proceso es esencial para garantizar que los espermatozoides más aptos y funcionales tengan acceso al óvulo, aumentando las posibilidades de éxito en la reproducción. Entre los principales cambios que se han catalogado como características propias de la capacitación está el incremento del calcio intracelular ( $[Ca^{+2}]_i$ ), la alcalinización del pH intracelular (pHi) y la hiperpolarización de la membrana plasmática (Em), que surgen también como potenciales indicadores de la fertilidad masculina.

La interrelación entre los cambios de estos parámetros sigue siendo tema de análisis, pues se ha buscado determinar la contribución que orquestan para que se desarrolle la capacitación. En este trabajo se diseñó un panel de citometría de flujo para el análisis de los cambios en  $[Ca^{+2}]_i$ , pHi, Em y viabilidad celular. Bajo la técnica de citometría de flujo acoplada a imágenes, se realizó un análisis cualitativo de los valores de fluorescencia en los segmentos del espermatozoide durante distintos tiempos de capacitación.

Encontramos que al inicio de la capacitación se presenta el principal incremento en  $[Ca^{+2}]_i$ , la alcalinización del pHi y la hiperpolarización de Em, simultáneamente en la cabeza y la pieza principal del espermatozoide. Confirmamos un fenómeno de despolarización de la membrana asociado a la centrifugación, previamente reportado por nuestro grupo. Mediante la adquisición de imágenes, evidenciamos la heterogeneidad en las respuestas espermáticas, encontrando células con cambios en solo uno o dos de los parámetros analizados. Se identificó la subpoblación con incremento simultáneo en los tres parámetros lo largo de la capacitación, así como otra porción de células con aumento en  $[Ca^{+2}]_i$ , pHi, y una disminución en Em. A pesar de la variabilidad en las respuestas celulares, podemos afirmar que estos parámetros están relacionados en el desarrollo de cambios bioquímicos de la capacitación, vinculados al éxito reproductivo y al diagnóstico de infertilidad masculina.

## ABSTRACT

The human sperm capacitation process is a set of physiological changes that occur in these cells during their journey through the female reproductive tract, preparing them for fertilization. This process is essential to ensure that the fittest and most functional sperm have access to the egg, increasing the chances of reproductive success. Among the main changes that have been classified as characteristics of training are the increase in intracellular calcium ( $[Ca^{+2}]_i$ ), the alkalinization of the intracellular pH ( $pH_i$ ) and the hyperpolarization of the plasma membrane ( $E_m$ ), which arise also as potential indicators of male fertility.

The interrelation between the changes in these parameters continues to be a subject of analysis, since an attempt has been made to determine the contribution, they orchestrate to the development of capacitation. In this work, a flow cytometry panel was designed for the analysis of changes in  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$ ,  $E_m$  and cell viability. Using the imaging flow cytometry technique, we did a qualitative analysis of the fluorescence values in the sperm segments during different capacitation times.

We found that at the beginning of capacitation, the main increase in  $[Ca^{+2}]_i$ , alkalinization of  $pH_i$  and hyperpolarization of  $E_m$  occur simultaneously in the head and main piece of the sperm. We confirm a phenomenon of membrane depolarization associated with centrifugation, previously reported by our group. Through image acquisition, we evidenced the heterogeneity in sperm responses, finding cells with changes in only one or two of the analyzed parameters. The subpopulation with a simultaneous increase in the three parameters throughout training was identified, as well as another portion of cells with an increase in  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$ , and a decrease in  $E_m$ . Despite the variability in cellular responses, we can affirm that these parameters are related to the development of biochemical changes in capacitation, linked to reproductive success and the diagnosis of male infertility.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 La fecundación

La fecundación es la secuencia de eventos moleculares coordinados que involucran la fusión de un gameto masculino (espermatozoide) con un gameto femenino (óvulo), creando así una célula única diploide –el cigoto–, del cual surgirá un nuevo individuo (Georgadaki et al., 2016). Cada una de estas células sexuales pasa por cambios bioquímicos que permiten su maduración e interacción, asegurando así la conjunción de sus membranas celulares y pronúcleos, formando una célula con material genético único.

### 1.1.1 El espermatozoide en el proceso de fecundación

La fecundación requiere la activación del espermatozoide. Para que este se active, pasa por una serie de pasos comprenden el proceso de capacitación, hiperactivación y reacción acrosomal, posibilitando fisiológicamente su capacidad de fecundación, ya que posteriormente ocurre la penetración de la zona pelúcida y por último la unión del espermatozoide con el ovocito. El proceso de fecundación finaliza con la fusión de la membrana plasmática espermática-ovocítica, activando al ovocito y desencadenando el proceso de desarrollo embrionario (Cannarella et al., 2020).

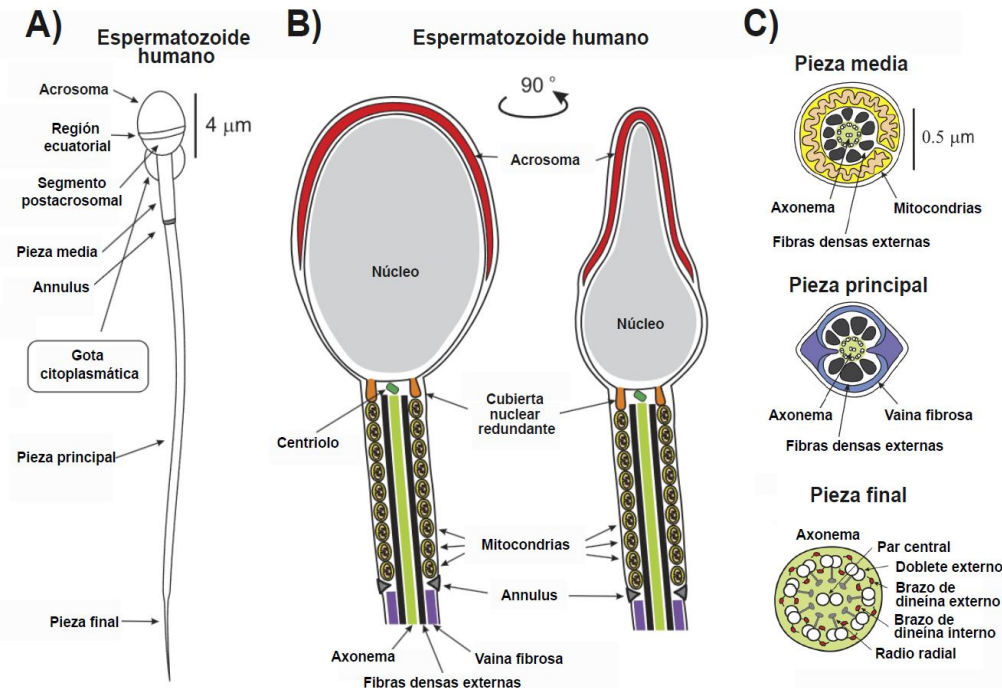
## 1.2 El espermatozoide

El espermatozoide es una célula haploide altamente especializada en mantener y entregar la información genética paterna al ovocito durante la fecundación. Se produce en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos del testículo, durante un proceso que inicia en la pubertad llamado espermatogénesis (Orsolini et al., 2021). Los espermátocitos más primitivos maduran migrando hacia el lumen y se transforman en espermátidas. Estos espermatozoides son inmóviles y se liberan en el epidídimo para madurar. En el epidídimo, los espermatozoides tardan cerca de 12 días en madurar y desarrollar su motilidad, almacenándose hasta que se produce la eyaculación (Gurung *et al*, 2022).

### 1.2.1 Anatomía del espermatozoide

En términos generales, se compone de dos partes: cabeza y flagelo, y este último a su vez se divide en pieza media, pieza principal y pieza terminal (Figura 1). Un espermatozoide humano normal tiene una cabeza oval con un contorno liso, y en su extremo apical un organelo bien definido correspondiente al acrosoma (Lehti & Sironen, 2017). Durante las fases finales de la espermatogénesis, las mitocondrias del espermatozoide se ensamblan helicoidalmente en la pieza media, adoptando entonces el papel de maquinaria energética, encargada de generar el ATP necesario para la motilidad, a partir de la contribución de diferentes vías metabólicas que desarrolla el espermatozoide, particularmente de la glucólisis y la fosforilación oxidativa (Sengupta *et al.*, 2020).

La cabeza tiene 4-5  $\mu\text{m}$  de largo y el acrosoma abarca hasta el 40% del área total de la misma, la pieza media mide 1.5x veces el tamaño de la cabeza, y el flagelo en su totalidad alcanza hasta los 50  $\mu\text{m}$  (Maree *et al.*, 2010).



**Figura 1. El espermatozoide humano.** A) Diagrama completo de una célula espermática humana. Se compone de la cabeza y el flagelo, este último dividido en 3 piezas: media, principal y terminal. En la parte superior de la cabeza está el acrosoma, junto con segmentos ecuatorial y postacrosomal. Cerca de la pieza media se encuentra la gota citoplasmática, observada solamente

en espermatozoides inmaduros. La pieza media y principal están unidas por el anillo. B) Segmentos de la cabeza y pieza media del espermatozoide humano, vistos a ángulos distintos. El núcleo ocupa en su mayoría el área de la cabeza, solo una pequeña porción es del acrosoma. La envoltura nuclear redundante y el centriolo están en la base de la cabeza. El axonema está rodeado por las fibras densas externas en la pieza media y principal. La batería de mitocondrias flagelares se encuentra en la pieza media. C) Corte transversal de las piezas del flagelo, en todas ellas el axonema es la porción más interna, compuesta por el arreglo 9+2 de microtúbulos y brazos de dineínas internos y externos. En la pieza media se rodea por las fibras densas externas y por las mitocondrias; mientras que en la pieza principal se recubre por las vainas fibrosas y las fibras densas externas. (Modificado de Darszon et al., 2011).

### **1.3 La capacitación**

El proceso de capacitación espermática hace referencia a los cambios fisiológicos por los que pasan los espermatozoides de mamíferos en el tracto reproductor femenino, antes de estar listos para fertilizar un ovocito (Austin, 1952; Chang, 1951), ya que, al liberarse durante la eyaculación, los espermatozoides no cuentan con esta capacidad. Específicamente se dan cambios en el flagelo, que desarrolla una motilidad con un cambio en el batido flagelar llamado hiperactivación, y que permite al espermatozoide despegarse del epitelio en su trayecto en busca del ovocito a fertilizar, así como en la penetración del mismo (Yanagimachi, 1994; Ritagliati et al., 2018); y en la cabeza, que gracias a la capacitación se prepara para el desarrollo de la reacción acrosomal, un proceso de exocitosis que libera enzimas que actúan sobre la zona pelúcida del ovocito y facilitan la penetración del espermatozoide hasta el oolema. (Austin & Bishop, 1958; Gervasi & Visconti, 2016).

#### **1.3.1 Base molecular de la capacitación**

La capacitación se lleva a cabo a partir de una serie ordenada e interrelacionada de mecanismos moleculares que se inician por estímulos extracelulares. Mediante estudios *in vitro* se ha determinado que la capacitación se asocia entre otros, a los siguientes eventos (Brukman *et al.*, 2019):

- Remoción de colesterol de la membrana plasmática (Visconti *et al.*, 1999).

- Activación de la vía de señalización de AMP cíclico (AMPC)/ proteína cinasa A (PKA) e incremento de la fosforilación tanto en serinas y treoninas como en tirosinas (pTyr) (Visconti *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1995).
- Aumento de los niveles de  $[Ca^{+2}]_i$  (Baldi *et al.*, 1991; Ruknudin & Silver, 1990).
- Alcalinización del citoplasma (Zeng *et al.*, 1996).
- Hiperpolarización de la membrana plasmática (López-González *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 1995).

#### 1.4 Papel del $Ca^{+2}$ y el $pH_i$ en la capacitación

La señalización por  $Ca^{+2}$  es un mecanismo conservado en muchos tipos celulares, en particular en el espermatozoide modula la motilidad al incrementar la asimetría en el batido flagelar (Wang *et al.*, 2021). El axonema en los flagelos de los espermatozoides es la estructura que funge como motor, pues tiene sitios de unión a  $Ca^{+2}$  que regulan la curvatura de esas estructuras, a partir de la modulación de la proteína motora dineína ATPasa. Estos cambios resultan en una motilidad hiperactivada dependiente del  $Ca^{+2}$  extracelular que principalmente ingresa a la célula a través del canal específico del espermatozoide llamado CatSper (Kirichok *et al.*, 2006).

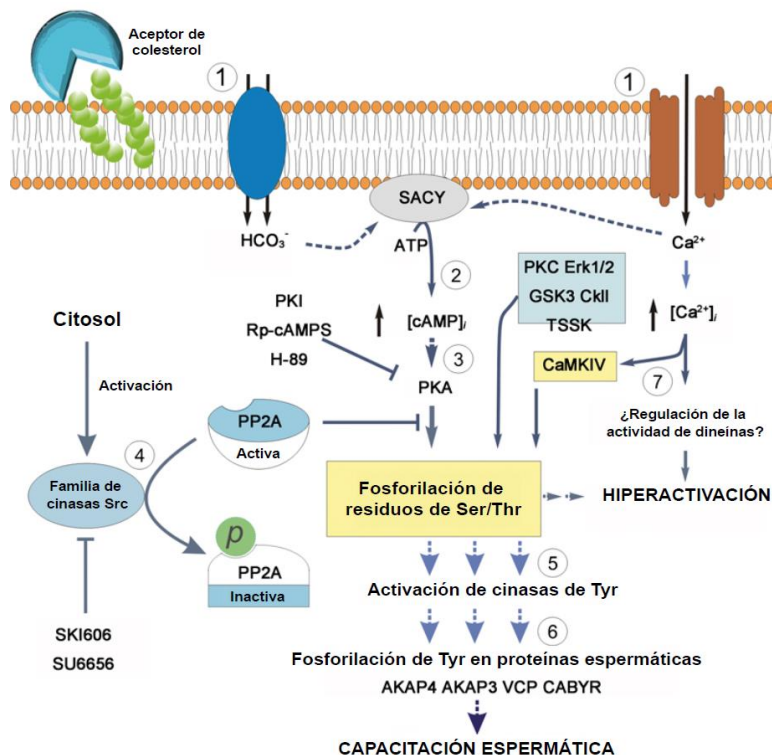
La alcalinización intracelular, por su parte, es esencial para el desarrollo de respuestas fisiológicas, que son cruciales para la fertilización, y esto sugiere la existencia de mecanismos para controlar el  $pH_i$  intracelular. El mecanismo implicado en la transferencia de protones desde el citoplasma a través de la membrana plasmática del espermatozoide hacia el entorno extracelular es un evento específico de cada especie y, además, varía de una célula a otra (Mishra *et al.*, 2018). Este estudio también indica que la regulación del  $pH_i$  se da a partir de mecanismos específicos que involucran a los transportadores de  $HCO_3^-$  (p. ej. SLC4, SLC26, CFTR, NBC, etc.), el canal de protones Hv1 dependiente de voltaje, y el intercambiador sNHE de  $Na^+/H^+$ , entre otros.

Investigaciones apuntan que el canal de protones Hv1 es el principal regulador del  $pH_i$  para desencadenar la capacitación en espermatozoides de humano,



resaltando que su actividad está vinculada a generar un microambiente alcalino que provoca el aumento de  $[Ca^{+2}]_i$  por la activación de CatSper (Lishko *et al.*, 2010; Matamoros-Volante & Treviño, 2020). Hv1 junto con CatSper, se encuentran en la pieza principal del flagelo y están asociados al desarrollo de la motilidad hiperactivada.

El  $Ca^{+2}$  y el  $HCO_3^-$  actúan como activadores de las adenil ciclasas (sAC) para la producción de cAMP. Este segundo mensajero activa PKA, y finalmente con eventos río abajo, culmina con la fosforilación de residuos de tirosinas (pTyr) en proteínas flagelares involucradas en la motilidad (Visconti *et al.*, 2011). Además, el cAMP es necesario para mantener la función mitocondrial y la producción de ATP (Bravo *et al.*, 2016; Nowicka-Bauer & Szymczak-Cendlak, 2021). En la Figura 2 se representa la interconexión del pHi y la entrada de  $Ca^{+2}$  con las respuestas celulares anteriormente descritas.



**Figura 2. Modelo de la vía de señalización del  $Ca^{+2}$  y  $HCO_3^-$  en la capacitación.** A partir de canales específicos (p.ej. CatSper) entra  $Ca^{+2}$  (1) y activan sAC, aumentando las concentraciones de cAMP (2), y desencadenando la activación de PKA (3). Canales específicos para la entrada de  $HCO_3^-$  (1) también fomentan la activación de sAC y al igual que el  $Ca^{+2}$ , el desarrollo de toda la

cascada de señalización para la activación de PKA. La fosforilación de PKA esta regulada por fosfatasa como PP2 (4). PKA fosforila residuos de Ser/Thr que activan tirosina cinasas (TyrK) (5), promoviendo la fosforilación de Tyr en proteínas espermáticas (AKAP4, AKAP3, etc.), favoreciendo la capacitación (6).  $Ca^{+2}$  también afecta la regulación de la actividad de dineínas, conduciendo a la hiperactivación (Modificado de Visconti et al., 2011).

### **1.5 Papel del potencial de membrana en la capacitación**

Durante la capacitación, la membrana del espermatozoide humano se hiperpolariza, es decir, aumenta su carga neta negativa al interior de la célula. Se ha reportado la variación de los valores del potencial de membrana a condiciones capacitantes (CAP) y no capacitantes (NC) con diferentes técnicas como los aportados por patch clamp (Brown *et al.* en 2016), con valores de -10 y -40 mV respectivamente, por espectrofluorometría de -32 mV para NC y -54.6 mV para CAP (Baro Graf *et al.*, 2020) y de -63 y -71 mV para NC y CAP respectivamente usando TFLC (time lapse flow-cytometry, por sus siglas en inglés) (Matamoros-Volante et al., 2021).

La hiperpolarización de la membrana plasmática está ligada a la elevación de cAMP en el espermatozoide humano (Martínez-López *et al.*, 2009; Escoffier *et al.*, 2015; Puga Molina *et al.*, 2017; Molina et al., 2018), atribuyéndose en gran medida al eflujo de  $K^{+}$  a partir de canales específicos, tales como SLO1 y SLO3, pero también se ha propuesto la participación que tiene el  $Na^{+}$ , a través de canales tipo ENAC (Visconti *et al.*, 2011).

## 2. ANTECEDENTES

El acercamiento más común para la detección de las disfunciones espermáticas es a partir de la evaluación de los parámetros seminales micro y macroscópicos: p.ej. volumen seminal, pH, motilidad espermática, vitalidad y morfología, que son conocidos como un seminograma (Ford, 2010). La OMS desde 1980 propuso valores de referencia para los seminogramas, sin embargo, la utilidad de estos parámetros como predictores de la fertilidad están en debate por no ofrecer datos suficientemente certeros para determinar la fertilidad o infertilidad masculina (Cooper *et al.*, 2010; Bracke *et al.*, 2018).

De esta problemática surge la necesidad de encontrar nuevos indicadores que puedan utilizarse para la predicción de la fertilidad masculina. Esfuerzos a lo largo de muchos grupos de investigación en el mundo, incluidos los del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide del IBt, remarcan la importancia que tiene el incremento de  $pH_i$ ,  $[Ca^{+2}]_i$  y la hiperpolarización del Em como marcadores de la capacitación que son esenciales para la fertilización y que pueden servir como herramientas predictoras asociadas a técnicas de reproducción asistida para hombres con problemas de infertilidad (Matamoros-Volante *et al.*, 2021).

A la fecha, existen investigaciones que sugieren que  $pH_i$ ,  $[Ca^{+2}]_i$  y Em pueden utilizarse como predictores de la fertilidad. A continuación, se presentan algunos de ellos:

Kelly *et al.*, (2018) estudiaron a partir de análisis de célula única el aumento de  $[Ca^{+2}]_i$  inducido por progesterona (PG) en espermatozoide de pacientes subfértiles y su relación con los resultados de la fertilización en distintas técnicas de reproducción asistida. Los grupos analizados fueron donantes fértiles usados como control, individuos con tratamiento de fertilización *in vitro* (IVF) exitosa y no exitosa, e individuos con tratamiento de inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). Se encontró una respuesta menor de la entrada de  $[Ca^{+2}]_i$  en pacientes con tratamiento no exitoso de IVF y en ICSI, en comparación con los de IVF exitoso y donadores sanos.

Gunderson *et al.* (2019) determinaron los cambios de  $pH_i$  utilizando citometría de flujo, trabajando muestras de donantes y de pacientes bajo tratamiento de IVF e ICSI, en condiciones NC y CAP. En este trabajo se encontró una asociación positiva entre las tasas de fertilización de los pacientes en tratamiento IVF, ya que pacientes cuyos espermatozoides tuvieron valores de  $pH_i > 6.8$  alcanzaron tasas de éxito en fertilización de hasta el 70%, en comparación con porcentajes de éxito menores al 50%, correspondiente a pacientes cuya muestra de espermatozoides tuvo valores de  $pH_i < 6.8$ .

Molina *et al.*, (2020) asociaron la hiperpolarización de la membrana como un factor predictivo del éxito en pacientes bajo tratamiento IVF, haciendo uso de la citometría de flujo. A partir del análisis de muestras de espermatozoides de pacientes subfértiles, se encontró que los valores de potencial promedio en pacientes con una tasa de fertilización  $> 0.7$  considerada como positiva fue de  $-58$  mV, en comparación con aquellos con tasas negativas de  $< 0.7$  que tuvieron valores de  $-40$  mV.

Uno de los trabajos llevados a cabo dentro de nuestro grupo de investigación, es el de Matamoros-Volante *et al.*, (2021), en el que se realizaron mediciones absolutas de los cambios de  $E_m$  y  $pH_i$  en condiciones NC y CAP en espermatozoides de humano para grupos de paternidad conocida (con conocimiento de tener hijos) y no conocida (sin conocimiento de hijos y sin problemas de fertilidad), con el uso de TLFC (Time-Lapse Flow Cytometry) se obtuvo el valor absoluto de  $E_m$ :  $-60$  mV para los espermatozoides NC y  $-70$  mV para los CAP en el grupo de paternidad conocida.

En lo referente al  $pH_i$ , se encontraron valores estimados absolutos de  $pH_i$  de 6.6 en NC a 7.0 en CAP para el grupo de paternidad conocida, mientras que en el grupo de paternidad no conocida se presentó un proceso de acidificación. Se realizó también la medición cualitativa del comportamiento del  $[Ca^{+2}]_i$  en respuesta a la adición de progesterona (Pg) para condiciones NC y CAP. El grupo de paternidad conocida de condición NC a CAP presentó un mayor valor de entrada  $[Ca^{+2}]_i$  comparado contra los de paternidad no conocida.

Con estos ejemplos se puede concluir que el monitoreo de las condiciones capacitantes y su papel en la respuesta espermática, el aumento en  $[Ca^{+2}]_i$ , la alcalinización del  $pH_i$  y la hiperpolarización de  $E_m$  pueden considerarse como predictores de la funcionalidad del espermatozoide. A la fecha ninguna investigación ha realizado la medición de estos 3 parámetros de manera simultánea, por lo que no se sabe cambian en la misma célula y al mismo tiempo. Observaciones en múltiples laboratorios indican que la población espermática en una muestra es muy heterogénea, también se ha establecido que solo una subpoblación de espermatozoide se capacita, determinado con un parámetro a la vez (Escoffier *et al.*, 2012).

### 3. HIPÓTESIS

Los cambios de  $pH_i$ ,  $[Ca^{+2}]_i$  y potencial de membrana que caracterizan a la capacitación ocurren en la misma subpoblación de espermatozoides y están subcelular y temporalmente relacionados.

### 4. OBJETIVOS

- ***Objetivo general***

Comprender la relación existente entre los cambios de  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$  y  $E_m$  durante la capacitación en espermatozoides de humano.

- ***Objetivos específicos***

1. Investigar la dinámica de los cambios en  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$  y  $E_m$  usando microscopía de flujo.
2. Analizar la variación del  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$  y  $E_m$  durante la capacitación espermática y determinar si existe coincidencia entre ellos a nivel subcelular y temporal.
3. Identificar la existencia de subpoblaciones que presenten uno o más cambios de entre los parámetros y comprender su contribución en el contexto de la capacitación.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Materiales

#### ***Medio HTF NC y CAP***

El medio de cultivo no capacitante (NC) contiene los siguientes reactivos (en mM): KCl 4.68, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.37, NaCl 90, MgSO<sub>4</sub> - 7H<sub>2</sub>O 0.2, Glucosa 2.78, CaCl<sub>2</sub> - 2H<sub>2</sub>O 1.8, Piruvato de sodio 0.33, Lactato Na<sup>+</sup> 21.39, HEPES 23.8. Para convertirlo en medio capacitante (CAP) se le adiciona albúmina sérica bovina (BSA) 5mg/ml y NaHCO<sub>3</sub> 30 mM. Ambos medios se ajustan a pH 7.4 antes de usarse.

### 5.2 Métodos

#### ***Obtención de muestras***

Las muestras de espermatozoides se obtienen de donantes sanos, con abstinencia sexual de 2-5 días. Para el estudio se toman en cuenta solo las muestras con parámetros seminales normales (acordes a los criterios de la OMS, 2010). Las muestras se licuan por 30 min a 37°C bajo una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire. Los espermatozoides móviles se separan mediante la técnica de *swim-up*, utilizando medio HTF NC con duración de 1 h a 37°C y con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire (Matamoros-Volante & Trevino, 2020).

#### ***Cuádruple tinción***

A partir de una concentración de 10x10<sup>6</sup> células/mililitro de las alícuotas de espermatozoides en medio NC, se utilizaron 2 combinaciones de colorantes para determinar cuál permitía de mejor forma el análisis de los parámetros: el colorante pHRodo Red (Invitrogen) y el colorante BCECF-AM (Invitrogen) para visualizar cambios de pH; Fluo4-AM (ThermoFisher Scientific) y Calbryte-590 (AAT Bioquest) para la determinación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Las combinaciones fueron pHRodo Red junto Fluo4-AM, y Calbryte-590 junto con BCECF-AM, definiéndose como más aptas o accesibles al analizar los espectros de absorción y emisión con el uso de herramientas como Spectral Viewer (AAT Bioquest).

Se determinó la concentración para cada uno de los colorantes a partir de curvas de calibración. Una vez seleccionada la concentración óptima se realizó la incubación por 20 min de cada uno de ellos. Posterior a la incubación, se centrifugaron las células y se resuspendió el pellet en medio HTF NC y CAP 2x, aquellas con medio CAP se incubaron a tiempo inicial, 1 hr y 3 hrs.

Después del lavado de los primeros marcadores, en ambas condiciones se ajustó el volumen aproximado de 150  $\mu$ L para concentrar las células y se agrega el marcador de potencial de membrana DiSC<sub>3</sub> (Invitrogen), en agitación constante durante 5 min a 37°C. Antes de pasar al citómetro de flujo, se agregó el colorante Sytox Blue (ThermoFisher Scientific) para medir la viabilidad celular.

### **Citometría de flujo**

Para el desarrollo de los experimentos se utilizó el citómetro de flujo acoplado a imágenes Amnis® ImageStream® X Mark II (AMNIS). 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. En la **Tabla 1** se resume la información correspondiente a la longitud de absorción y emisión de cada colorante utilizado, así como los canales de detección en el citómetro y la potencia de láser utilizada para las adquisiciones.

**Tabla 1.** Características y condiciones de análisis de los colorantes en el citómetro de flujo AMNIS.

Parámetro	Fluorocromo	$\lambda$ absorción (nm)	$\lambda$ emisión (nm)	Canal de detección AMNIS	Potencia utilizada del láser (mW)
<b>COMBINACIÓN DE COLORANTES 1</b>					
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Fluo4-AM	494	516	2	75
pHi	pHRodo Red	560	585	4	20
Em	DiSC <sub>3</sub>	500	705	11	100
Viabilidad celular	Sytox Blue	444	480	7	100
<b>COMBINACIÓN DE COLORANTES 2</b>					
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Calbryte-590	581	593	4	200
pHi	BCECF-AM	490	535	2	100
Em	DiSC <sub>3</sub>	500	705	11	50
Viabilidad celular	Sytox Blue	444	480	7	100



Para normalizar los datos y calibrar de manera cualitativa las respuestas de fluorescencia, se utilizó la siguiente fórmula:

$$F_{normalizada} = \frac{F_{basal}}{F_{máxima}}$$

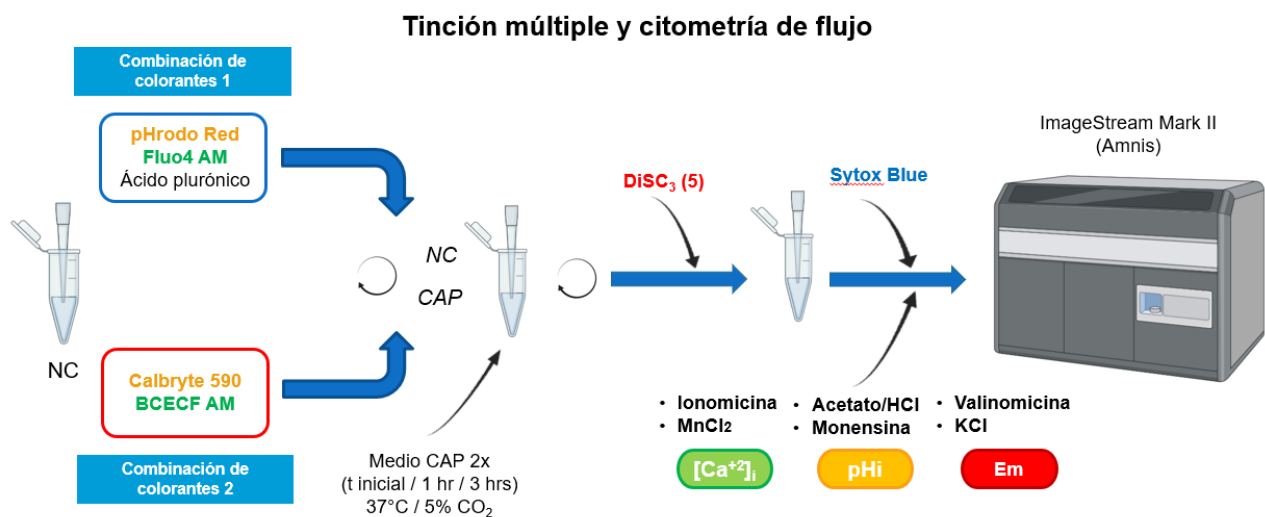
Donde:

$F_{normalizada}$  = valor normalizado de fluorescencia

$F_{basal}$  = mediana del valor basal de fluorescencia para las condiciones NC y CAP

$F_{máxima}$  = mediana del valor máximo de fluorescencia

Se utilizaron reactivos para encontrar el máximo de fluorescencia de cada parámetro; en el caso del  $[Ca^{+2}]_i$  se utilizó ionomicina 10  $\mu$ M; para pH intracelular monensina 1  $\mu$ M, y para Em, valinomicina 1  $\mu$ M. Estos se adicionaron después de agregar el marcador de viabilidad Sytox Blue y anterior a la carga de la muestra en el citómetro de flujo AMNIS (**Figura 3**).



**Figura 3. Esquema general inicial de la metodología propuesta para la cuádruple tinción de espermatozoides y adquisición de imágenes en el citómetro de flujo AMNIS.**

### ***Identificación de la población de espermatozoide segmentada***

A partir de la creación de las máscaras de célula entera, cabeza, flagelo y pieza media, estas regiones se analizaron a partir de las “Features” o Propiedades que el software IDEAS (versión 6.2; Luminex) contiene, tales como Área, Aspect Ratio o Relación de Aspecto, Ancho, Largo, Intensidad de Fluorescencia, etc. Partiendo de esto y bajo el procedimiento sugerido por Matamoros-Volante *et al.* (2018), se hizo la selección de la población de espermatozoides en la muestra utilizada a partir de los siguientes pasos:

1. Exclusión de imágenes con píxeles saturados, ya que las adquiridas deben estar en una profundidad de píxel de 12 bit, en una escala de grises que va entre 0 y 4095. Usando la máscara de célula entera se generó un histograma de Conteo de Saturación (Saturation Count). Generalmente el 100% de las imágenes se encuentran fuera de la saturación de píxel.
2. Exclusión de las imágenes fuera de foco a partir del Gradiente RMS (Root Mean Square), que mide la nitidez de una imagen al detectar los cambios de valor en los píxeles, permitiendo seleccionar los objetos enfocados. El valor de umbral para las imágenes seleccionadas se obtuvo empíricamente, situándose arriba de 60. De igual forma, generalmente el 100% de las imágenes se encuentran enfocadas.
3. Selección de las imágenes correspondientes a las células espermáticas individuales, valiéndose de la creación de la máscara de célula única. A partir del análisis del área, que está entre los 50 y 200  $\mu\text{m}^2$ , y un Aspect Ratio menor a 0.3. Con esto se eliminaron los agregados celulares o células redondas.
4. Una vez seleccionada la población de espermatozoides individuales, se hizo el primer paso de identificación de los segmentos, empezando por la cabeza. Sabiendo que para este segmento en específico el Aspect Ratio mayor a 0.4 y que el largo es poco menor a los 10  $\mu\text{m}$ , se realizó un histograma de Aspect Ratio vs Length para identificar la zona en la que existiesen las cabezas reales.
5. Partiendo de la zona seleccionada de cabezas reales, se procedió a delimitar el segundo segmento que fueron los flagelos. Siguiendo la misma regla del

histograma en el que se contrarrestaron Aspect Ratio vs Length del flagelo, se delimitó la zona de flagelos reales ubicados en un valor menor a 0.3 y mayor a 20  $\mu\text{m}$  respectivamente.

6. Finalmente, bajo esta región se definió el último segmento del espermatozoide, encontrando que el largo aproximado se encuentra debajo de los 8  $\mu\text{m}$  con un Aspect Ratio mayor a 0.35. Pasando por todos estos filtros, esta última región es entonces la que contiene las imágenes óptimas para la cuantificación y análisis de fluorescencia en cada segmento. Se obtuvieron, en promedio, más de 2000 células por condición experimental después de aplicar estos filtros.

Tras la segmentación y obtención de las imágenes con los espermatozoides mejor enfocados, se realizó la selección de células vivas correspondiente a aquella que no presentara señal positiva de fluorescencia para el colorante de viabilidad Sytox Blue.

### ***Identificación de subpoblaciones de espermatozoides***

Se analizaron los valores de la fluorescencia de cada uno de los colorantes utilizados, individualmente para cada célula y también el comportamiento poblacional de la muestra. La fluorescencia se registró en un inicio como histogramas en el software IDEAS (versión 6.2; Luminex), generándolos por cada segmento del espermatozoide y a las distintas condiciones de NC y CAP. De esta forma se visualizaron los cambios en  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ,  $\text{pHi}$  y  $\text{Em}$  a nivel temporal y subcelular.

Este análisis permitió la identificación de subpoblaciones en el transcurso de la capacitación. Para un análisis más profundo, los datos de fluorescencia y tiempo se exportaron en formato .txt para examinarse a partir del desarrollo de scripts utilizando paqueterías como *dplyr*, *ggplot2*, *plotly* en R (versión 4.3.1) con la interfaz de desarrollo RStudio (versión 2023.09.1+494 “Desert Sunflower”).

## **Algoritmos de agrupamiento**

La reducción de dimensionalidad de los datos se realizó en R (versión 4.3.1) con la interfaz de desarrollo RStudio (versión 2023.09.1+494 “Desert Sunflower”). Para cada uno de los algoritmos se utilizaron paqueterías especializadas:

- **PCA (Principal Component Analysis)** (Pearson, 1909; Hotelling, 1930)

Con el uso de la paquetería *stats* y *prcomp*. Se utilizó la configuración por defecto.

- **t-SNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding)** (van der Maaten and Hinton, 2008)

Se utilizó la paquetería *Rtsne* con la configuración por defecto para todos los parámetros, con énfasis en *perplexity = 30* y *max\_iter = 1000*.

- **UMAP (Uniform Manifold Aproximation and Projection)** (McInnes *et al.*, 2018).

Se realizó con la paquetería especializada *umap*, utilizando la configuración por defecto para todos los parámetros, con énfasis en *n\_neighbors = 15* y *min\_dist = 0.1*.

## **Análisis estadístico**

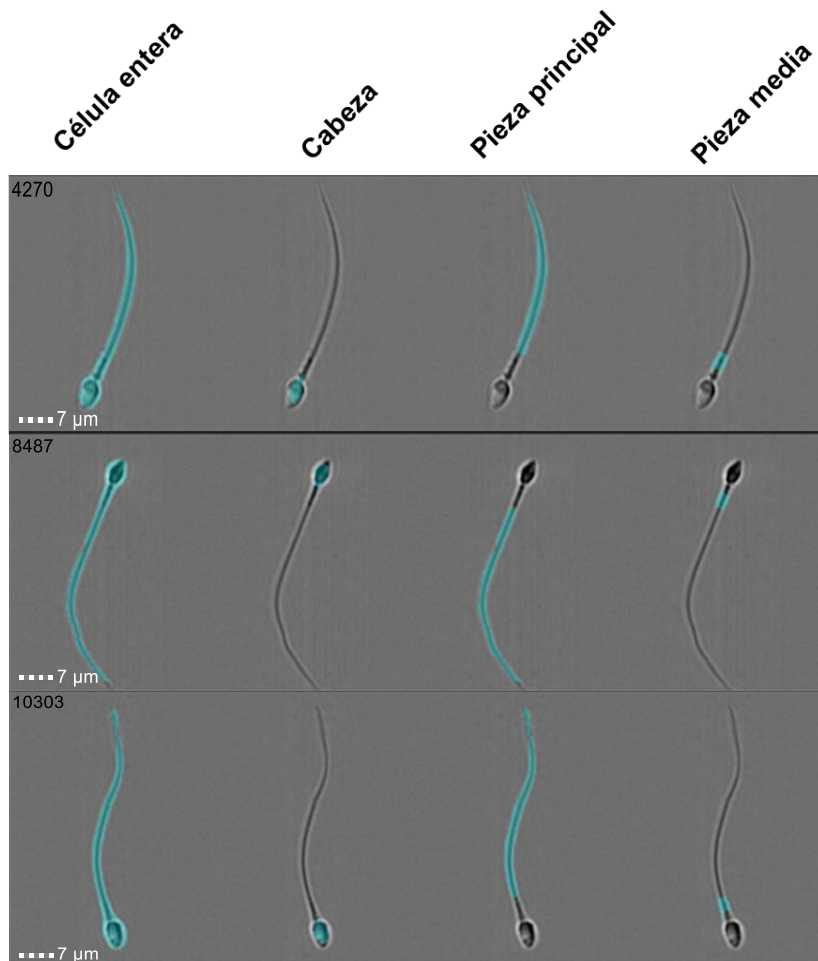
Se calculó la media +/- error estándar de la media (SEM) para todos los valores. Se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk a los datos, resultando en datos que no siguen normalidad. Se empleó como alternativa la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, considerando el tiempo NC como un factor y los tratamientos CAP como segundo factor. Se aplicó la prueba de Dunn como *post-hoc* para encontrar las diferencias significativas entre los tratamientos.

El análisis estadístico se realizó a partir del uso de las paqueterías especializadas *kuskal.test* y *dunn.test* en R (versión 4.3.1) con la interfaz de desarrollo RStudio (versión 2023.09.1+494 “Desert Sunflower”). Un valor de probabilidad ( $p$ ) < 0.05 se consideró como una diferencia estadísticamente significativa. Las versiones finales de las figuras se realizaron en Inkscape (versión 0.91; Inkscape.org)

## 6. RESULTADOS

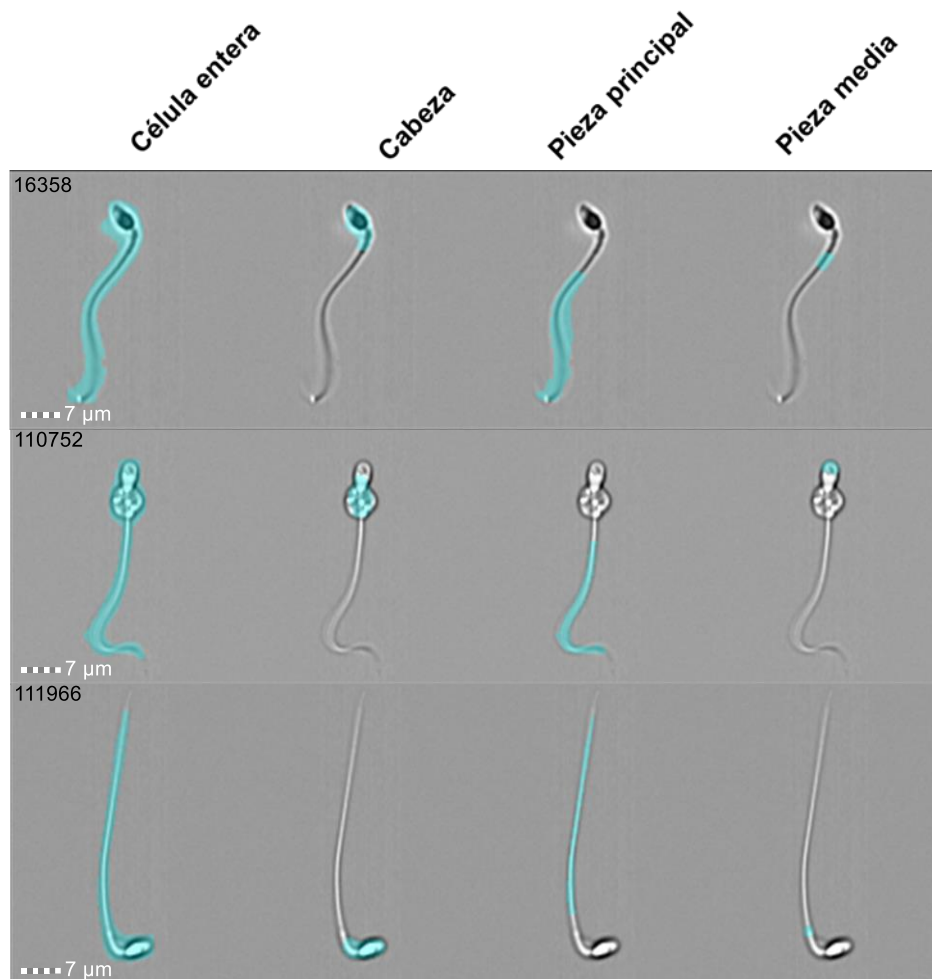
***La segmentación e identificación de los compartimentos subcelulares de los espermatozoides es posible en el AMNIS.***

Se logró crear una máscara de célula entera para las imágenes de cada espermatozoide y a partir de la metodología anteriormente descrita, fue posible derivar otras máscaras que segmentaran los compartimentos restantes de la célula: la cabeza, la pieza media y la pieza principal. Con el uso de la máscara M01, predeterminada para el canal en campo claro del AMNIS, se puede observar en la **Figura 4** cómo se realizó la segmentación para cada una de las imágenes obtenidas de los espermatozoides, independientemente de la orientación de la célula en el flujo y durante la adquisición.



**Figura 4. Segmentación de espermatozoides en sus diferentes porciones subcelulares.** Identificación de las formas subcelulares propias de los espermatozoides que componen la muestra mediante pixeles. Haciendo uso de las imágenes en canal de campo claro, se crearon máscaras correspondientes, de izquierda a derecha: de la célula entera, cabeza, flagelo y pieza media. ([ir a Discusión](#))

Respecto a las máscaras de la pieza media, se identificó un artefacto que entorpeció la identificación particular de esta región del espermatozoide (**Figura 5**), identificando porciones completamente distintas a lo largo del flagelo o de la cabeza. Algunas de las causas que se atribuyen a este problema son: 1) el ángulo que forma la cabeza del espermatozoide al realizar la adquisición de la imagen, pues en la mayoría de los casos en los que se produce este artefacto la cabeza forma un ángulo mayor a 45°; 2) el tamaño de la gota citoplasmática.



**Figura 5. Artefacto detectado en la identificación de la pieza media de los espermatozoides en las imágenes adquiridas en el AMNIS.** Imágenes adquiridas por el citómetro de flujo AMNIS

de espermatozoides en los que la pieza media no se identificó de manera adecuada. En el primer y tercer bloque de imágenes (de arriba hacia abajo) la cabeza adquiere un ángulo aproximado de 45° y la pieza media no se identifica correctamente. Para el segundo bloque de imágenes (en medio), la gota citoplasmática al ser tan grande evita que se identifique la pieza media.

En ambos casos, se vuelve complicado controlar los factores para corregir el artefacto ya que son intrínsecos del proceso de adquisición de la muestra, o del donador. Se tomó entonces la decisión de no hacer el análisis individual de este segmento y así evitar contribuciones no específicas de la señal de fluorescencia propia de esta región. La **Figura suplementaria 2** muestra un ejemplo del proceso de identificación y segmentación de la población de espermatozoides en el software IDEAS una vez creadas las máscaras, terminando finalmente en la delimitación de 2 mil células individuales vivas para el análisis.

### ***La tinción cuádruple permitió el monitoreo de los parámetros bioquímicos de espermatozoides sin el sobrelape de fluorescencia***

A partir de las dos combinaciones de colorantes propuestos en la metodología, se realizaron curvas de concentración para determinar aquellas que fuesen idóneas para el marcaje fluorescente de los espermatozoides, bajo la premisa de obtener la mejor señal de fluorescencia con menor concentración de reactivo. Para el caso de Fluo4-AM, se utilizaron las concentraciones de 2 y 4  $\mu\text{M}$ , ambas con la adición de ionomicina para obtener el máximo de fluorescencia, posibilitando la eliminación de la mayor señal que invadiera los canales adyacentes. Se encontró que para ambas concentraciones de Fluo4-AM, la intensidad de fluorescencia emitida fue similar en el canal 2, seleccionando entonces la menor concentración: 2  $\mu\text{M}$  (**Figura suplementaria 3**).

Se realizaron las curvas de concentración para pHRedo Red usando concentraciones de 1.25 y 1.5  $\mu\text{M}$ , y con adición de HCl para alcanzar el máximo de fluorescencia. Existieron diferencias de intensidad considerables entre las concentraciones. A menor concentración (1.25  $\mu\text{M}$ ) se encontró una señal adecuada, sin embargo, se sobrepuso en la emisión de Fluo4-AM 2  $\mu\text{M}$ , por lo que se decidió usar la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$ , ya que no presentó invasión de fluorescencia hacia el canal del colorante de  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  (**Figura suplementaria 3**).

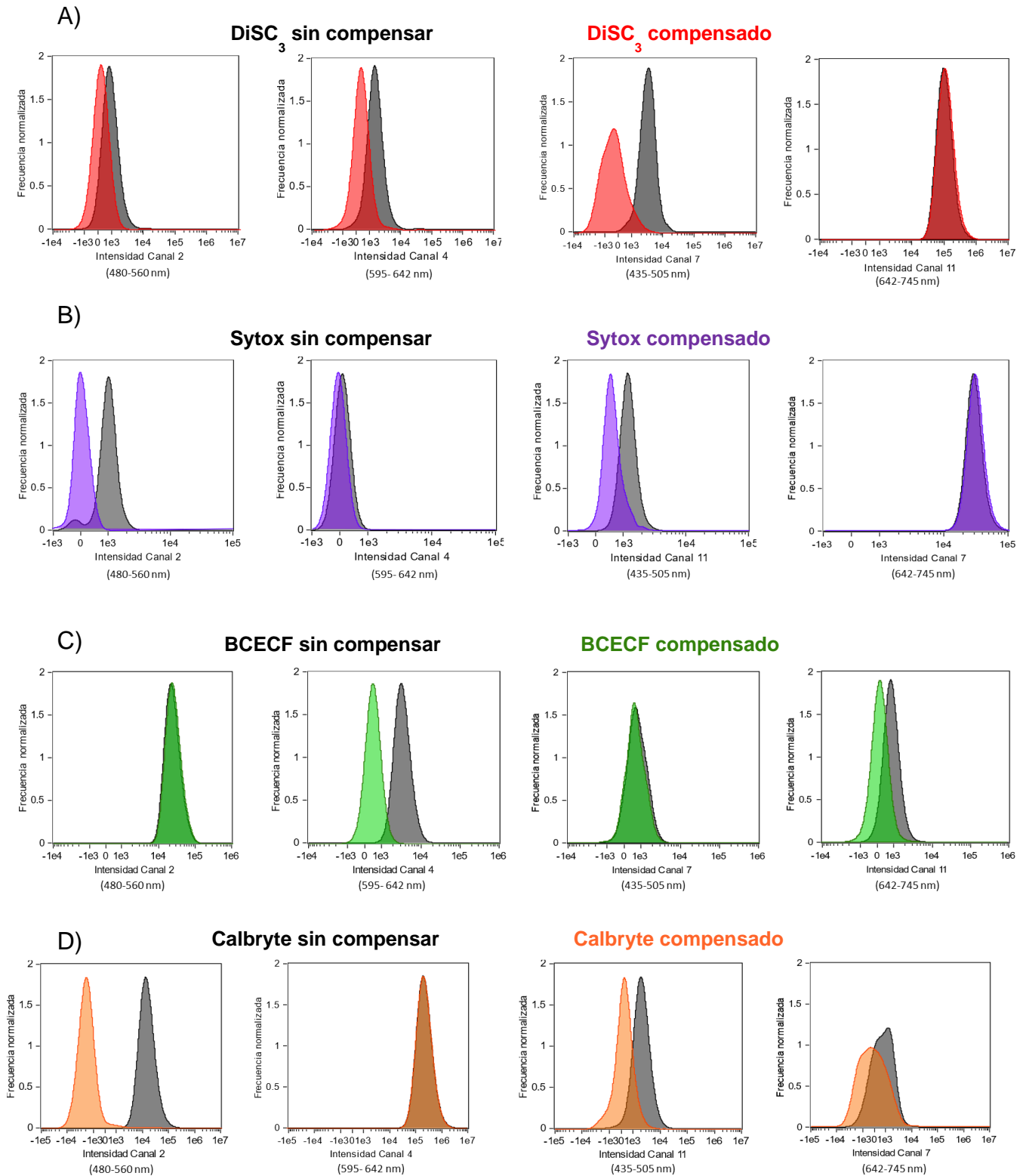
Referente a la combinación de colorantes 2 (**Tabla 1**), se realizó únicamente la curva de concentración para el colorante Calbryte-590. Utilizando concentraciones de 1 y 2  $\mu\text{M}$ , con adición de ionomicina, los histogramas de intensidad resultantes (**Figura suplementaria 3**) permitieron distinguir que la concentración de 1  $\mu\text{M}$  presentó una señal de fluorescencia de mayor intensidad que con 2  $\mu\text{M}$ . Contrario a lo que se esperaría respecto a que una mayor concentración de colorante produce mayor fluorescencia, se cuantificó la viabilidad celular de las células usando Sytox Blue, encontrando que a 2  $\mu\text{M}$  había mayor cantidad de células muertas, es decir, que había un efecto citotóxico asociado a la concentración del colorante.

En relación con la concentración de DiSC<sub>3</sub> y Sytox Blue, tanto para la combinación de colorantes 1 y 2 se decidió usar la concentración final de 100 nM y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente, siguiendo la recomendación técnica de antecedentes experimentales en el laboratorio para esta tinción cuádruple en espermatozoide. En el caso de la sonda fluorescente BCECF-AM para el análisis del pHi, se tomó la decisión de usar la concentración de 300 nM publicada por Matamoros-Volante & Treviño (2020) en experimentos de pHi realizados en AMNIS.

Una vez seleccionadas las concentraciones de los colorantes, se procedió a realizar la matriz de compensación para eliminar la fluorescencia invasiva de cada colorante hacia los canales de emisión que no fueran el propio. El proceso de compensación se define en el manual del software IDEAS como “el proceso de remoción de intensidad de fluorescencia, específicamente de aquella que es derivada de la diafonía originada por tintes enfocados en otros canales”.

Para realizar la compensación, se realizó la tinción individual de cada colorante en alícuotas de  $5 \times 10^6$  células/mL y se adquirieron 10 mil eventos, activando únicamente el láser correspondiente a la excitación del fluoróforo utilizado. Para fines prácticos, se muestran los resultados únicamente de la compensación para la combinación de colorantes con BCECF-AM, Calbryte-590, Sytox Blue y DiSC<sub>3</sub> (**Figura 6**) después de la aplicación de la matriz de compensación.

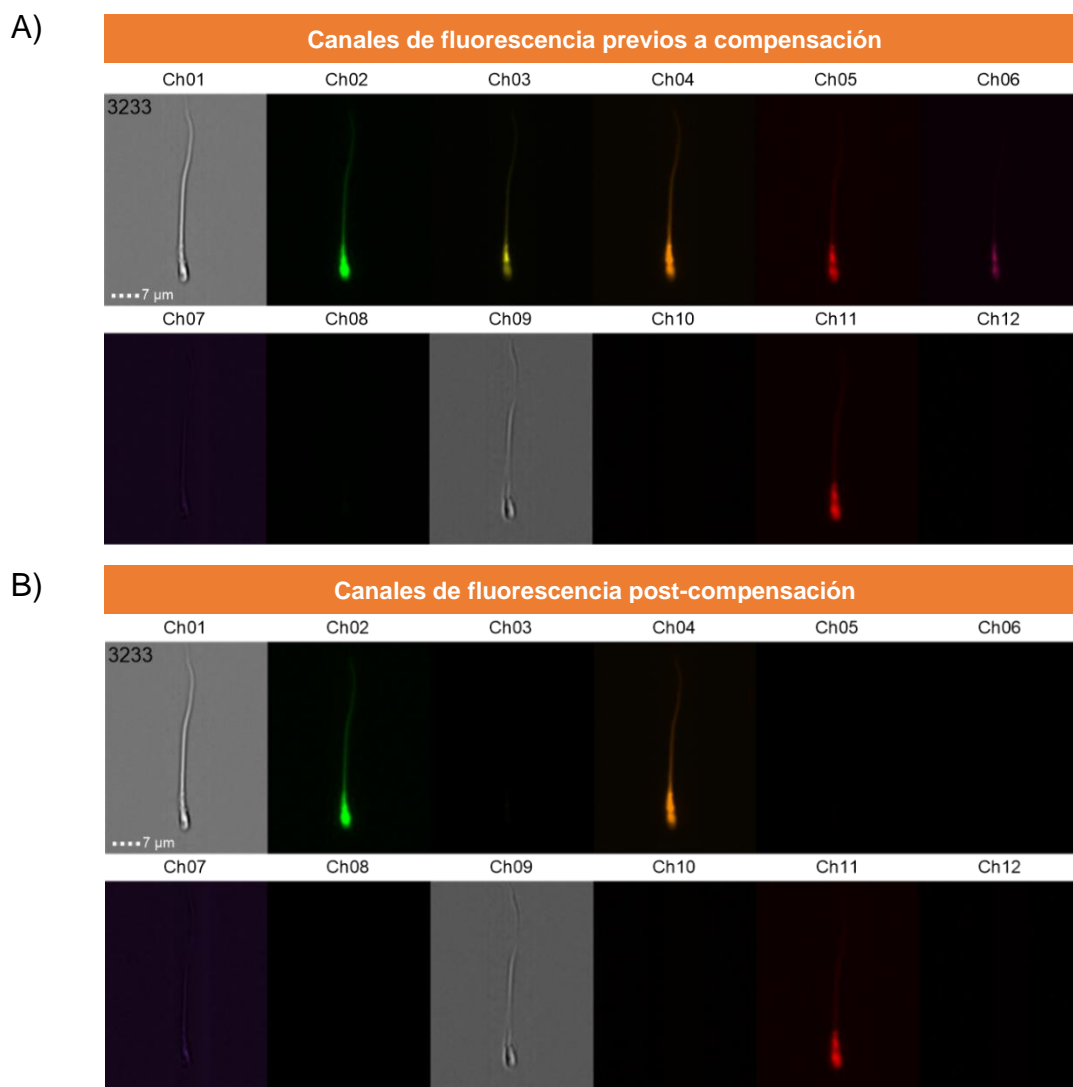




**Figura 6. Compensación de la fluorescencia de los colorantes usados en la tinción cuádruple.** Histogramas de intensidad de fluorescencia de los colorantes correspondientes a las combinaciones de colorantes utilizadas una vez aplicada la matriz de compensación: A) DiSC<sub>3</sub> 100

nM, B) Sytox Blue 1  $\mu\text{M}$ , C) BCECF-AM 300 nM y D) Calbryte-59. Para el canal de emisión propio del colorante, la señal de fluorescencia emitida no cambia (histograma oscuro). \*Nota: la intensidad de fluorescencia está medida en UAF (Unidades Arbitrarias de Fluorescencia). ([ir a Discusión](#))

En la **Figura 7** se presentan las imágenes de los espermatozoides después del proceso de compensación de los colorantes, permitiendo una visualización precisa de la señal fluorescente asociada a cada uno de ellos. La señal se vuelve única para los colorantes utilizados para medir los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ,  $\text{pH}_i$ , Em y viabilidad celular, tras la eliminación de la interferencia de la fluorescencia no deseada en los canales no relacionados.



**Figura 7. Comparación de las imágenes del espermatozoide teñido con la combinación de colorantes 2 en los canales de emisión de fluorescencia del AMNIS.** Imágenes adquiridas en el citómetro de flujo AMNIS antes y después de la aplicación de la compensación de los colorantes

BCECF-AM 300 nM (**Ch02**), Calbryte-590 1  $\mu$ M (**Ch04**), DiSC<sub>3</sub> 100 nM (**Ch11**) y Sytox Blue 1  $\mu$ M (**Ch07**). A) Antes de la compensación es posible visualizar la cantidad de señal que atraviesa los diferentes canales de emisión, yendo desde el canal 2 hasta el 7, para después abarcar del 8 al 12. B) Una vez aplicada la matriz de compensación, se elimina por completo toda señal fluorescente no específica, guardándose en cada canal correspondiente a la sonda fluorescente utilizada.

Un paso necesario dentro del proceso de citometría de flujo fue la selección de la población viva que sea capaz de responder a los estímulos para el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$ , pH<sub>i</sub> y Em. Esto se realizó a partir del uso del colorante de viabilidad celular Sytox Blue, que solo emite señal al estar dentro de las células con membranas comprometidas, es decir, muertas. Además de diferenciar la población muerta, se observó que independientemente de la naturaleza de los colorantes, en el caso de los de  $[Ca^{2+}]_i$  y de pH<sub>i</sub> que son intracelulares, así como el de Em que se particiona en la membrana plasmática, su respuesta se relaciona con la viabilidad celular pues la intensidad de cada uno disminuye considerablemente o desaparece si están muertas (**Figura suplementaria 2**)

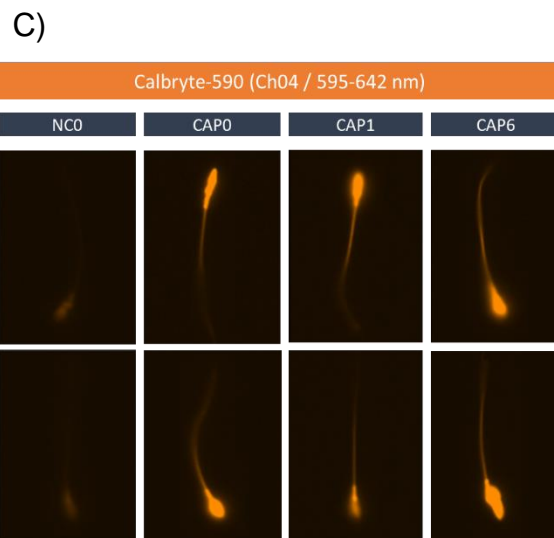
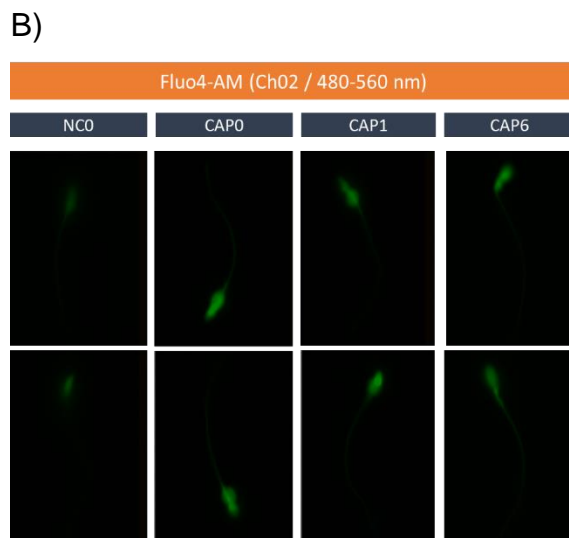
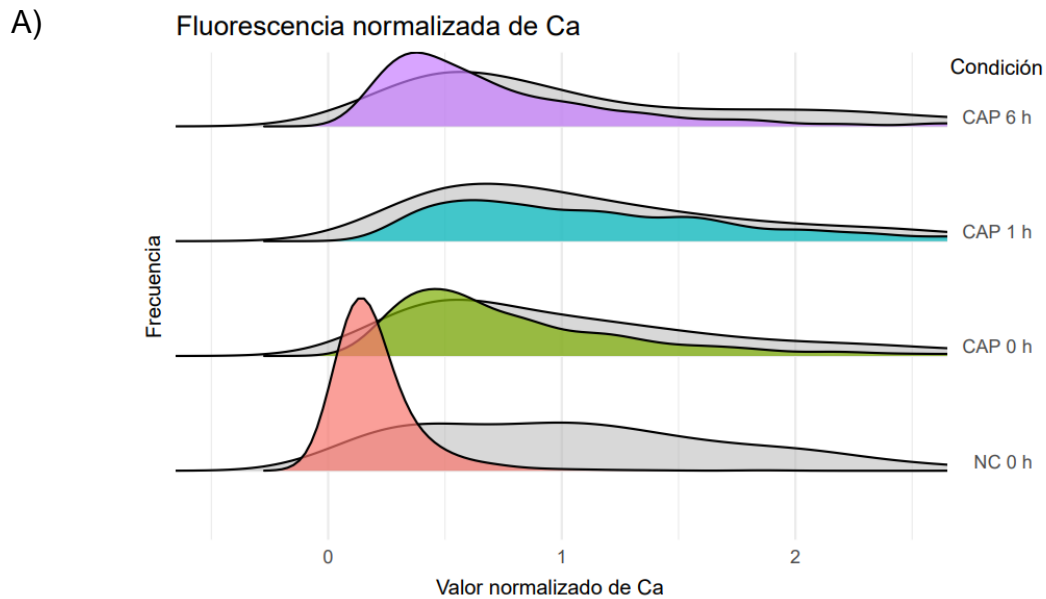
Delimitadas las concentraciones resultantes de las curvas de concentración para los colorantes (**Tabla 2**), se llevó a cabo el análisis de los espermatozoides bajo las condiciones no capacitantes (NC) y capacitantes (CAP0, CAP1 y CAP3) con la finalidad de comparar el comportamiento de estas sondas fluorescentes, seleccionar las adecuadas y verificar la dinámica existente entre el  $[Ca^{2+}]_i$ , pH<sub>i</sub> y Em en las porciones subcelulares (célula entera, cabeza y pieza principal).

**Tabla 2.** Concentración final de los colorantes para la tinción de espermatozoides humanos.

Parámetro	Fluorocromo	Concentración final
<b>Combinación de colorantes 1</b>		
$[Ca^{2+}]_i$	Fluo4-AM	2 $\mu$ M
pHi	pHRodo Red Red	1.5 $\mu$ M
Em	DiSC <sub>3</sub>	100 nM
Viabilidad celular	Sytox Blue	1 $\mu$ M
<b>Combinación de colorantes 2</b>		
$[Ca^{2+}]_i$	Calbryte-590	1 $\mu$ M
pHi	BCECF-AM	300 nM
Em	DiSC <sub>3</sub>	100 nm
Viabilidad celular	Sytox Blue	1 $\mu$ M

([ir a Discusión](#))

Se realizaron registros de fluorescencia de cada uno de los colorantes para  $[Ca^{2+}]_i$ , pHi y Em, con y sin la adición del estímulo que produjera el máximo de fluorescencia, siendo estos el control comparativo del comportamiento individual y poblacional de los espermatozoides a lo largo de los tiempos de capacitación y en respuesta al estímulo. Primero se hizo el análisis del  $[Ca^{2+}]_i$  con el uso de Fluo4-AM y Calbryte-590, haciendo adiciones de ionomicina para la inducción del máximo de fluorescencia bajo las condiciones NC y CAP. En la **Figura 8A** se presentan los histogramas con los valores normalizados para Calbryte-590, viendo un aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  en el espermatozoide a partir del tiempo CAP0, manteniendo una mayor fluorescencia en comparación con las condiciones NC y permaneciendo así hasta CAP6.



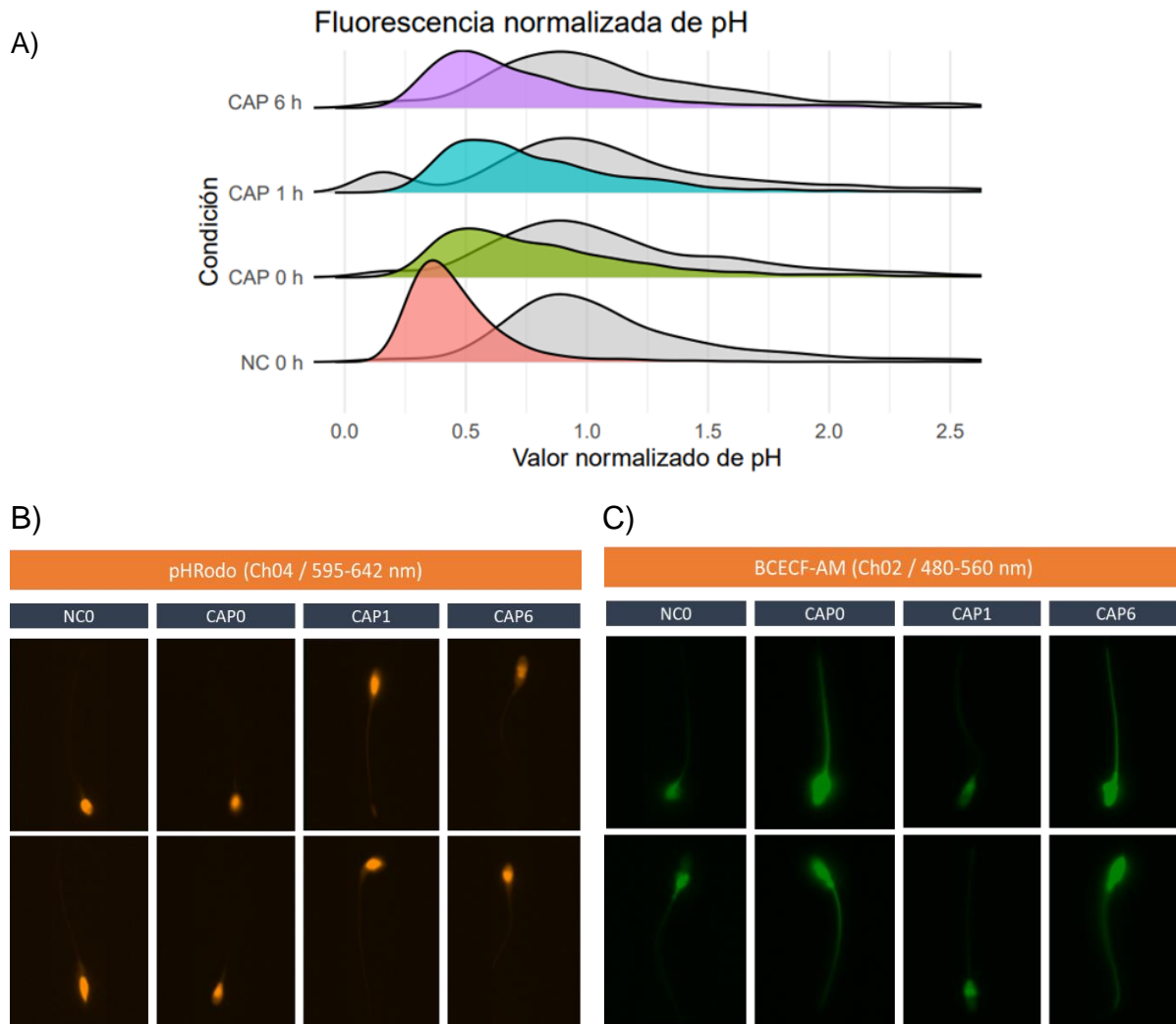
**Figura 8. Comportamiento de los colorantes de  $[Ca^{+2}]_i$  en la población de espermatozoides en condiciones NC y CAP.** A) Comparación de la frecuencia y dispersión en los histogramas normalizados al máximo de fluorescencia ( $F_{\text{basal}} / F_{\text{ionomicina}}$ ) para Calbryte-590. Los datos corresponden a la muestra de un solo donador.  $n = 2000$  células. Histograma en gris corresponde a la adición de ionomicina. B) Imágenes adquiridas en el citómetro de flujo AMNIS de los espermatozoides marcados con Fluo4-AM y C) Calbryte-590 para el análisis de  $[Ca^{+2}]_i$ . Comparación del comportamiento entre las condiciones NC y CAP.

Particularmente en el caso de Fluo4-AM, en las condiciones CAP utilizadas se observó que la ionomicina no produjo un máximo de fluorescencia en comparación con el tratamiento sin la adición (**Figura suplementaria 4**). En un principio la se propuso la ausencia de respuesta a ionomicina como consecuencia de la acción secuestrante de la BSA, evitando la entrada de  $[Ca^{+2}]$  hacia el citoplasma del espermatozoide. Sin embargo, se esperaba un efecto similar para el caso del Calbryte-590, pues ambos colorantes están presentes en condiciones CAP con BSA, y Calbryte-590 no presentó el mismo comportamiento. La **Figura 8B** presenta las imágenes obtenidas de los canales de fluorescencia para ambos colorantes, con las que es posible monitorear los cambios de  $[Ca^{+2}]_i$  basados en la intensidad de fluorescencia.

Continuando con el análisis del pH<sub>i</sub>, se hizo la comparación entre la tinción con pHRodo Red y BCECF-AM. Para la normalización de la fluorescencia se usó monensina para inducir el máximo de fluorescencia en BCECF-AM; y en el pHRodo Red por el contrario, produciría un mínimo de fluorescencia. Se encontró un comportamiento similar entre los colorantes usados para pH<sub>i</sub> (**Figura 9A**). Sin embargo, los resultados particulares de pHRodo no concuerdan con las respuestas biológicas esperadas. En ambos colorantes se observó el incremento de fluorescencia a partir de CAP0 en comparación con la condición NC, con un descenso en CAP1 y nuevamente elevándose en CAP6.

El comportamiento en pHRodo Red sugiere que para CAP0 y CAP6 se está presentado una acidificación (**Figura suplementaria 4**), contrario a la disminución de la fluorescencia que se esperaba en los tiempos CAP. Como se observa en las imágenes individuales de la **Figura 9B y C**, BCECF-AM por el contrario aumenta

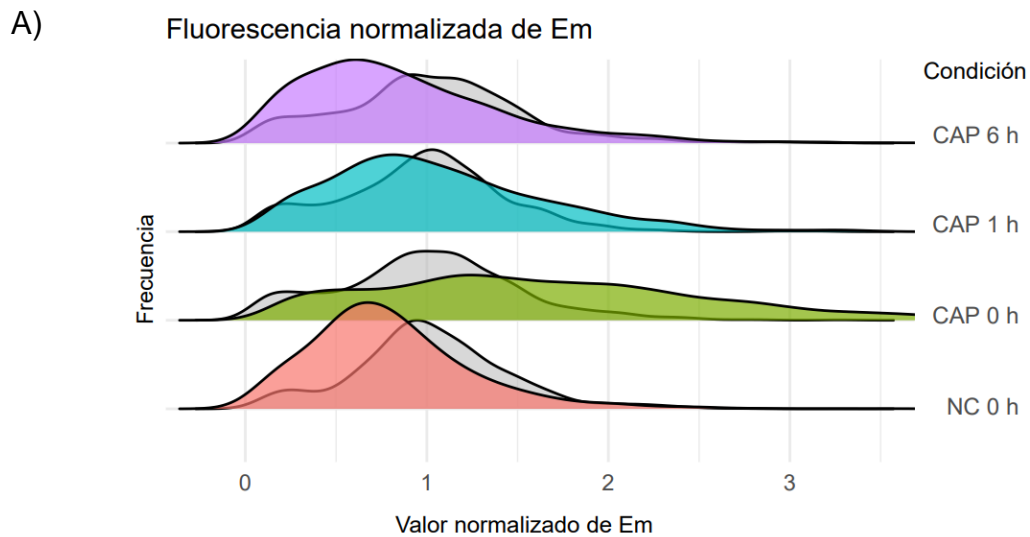
su fluorescencia conforme la alcalinización sigue existiendo a lo largo de la capacitación.



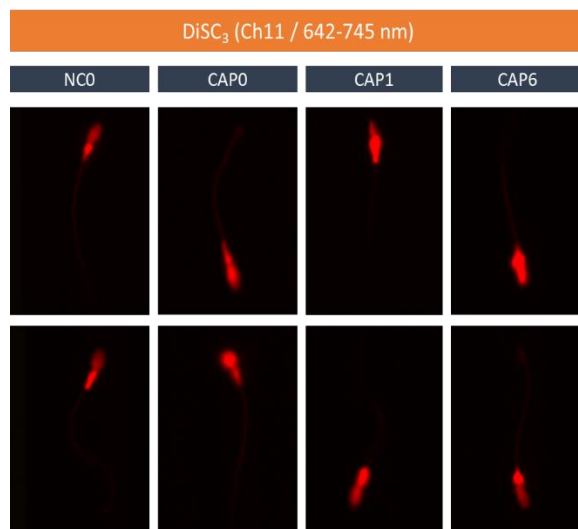
**Figura 9. Comportamiento de los colorantes de *pHi* en la población de espermatozoides en condiciones NC y CAP.** A) Comparación de la frecuencia y dispersión en los histogramas normalizados al máximo de fluorescencia ( $F_{\text{basal}} / F_{\text{monensina}}$ ) para BCECF-AM. Los datos corresponden a la muestra de un solo donador.  $n = 2000$  células. Histograma en gris corresponde a la adición de monensina. B) Imágenes adquiridas en el citómetro de flujo AMNIS de los espermatozoides marcados con pHRodo Red y C) BCECF-AM para el análisis de *pHi*. Comparación del comportamiento entre las condiciones NC y CAP.

Para el análisis del Em se utilizó DiSC<sub>3</sub> en ambas combinaciones de colorantes, con la normalización de la fluorescencia bajo el uso de valinomicina, permitiendo llegar al máximo de fluorescencia en cada una de las condiciones experimentales. Se encontró prácticamente el mismo comportamiento para el Em a lo largo de las condiciones NC y CAP: un incremento característico del tiempo NC al CAP0, un leve descenso en el CAP1 y nuevamente un ascenso hacia el CAP6 (**Figura 10**).

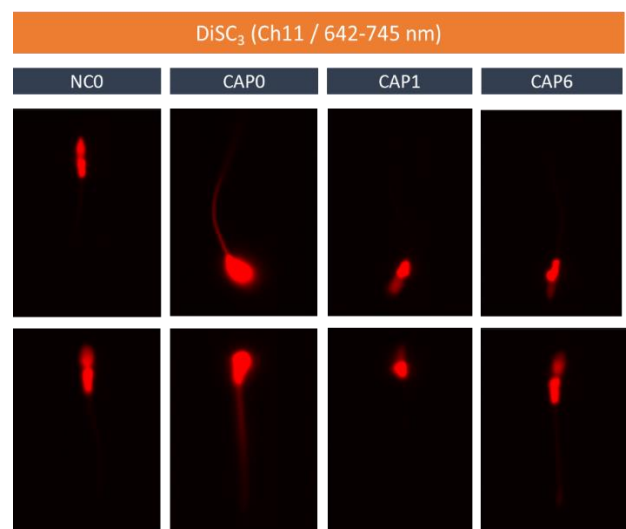
Sin embargo, un análisis más detallado de los datos arrojó un comportamiento no esperado de la Valinomicina: valores normalizados dentro de los histogramas (**Figura 10A**) fueron superiores a 1. El resultado del cociente al usar la fórmula de normalización va de 0 a 1, por lo que valores fuera de este rango indican que la valinomicina no esté ejerciendo acción en la célula o bien, que su adición está fomentando una disminución de la fluorescencia, es decir, una despolarización de la membrana.



B)



C)



**Figura 10. Comportamiento de los colorantes de Em en la población de espermatozoides en condiciones NC y CAP.** A) Comparación de la frecuencia y dispersión en los histogramas normalizados al máximo de fluorescencia ( $F_{\text{basal}} / F_{\text{valinomicina}}$ ) para DiSC<sub>3</sub>. Los datos corresponden a la muestra de un solo donador. n = 2000 células. Histograma en gris corresponde a la adición de

valinomicina. B) Imágenes adquiridas en el citómetro de flujo AMNIS de los espermatozoides marcados con DiSC<sub>3</sub> para el análisis de Em, comparadas entre la combinación de colorantes 1 y C) combinación de colorantes 2, en condiciones NC y CAP.

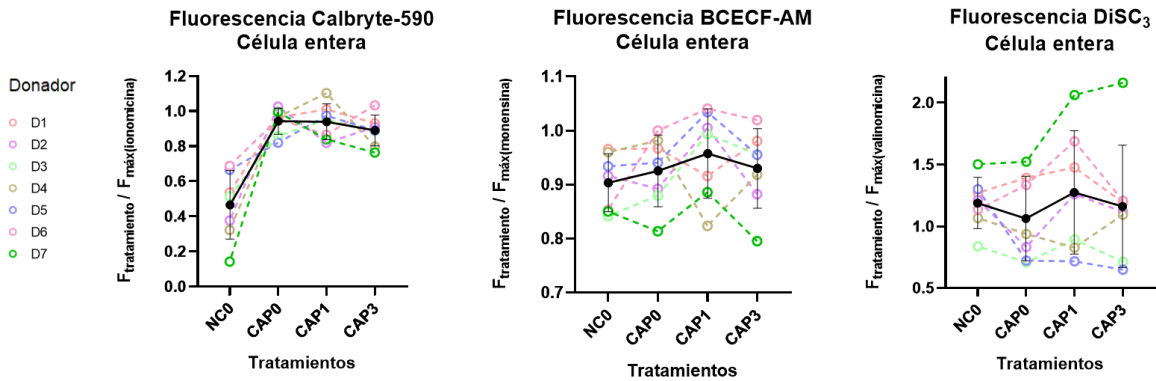
Una vez analizados los resultados anteriores respecto al comportamiento de los parámetros bioquímicos en cada una de las combinaciones de colorantes, se decidió utilizar la combinación de colorantes compuesta por Calbryte-590 1  $\mu$ M + BCECF-AM 300 nM + DiSC<sub>3</sub> 100 nM + Sytox Blue 1  $\mu$ M.

### ***La centrifugación tiene un efecto despolarizante en la membrana plasmática del espermatozoide***

Previo al aumento de repeticiones experimentales, se realizaron cambios en la duración de la cinética en condiciones CAP, acortando de 6 a 3 horas bajo lo reportado por nuestro grupo de investigación por parte de Pérez-Ocampo *et al.* (2022) en donde encontró que al tiempo CAP3 los cambios se mantienen como una meseta del potencial hiperpolarizado hasta el CAP6. Para el caso del  $[Ca^{+2}]_i$  y del pHi, los trabajos de Brukman *et al.*, (2019) y Matamoros-Volante & Trevino (2020) también indican que a partir del tiempo CAP0 y hasta el CAP6 no observan cambios significativos respecto a la alcalinización o incremento de  $[Ca^{+2}]_i$ .

La **Figura 11** muestra los primeros resultados de las cinéticas realizadas bajo la metodología descrita inicialmente. Se encontró un aumento de  $[Ca^{+2}]_i$  y pHi, sin embargo, en la tinción con DiSC<sub>3</sub> se encontraron valores normalizados de algunos donadores cercanos o por encima de 1 en el tiempo NC0, para después disminuir a lo largo de los tiempos CAP y acercarse a 0. Este comportamiento biológicamente se traduce como una despolarización de la membrana en los tiempos CAP, es decir, que el potencial de membrana desde NC ya se encontraba a niveles hiperpolarizantes y que en los tiempos CAP, contrario a encontrar el máximo de hiperpolarización, produjeron la despolarización de la membrana por la valinomicina.

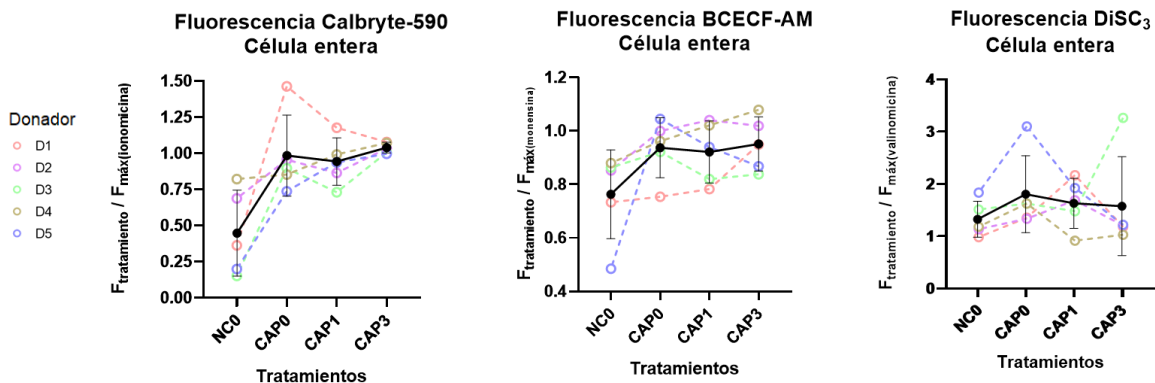




**Figura 11. Comportamiento de la fluorescencia de los colorantes de  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$  y  $E_m$  bajo las condiciones NC y CAP's.** Valores de intensidad de fluorescencia normalizados bajo la premisa del máximo: ( $F_{\text{tratamiento}} / F_{\text{máximo}}$ ). Los resultados están expresados en la media  $\pm$  SEM ( $n=7$ ). ([ir a Discusión](#))

En principio se consideró que la causa de este fenómeno estaba asociada al potencial de membrana mitocondrial del espermatozoide, que se sabe es altamente negativo. Otra de las consideraciones tomadas fue respecto a los experimentos de Pérez-Ocampo *et al.* (2022) sobre el potencial de membrana en espermatozoide humano, bajo el efecto de la centrifugación, el potencial de membrana se vuelve más positivo, pasando de valores de -80 mV a -70 y -60 mV, aproximadamente.

Tomando en cuenta estos reportes previos, se decidió hacer repeticiones de la cinética eliminando el proceso de centrifugación previo a la adquisición de la muestra en el citómetro. Como alternativa, las células de la muestra se dejaron sedimentar por gravedad en vez de centrifugarse. En la **Figura 12** se observa la fluorescencia normalizada con sus respectivas adiciones: monensina para BCECF-AM, ionomicina para Calbryte-590 y valinomicina para DiSC<sub>3</sub>. Nuevamente se presentó un aumento de  $[Ca^{+2}]_i$  y  $pH_i$ , así como una hiperpolarización del  $E_m$ . Sin embargo, los valores normalizados para el potencial de membrana se mantuvieron cercanos o mayores a 1 tanto para NC y CAP.



**Figura 12. Fluorescencia normalizada de las condiciones NC y CAP de la cinética sin centrifugación.** Valores de fluorescencia obtenidos para cada colorante utilizado en la máscara de célula entera y su correspondiente normalización con el máximo de fluorescencia para cada uno de ellos (B) (n = 5, Donador D1 a D5). Los resultados están expresados en la media  $\pm$  SEM.

El análisis de las imágenes indicó que para la tinción con DiSC<sub>3</sub> existía una acumulación en la pieza media, mientras que había baja distribución del colorante a las otras porciones. DiSC<sub>3</sub> es una carbocianina catiónica que en presencia de cargas negativas se une y particiona en la membrana plasmática, acumulándose en ella en función de su estado de polarización. Se decidió usar CCCP (carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona), que es un inhibidor de la fosforilación oxidativa y que actúa como desacoplante del potencial de membrana mitocondrial.

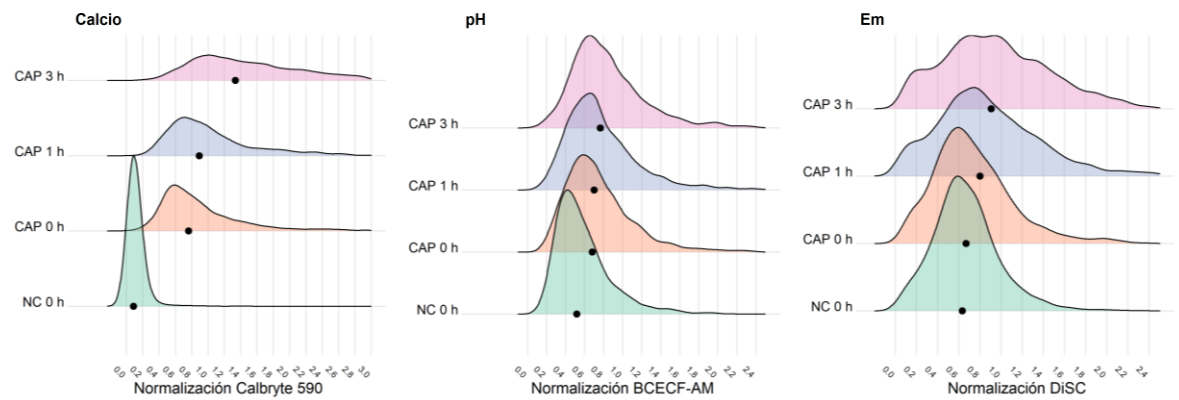
Se realizaron adquisiciones con espermatozoides teñidos solo con DiSC<sub>3</sub> y con ausencia y presencia de CCCP, de manera que se pudiese determinar la contribución del potencial mitocondrial (**Figura suplementaria 5**). Al analizar el comportamiento de la fluorescencia cruda y de la fluorescencia normalizada, se encontró que los valores de fluorescencia disminuyeron por acción del CCCP, sin embargo, los valores normalizados permanecieron por encima de 1. La actividad de la valinomicina no se reflejó en esos experimentos, independientemente de la presencia del CCCP, por lo que el problema parece no estar asociado solamente al potencial mitocondrial. Es preciso indicar que el CCCP si produjo un cambio en la acumulación del colorante en la pieza principal.

Ante esto, otra alternativa que se llevó a cabo fue la aplicación de temperatura (37°C) y agitación (100 rpm) durante la tinción con DiSC<sub>3</sub> así como durante la aplicación de la valinomicina, con la finalidad de facilitar la distribución del

colorante y del ionóforo en todo el medio y a todas las células. La concentración utilizada de valinomicina (1  $\mu\text{M}$ ) se mantuvo ya que es la que se ha reportado como efectiva para los experimentos en espermatozoide de humano. Resultó satisfactoria la aplicación de los cambios de temperatura y agitación para el análisis del potencial de membrana, pues DiSC<sub>3</sub> dejó de agregarse en la pieza media del espermatozoide y los valores normalizados dejaron de ser atípicos.

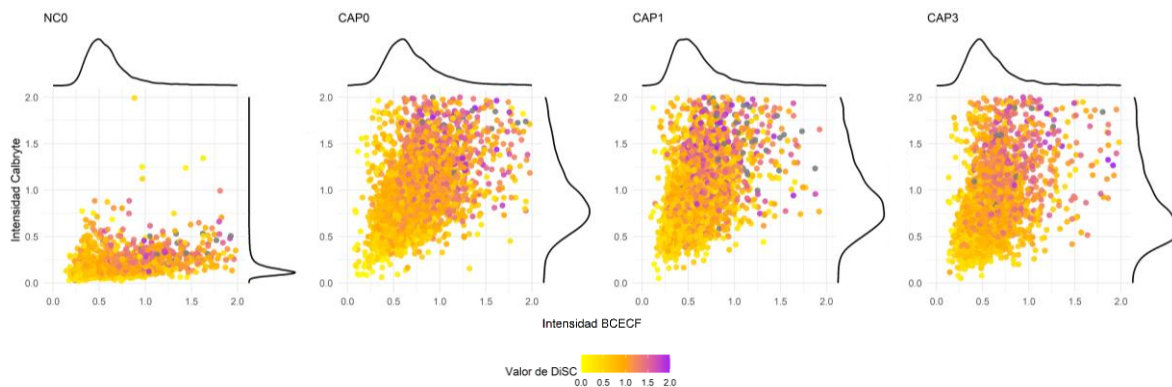
***El inicio de la capacitación desencadena los cambios más importantes en  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ,  $\text{pH}_i$  y  $E_m$  en el espermatozoide, coincidiendo en algunos de sus segmentos***

Tras la modificación de la metodología, se procedió a realizar las repeticiones necesarias para analizar de manera más robusta el comportamiento de  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ,  $\text{pH}_i$  y  $E_m$  en condiciones NC y CAP. Los resultados del experimento representativo de la **Figura 13** concuerda con lo reportado por el grupo de laboratorio y numerosos estudios más respecto al aumento de  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ,  $\text{pH}_i$  y  $E_m$  en función de la presencia de condiciones CAP vs NC. Resulta interesante ver que conforme transcurre el tiempo CAP suceden cambios particulares en los histogramas: ensanchamiento y aparición de picos alternativos, que son los que consideran posibles subpoblaciones.



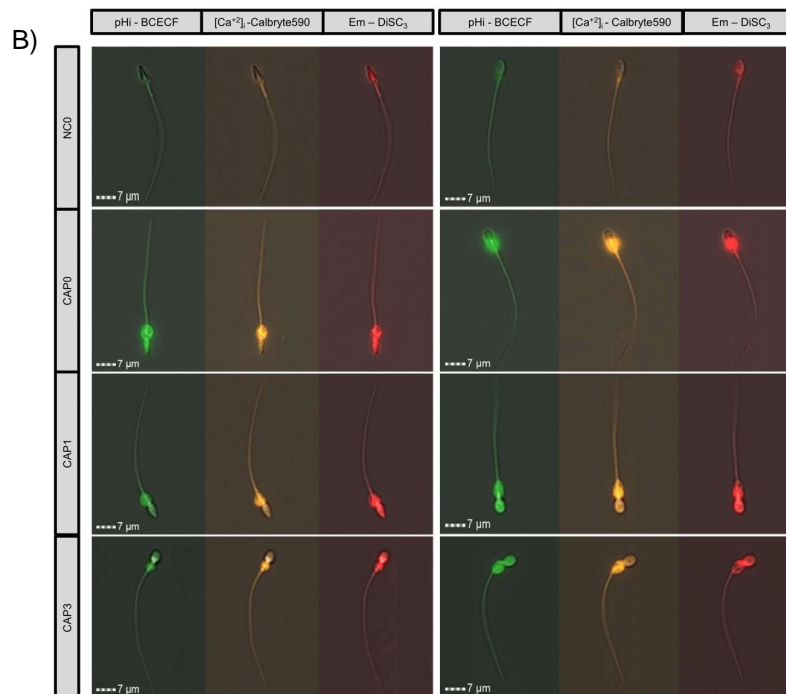
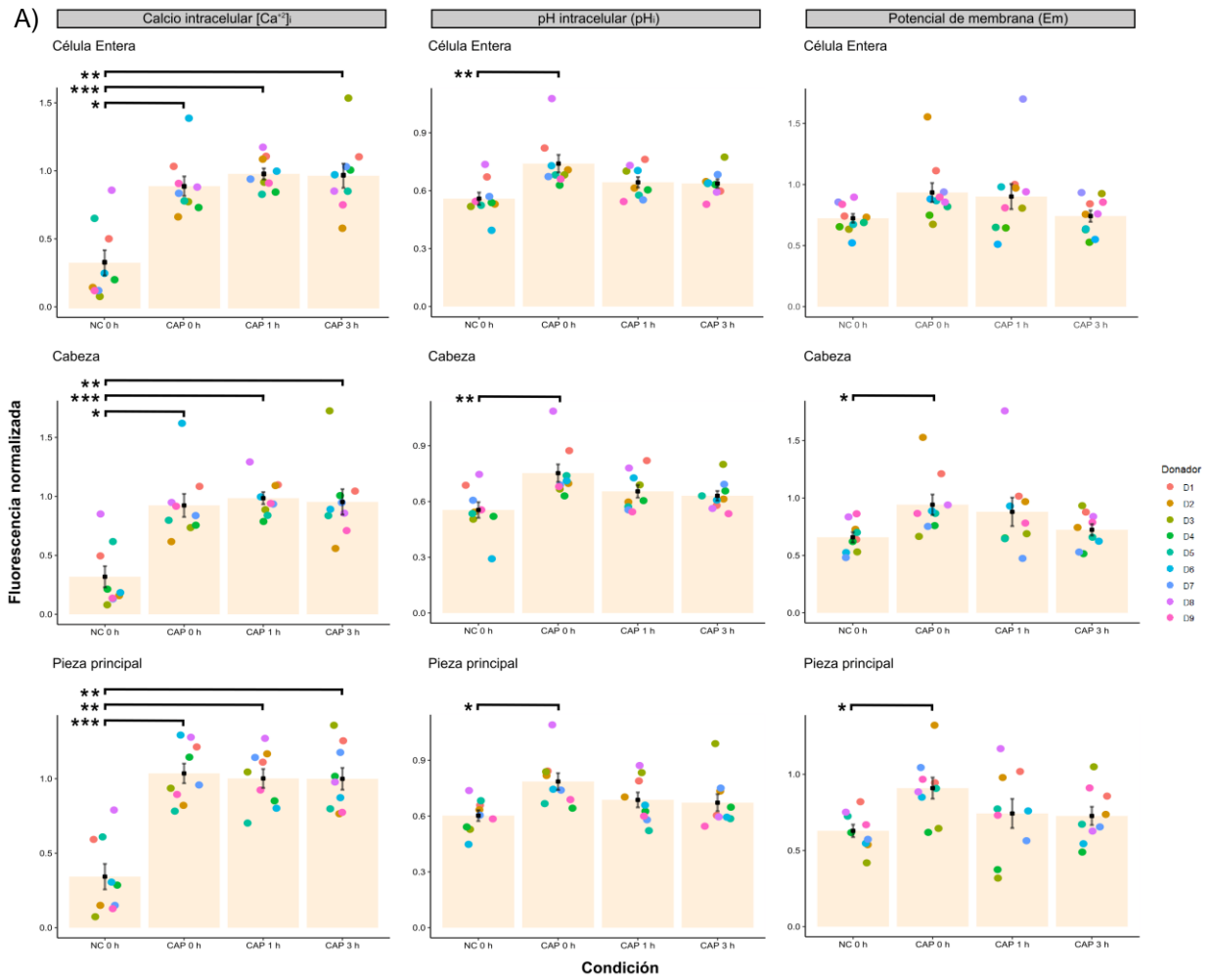
**Figura 13. Comportamiento de la población de espermatozoides respecto al cambio en los parámetros  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ,  $\text{pH}_i$  y  $E_m$  a distintas condiciones NC y CAP. Histogramas representativos de un experimento en el que la población de espermatozoides viva y normalizada ( $F_{\text{basal}}/F_{\text{máximo}}$ ) es comparada con las condiciones NC y CAP. La mediana de cada condición normalizada está marcada con un punto.**

En principio, se diseñaron estrategias permitieran conjuntar los tres parámetros de manera simultánea en un solo gráfico, tal como se presenta en la **Figura 14** que gráfico de puntos representativo de un donador: cada punto corresponde a una de las células de la población de espermatozoides bajo las condiciones NC y CAP. De esta forma es posible visualizar los cambios para  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$  y  $Em$ , detallando que, si analizamos cada punto, se observa no todos experimentan los cambios de los tres parámetros analizados al mismo tiempo, existen algunos que solo presentan cambios en sólo uno o dos, sea  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$  o  $Em$ .



**Figura 14. Distribución de la población de espermatozoides respecto al cambio en los parámetros  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$  y  $Em$  a distintas condiciones NC y CAP.** Diagrama de puntos de un experimento representativo, en el que la población de espermatozoides viva y normalizada ( $F_{\text{basal}}/F_{\text{máximo}}$ ) es comparada entre las condiciones NC y CAP. En el eje X se grafican valores de intensidad normalizada para  $pH_i$  y en el eje Y el valor de intensidad normalizado del  $[Ca^{+2}]_i$ , junto con una escala de color correspondiente al valor de intensidad normalizado para  $Em$ . Cada punto representa un evento, es decir, una célula. Cada gráfico cuenta con un histograma para visualizar la dispersión de la población con relación a la condición NC y CAP.  $n = 2000$  células. ([ir a la Discusión](#))

Tras llevar a cabo el análisis de 9 donadores, los cambios de cada uno de los parámetros  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$  y  $Em$  para las condiciones NC y CAP se engloban en la **Figura 15**, haciendo distinción de los diferentes segmentos del espermatozoide. Nuevamente los resultados coinciden con aquellos reportados por nuestro laboratorio y otros grupos de investigación respecto al aumento de cada uno de los parámetros apenas iniciada la capacitación, y como la señal propia de cada parámetro se mantiene a lo largo de la capacitación hasta el tiempo final delimitado. Salvo el tiempo CAP3 en el potencial de membrana, que a comparación de lo encontrado por Pérez-Ocampo *et al.* (2022) que no alcanza los valores respecto al máximo de hiperpolarización a las tres horas de capacitación.



**Figura 15. Valores normalizados del cambio en los parámetros  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$  y  $Em$  a distintas condiciones NC y CAP, en los segmentos celulares del espermatozoide.** A) Gráficos de barras y puntos de todos los donadores procesados, para las condiciones NC y CAP's en los ejes X. Por columna se grafican los parámetros  $pH_i$ ,  $[Ca^{+2}]_i$  y  $Em$ . En el eje Y se grafican los valores de intensidad de fluorescencia que siguen la normalización ( $F_{tratamiento} / F_{tratamiento + máximo}$ ). Los resultados están expresados en la media  $\pm$  SEM. Los datos se compararon por medio de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis considerando el tiempo de capacitación como factor. Se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn como análisis post hoc. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , contra la condición NC ( $n = 9$ , Donador D1 a D9). B) Imágenes obtenidas en el AMNIS de células de espermatozoides para cada una de las sondas de BCECF, Calbryte-590 y DiSC<sub>3</sub>, para  $pH_i$ ,  $[Ca^{+2}]_i$  y  $Em$  respectivamente, para las condiciones NC y CAP. ([ir a Discusión](#))

De entre todos los donadores analizados en este trabajo, se presenta el cambio e incremento general del  $[Ca^{+2}]_i$  de condiciones NC a CAP en célula entera (CAP0:  $p = 0.0403$ ; CAP1:  $p = 0.0007$  y CAP3:  $p = 0.003$ ), para la porción de la cabeza (CAP0:  $p = 0.0206$ ; CAP1:  $p = 0.0007$  y CAP3:  $p = 0.008$ ) y para la pieza principal (CAP0:  $p = 0.0009$ ; CAP1:  $p = 0.003$  y CAP3:  $p = 0.003$ ). En el caso del  $pH_i$ , los cambios significativos referentes a una alcalinización se dieron entre las condiciones NC y CAP0 únicamente, para los tres segmentos analizados (Célula entera:  $p = 0.004$ ; Cabeza:  $p = 0.006$ ; Pieza principal:  $p = 0.015$ ). Y finalmente, para el caso del  $Em$ , únicamente se encontraron diferencias significativas para el cambio hacia células hiperpolarizadas entre las condiciones NC y CAP0 para la cabeza ( $p = 0.033$ ) y la pieza principal ( $p = 0.043$ ).

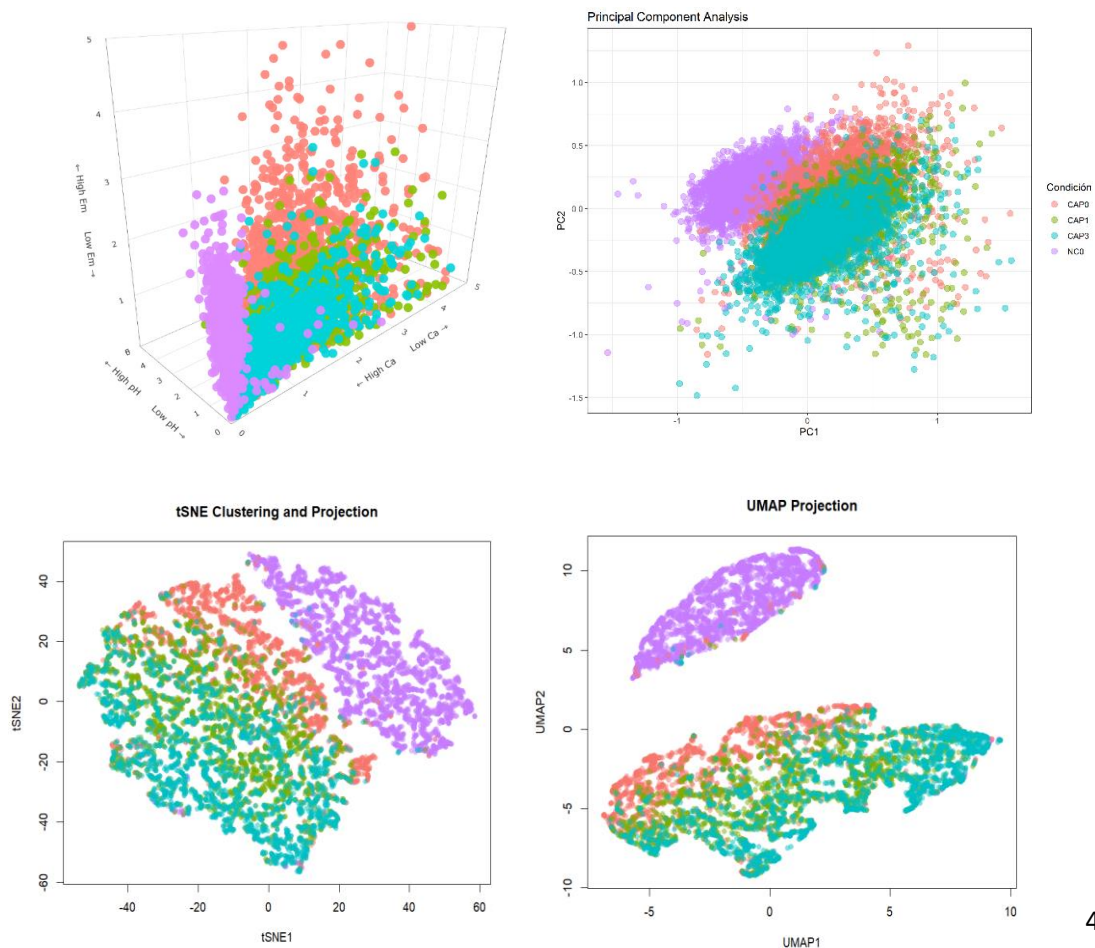
No obstante, estos resultados no arrojan evidencia sobre la existencia de subpoblaciones de espermatozoides que conforme avanza la capacitación, desarrollen cambios particulares que contribuyan en su proceso de transformación hacia la fertilización del ovocito. La principal razón que se tiene respecto a la existencia de las subpoblaciones es la disminución de la densidad de los histogramas y su ensanchamiento, que pueden ser consecuencia de la separación de una población principal en una o más subpoblaciones.

La estrategia propuesta para dar identidad propia a estas subpoblaciones y eliminar esta especie de “enmascaramiento” por contribución de todas las células, es a partir de la aplicación de métodos y modelos matemáticos que faciliten descomponer o reintegrar la población. Se hizo uso del análisis de datos multidimensionales, particularmente de los algoritmos PCA (Pearson, 1909;



Hotelling, 1930), t-SNE (van der Maaten and Hinton, 2008) y UMAP (McInnes *et al.*, 2018). Todos estos algoritmos tienen como objetivo tomar un conjunto de puntos en un espacio de alta dimensión y encontrar una representación fiel de ellos en un espacio de menor dimensión, normalmente el plano 2D. Una de las ventajas que brindan estos algoritmos es que permiten encontrar agrupamiento o asociaciones topológicas entre los datos y sus proximidades relativas.

La **Figura 16** muestra el análisis de los datos de un donador representativo, utilizando los algoritmos de reducción de dimensionalidad. Pasando desde una representación en 3D hasta las propias para PCA, t-SNE y UMAP, se puede distinguir bajo el código de colores una característica consistente entre todos los donadores: la separación entre las condiciones NC y CAP. El resultado de estos algoritmos se traduce en conjuntar los cambios de los tres parámetros en un plano bidimensional, guardando la relación lineal para el caso del PCA y no lineal para t-SNE y UMAP, y concordando entre todos que los cambios de  $[Ca^{+2}]_i$ , pH<sub>i</sub> y Em son evidentes tras el inicio de la capacitación.



**Figura 16. Representación gráfica de los datos en 3D y bajo el uso de algoritmos de reducción de dimensionalidad (PCA, t-SNE y UMAP).** Comparación entre experimentos representativos en 3D (superior izquierda) y después de la aplicación de algoritmos que facilitan el clustering como PCA (superior derecha), t-SNE (inferior izquierda) y UMAP (inferior derecha). n = 2000 células por condición, 8 mil células en total. ([ir a la Discusión](#))

Por otra parte, se realizó la simulación de la interferencia de las sondas fluorescentes utilizadas, usando los porcentajes del espectro de emisión de cada colorante hacia los filtros de paso de banda. La **Figura suplementaria 6** se presenta estas simulaciones para las principales interferencias: BCECF-AM y Calbryte-590, así como Calbryte-590 y DiSC<sub>3</sub>. Esta simulación sirvió como control adicional a los controles de compensación, permitiendo que la señal obtenida para cada colorante es propia y producida por los cambios bioquímicos que inducen la excitación de cada uno.

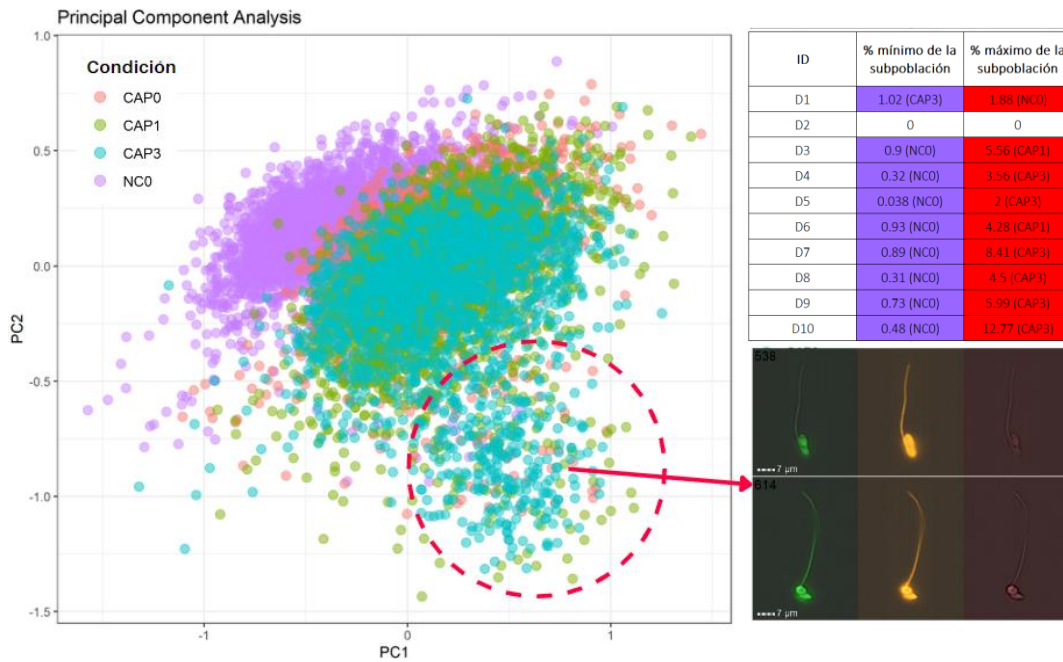
***La detección de una subpoblación con aumento en  $[Ca^{+2}]_i$  y  $pH_i$ , pero despolarización de  $E_m$ , abre la exploración de más parámetros importantes asociados a la capacitación***

Concretados los resultados para los distintos algoritmos previamente descritos, se analizaron minuciosamente para observar el comportamiento general de las poblaciones respecto a las condiciones NC y CAP en todos los tiempos trabajados. Resultó particularmente interesante la detección de un conglomerado o agrupamiento de células que únicamente surgió en condiciones capacitantes, aumentando en la mayoría de los casos conforme se acercaba el tiempo CAP3 y que, a pesar de ser un porcentaje bajo del total de la población, fueron consistentes en prácticamente todos los donadores y siempre en las condiciones CAP.

El agrupamiento celular mencionado se observa en la **Figura 17**, junto con los porcentajes de esta subpoblación en el mínimo y máximo tratamiento en el que se presentan, así como las imágenes obtenidas en el AMNIS de algunas de ellas, permitiendo discernir de manera inequívoca que la señal que brindan es

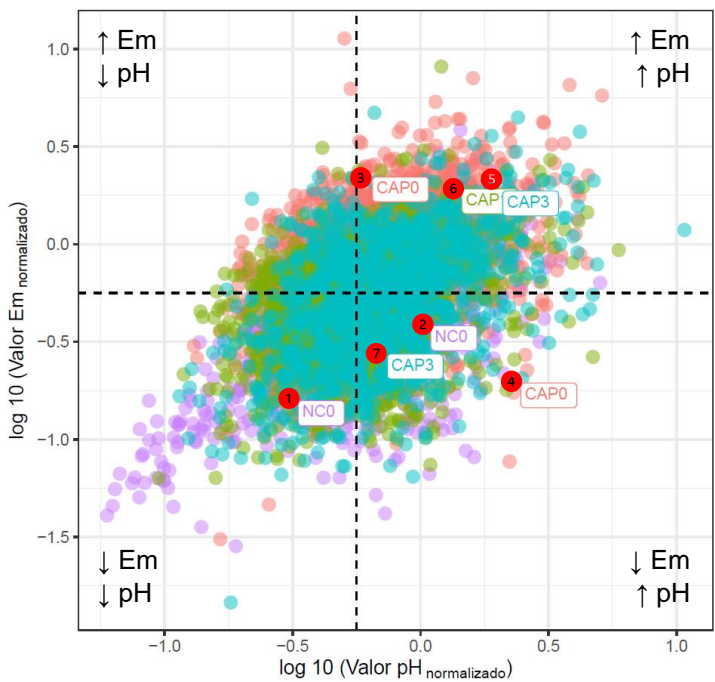
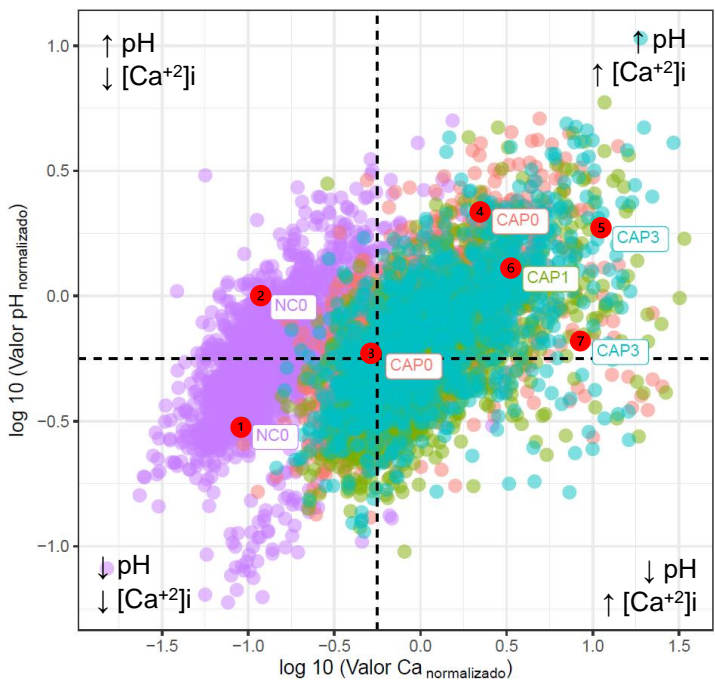
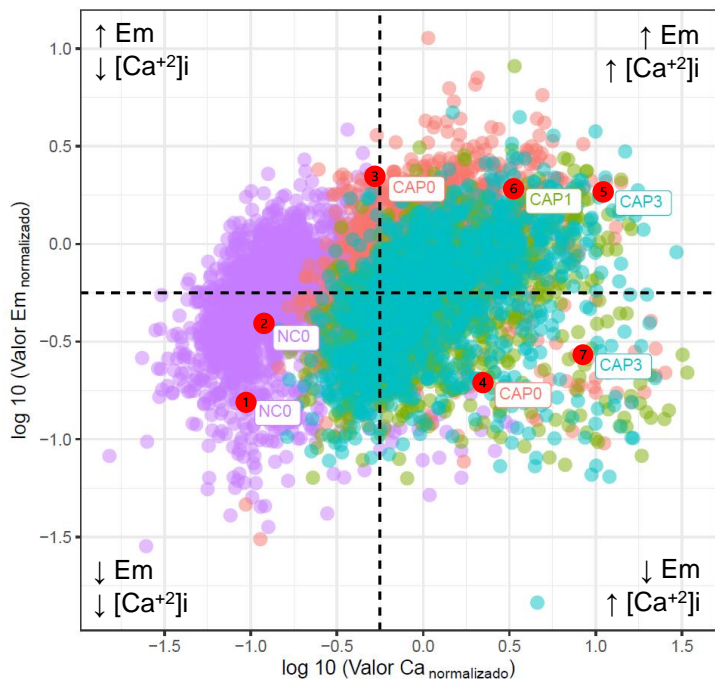


únicamente en el canal de BCECF (pHi) y Calbryte-590 ( $[Ca^{+2}]_i$ ), siendo mínima o prácticamente ausente la señal de DiSC<sub>3</sub> para Em.



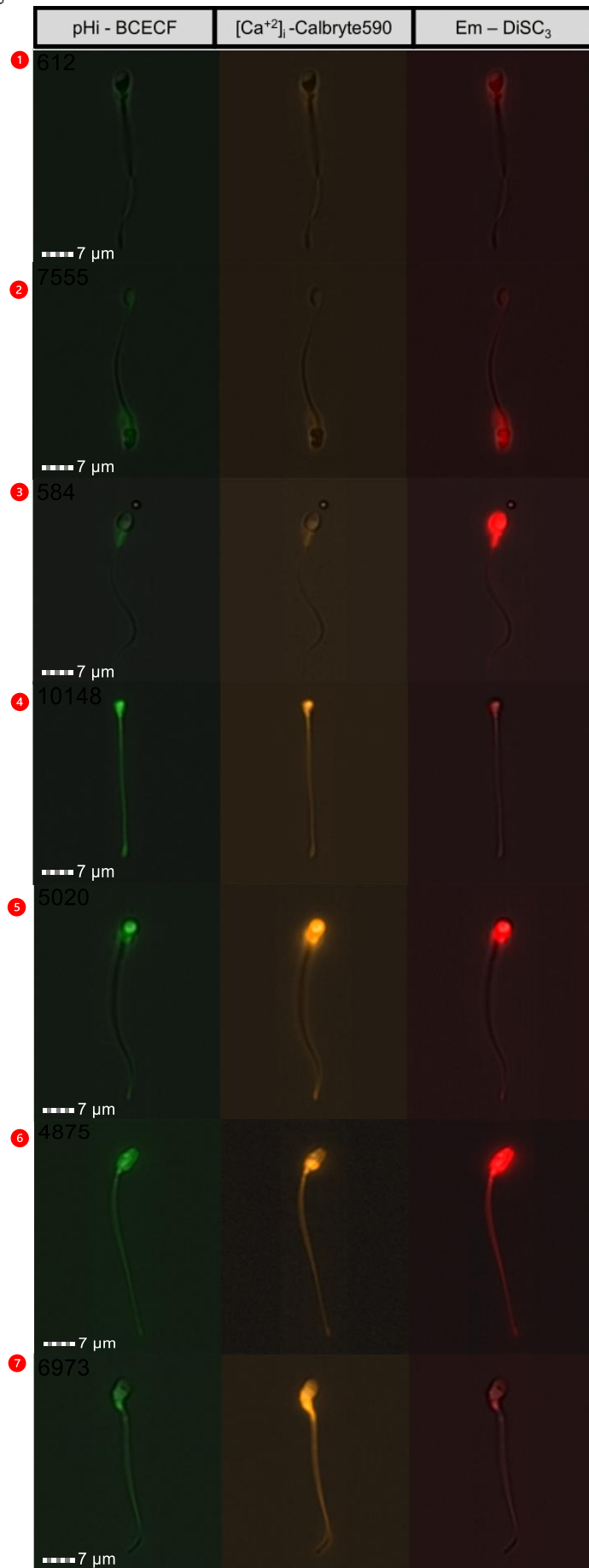
**Figura 17. Identificación de las células dentro de la subpoblación segregada en capacitación.** *Izquierda:* gráfico representativo de una población de espermatozoides como resultado de un análisis de PCA con las condiciones NC y CAP (0,1 y 3 hrs), en el círculo se observa la posible subpoblación que, a diferencia de toda la población restante, se separa. *Derecha superior:* tabla con los porcentajes de células del total de eventos por condición NC y CAP (0,1 y 3 hrs) para el mínimo y máximo de recurrencia o aparición. *Derecha inferior:* imágenes representativas de las células dentro de la subpoblación, correspondientes a los canales de pHi (BCECF),  $[Ca^{+2}]_i$  (Calbryte-590) y Em (DiSC<sub>3</sub>), respectivamente. n = 2000 células por condición, 8 mil totales. ([ir a la Discusión](#))

En la **Figura 18** podemos observar un compendio de imágenes de un donador representativo en el que se puede distinguir la gran heterogeneidad del comportamiento en la población de espermatozoides para cada condición NC y CAP utilizadas. Se encontraron 7 clases distintas de señales fluorescentes, pasando de la ausencia completa de fluorescencia para los 3 marcadores utilizados de pHi,  $[Ca^{+2}]_i$  y Em, la presencia de señal para todos ellos y la aparición particular de conglomerados pequeños de células con señal para 2 parámetros: pHi y  $[Ca^{+2}]_i$ , así como  $[Ca^{+2}]_i$  y Em.



Condición

- CAP0
- CAP1
- CAP3
- NCO

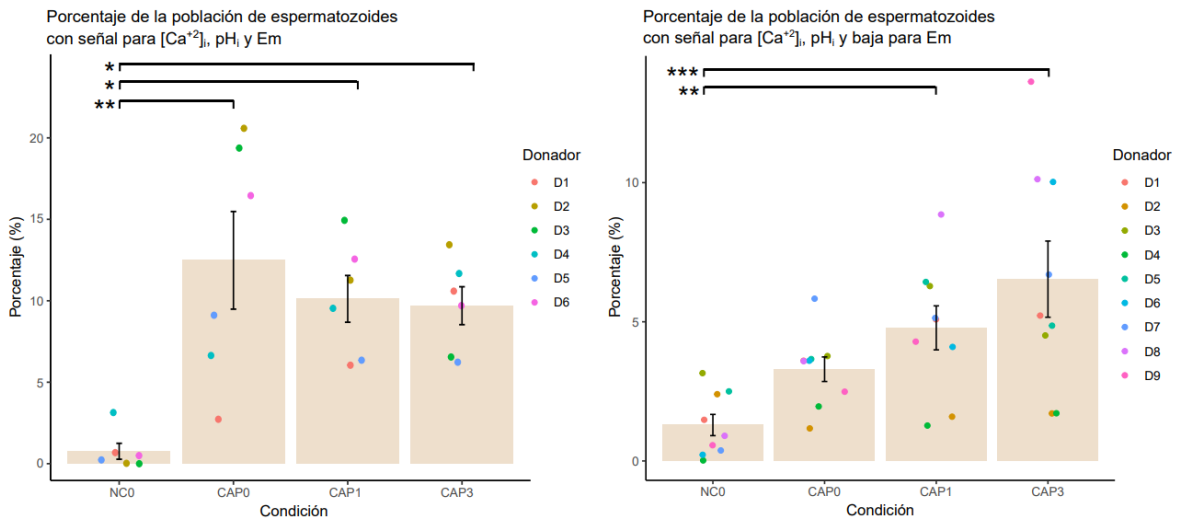


**Figura 18. Heterogeneidad y distribución biparamétrica de los espermatozoides en función de los cambios bioquímicos de la capacitación.** *Izquierda:* gráfica de puntos representativa que presenta la distribución de los espermatozoides respecto a 2 parámetros: a) Ca vs Em, b) Ca vs pH y c) Em vs pH. Los valores están el log 10 de los valores normalizados para cada parámetro. *Derecha:* imágenes correspondientes a los puntos ubicados en las gráficas de puntos, para cada uno de los parámetros y sus respectivos colorantes: pH<sub>i</sub> (BCECF), [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Calbryte-590) y Em (DiSC<sub>3</sub>), respectivamente. n = 2500 células por condición, 10 mil células totales. ([ir a la Discusión](#))

Fue posible de esta manera encontrar el porcentaje de la subpoblación con señal para Calbryte-590 y BCECF-AM en cada una de las condiciones NC y CAP en las que se presenta, y conjuntamente el porcentaje de las células con los cambios en los tres parámetros analizados. La **Figura 19** muestra el porcentaje de dos de las subpoblaciones de interés para este trabajo: la porción de células subpoblación que presenta cambios en los tres parámetros (inciso A); y la subpoblación que únicamente presenta cambios en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y pH<sub>i</sub>, con una disminución del Em (inciso B).

Para la subpoblación con los tres parámetros, alcanzó el porcentaje más alto en el tiempo CAP0 y se mantuvo sin cambios aparentes a lo largo de la capacitación, teniendo en promedio el 10% del total de la población por donador. Del set de 9 donadores con el que se contaba, se presentaron dos comportamientos distintos, particularmente tres donadores tuvieron valores de fluorescencia que de las condiciones NC a CAP con una disminución conforme aumentó el tiempo de capacitación. Ante esto se decidió usar solo un set de 6 donadores, en donde se encontraron diferencias significativas entre NC y todas las condiciones CAP (CAP0:  $p = 0.004$ , CAP1:  $p = 0.018$  y CAP3:  $p = 0.018$ ).

Respecto a la población con alta señal de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y pH<sub>i</sub>, y baja fluorescencia de Em, al presentarse las condiciones CAP existe un cambio comparado con la NC, teniendo un aumento constante termina siendo del 5% en promedio del total de la población por donador. Se obtuvieron significancias estadísticas para el aumento de esta población, particularmente entre NC y CAP1 ( $p = 0.004$ ), así como NC y CAP3 ( $p = 0.0005$ ).



**Figura 19. Comparación del cambio en el porcentaje de población para la aparición de señal de  $pH_i$ ,  $[Ca^{2+}]_i$  y Em, entre la población y subpoblación de espermatozoides.** A) Gráficas de barras correspondientes al cambio en el porcentaje de subpoblación con señal de  $[Ca^{2+}]_i$  y  $pH_i$ , con baja para Em ( $n = 9$ , Donador D1 a D9). B) Gráficas de barras correspondientes al cambio en el porcentaje de la subpoblación con señal para los tres parámetros simultáneos ( $[Ca^{2+}]_i$ ,  $pH_i$  y Em), comparando el valor promedio de la subpoblación de espermatozoides para cada condición NC y CAP (0,1 y 3 hrs). ( $n = 6$ , Donador D1 a D6). Los resultados están expresados en la media  $\pm$  SEM. Los datos se compararon por medio de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis considerando el tiempo de capacitación como factor. Se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn como análisis post hoc.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ , contra la condición NC ( $n = 9$ , Donador D1 a D9). ([ir a la Discusión](#))

## 7. DISCUSIÓN

### ***El análisis de los parámetros característicos de la capacitación sirve como herramienta para el análisis de la fertilidad masculina***

La capacitación del espermatozoide ha sido objeto de interés para la comprensión del proceso de fecundación, el cual, junto con el ovocito, posibilita el desarrollo del cigoto como preludeo al inicio de la vida de un organismo. Austin (1951) y Chang (1951) describieron la importancia de la capacitación como un proceso que confiere al espermatozoide la capacidad de fertilización dentro del tracto reproductor femenino, donde se presentan las condiciones fisiológicas necesarias para la activación de las vías de señalización involucradas en el desarrollo de la motilidad hiperactivada y la reacción acrosomal (Gervasi & Visconti, 2016).

El estudio de los parámetros bioquímicos de la capacitación ha dejado de enfocarse en el análisis individual, y se he orientado a comprender la interrelación de ellos, bajo condiciones *in vitro*, con la finalidad de seguir explorando y comprender de manera más completa el proceso de la capacitación. En el presente trabajo se realizó el análisis de tres parámetros distintivos de la capacitación que, a pesar de estar bien caracterizados, no se habían medido de manera simultánea: el incremento del pH intracelular (pHi), la concentración del calcio intracelular ( $[Ca^{+2}]_i$ ) y la hiperpolarización de la membrana ( $E_m$ ).

Particularmente a la fecha existe solo un estudio publicado en el que más de tres parámetros asociados a la capacitación espermática son analizados de manera simultánea. Kierzek et al. (2021) desarrollaron una estrategia denominada FAST<sup>M</sup> (frequency- and spectrally-tuned multiplexing) basada en las pruebas multiplex con distintas sondas fluorescentes, usando la modulación de la luz LED a distintas frecuencias para disminuir el cruzamiento entre la fluorescencia de las sondas y registrar en la escala de milisegundos, cambios para pHi (BCECF),  $[Ca^{+2}]_i$  (Fura-2) y  $E_m$  (RhoVR).

La estrategia propuesta en este trabajo se basa en la microscopía de flujo, que permite la adquisición de imágenes de miles de espermatozoides individuales para detectar y cuantificar la fluorescencia emitida por sondas fluorescentes. El principal antecedente en el uso de esta técnica se encuentra en los estudios llevados a cabo por Matamoros-Volante et al. (2018) y Matamoros-Volante & Trevino (2020), donde se informan sobre los cambios en el pHi y pTyr, respectivamente, a lo largo del proceso de capacitación.

La implementación de un protocolo de cuádruple tinción fluorescente para microscopía de flujo presentó un reto respecto a encontrar la mínima cantidad de invasión de la fluorescencia entre las cuatro sondas seleccionadas para cada parámetro. El citómetro de flujo AMNIS contiene 10 canales de emisión de fluorescencia, por lo que la capacidad de detección es amplia a reserva del diseño del panel de citometría. En la **Figura suplementaria 1** se observa el espectro de emisión de la fluorescencia de cada sonda utilizada, en donde se puede distinguir que los picos máximos de emisión no se traslapan entre sí y que su distribución dentro del espectro de luz visible hace que la invasión sea mínima.

Las sondas fluorescentes seleccionadas para el monitoreo simultáneo de los parámetros de la capacitación se han utilizado anteriormente en distintos estudios: La serie de colorantes intracelulares Calbryte está ampliamente reportada por su eficiente uso en ensayos de medición de los cambios en  $[Ca^{+2}]_i$  en distintos tipos celulares ante su facilidad de entrada al citosol, se ha reportado en neuronas (Peng *et al.*, 2020), células beta pancreáticas (Cho *et al.*, 2022), células HEK y CHO (Zhao *et al.*, 2019) entre otros. BCECF por su parte, es un colorante ya ampliamente utilizado para el monitoreo del pHi en espermatozoide (Gunderson *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021) al igual que DiSC<sub>3</sub> para los cambios en el potencial de membrana (Baro *et al.*, 2019; Panchal *et al.*, 2022; Molina *et al.*, 2020).

La determinación de las concentraciones idóneas para el análisis del  $[Ca^{+2}]_i$ , pHi y Em junto con la viabilidad celular en espermatozoide humano: Calbryte-590 1  $\mu$ M + BCECF-AM 300 nM + DiSC<sub>3</sub> 100 nM + Sytox Blue 1  $\mu$ M () de manera

simultánea, abre puertas como una metodología novedosa que facilita el análisis como alternativa en rapidez y practicidad para la caracterización de estos parámetros que, desde el 2021 la OMS en su última actualización del “Manual para la examinación y procesamiento de muestras de semen humano” (OMS, 2021) proponen por primera vez como herramientas útiles para la detección de problemas de infertilidad masculina.

A su vez, la compensación correspondiente de cada una de las sondas fluorescentes (**Figura 6**) bajo el uso del máximo de intensidad a partir de la adición de ionóforos específicos para cada parámetro, permite asegurar la confiabilidad de las señales obtenidas tanto en las imágenes capturadas de cada célula, así como en los valores extraídos a partir de las máscaras de píxeles diseñadas para cada uno de los componentes subcelulares del espermatozoide: célula entera, cabeza y pieza media (**Figura 4**).

### ***El inicio de la capacitación constituye el arranque más importante de los cambios fisiológicos que le suceden al espermatozoide***

Los resultados correspondientes a las cinéticas de capacitación realizadas, que partieron de condiciones no capacitantes (NC) y capacitantes (CAP) a tiempo 0, 1 y 3 de manera conjunta hicieron referencia a un cambio predominante: al inicio de la capacitación se da la activación conjunta de las vías de señalización asociadas al incremento en  $[Ca^{+2}]_i$ , la alcalinización del  $pH_i$  y la hiperpolarización del Em. Para todos los segmentos analizados, el mayor incremento de fluorescencia normalizada fue al inicio de la capacitación, siendo constante hasta el tiempo CAP3 para los tres parámetros analizados.

El antecedente más fiable de esta cinética de capacitación para  $[Ca^{+2}]_i$  es el estudio publicado por Brukman et al., (2019) en donde con citometría de flujo y bajo estímulos de Pg en condiciones NC y CAP, la mayor concentración de  $[Ca^{+2}]_i$  se presenta en los primeros 10 min de capacitación, sin darse cambios significativos a lo largo del proceso. Este estudio se restringe a medidas en población y no en las porciones subcelulares, que en el caso particular del trabajo

realizado en el citómetro coincide con que el incremento de  $[Ca^{+2}]_i$  es similar para la cabeza y la pieza principal del espermatozoide, siendo esta última la que mantiene los niveles altos de fluorescencia normalizada (**Figura 15**).

Para el caso del pH<sub>i</sub>, el estudio de Matamoros-Volante & Trevino (2020) reportó en un principio la alcalinización máxima en la cabeza y en la pieza principal a los primeros 7 min de capacitación, para después mantenerse sin cambios significativos hasta las 6 horas de capacitación. Este comportamiento se replicó en los resultados obtenidos (**Figura 15**), con la diferencia de que la resolución del trabajo de referencia es mucho más alta, pues las mediciones se realizaron cada 30 min en comparación con las realizadas en el presente trabajo, que fueron cada hora.

Finalmente, para los cambios asociados a la capacitación y el potencial de membrana, el estudio que realizó Baro Graf et al., (2020) presenta que en la población de espermatozoides a la hora 1, 3 y 5 de capacitación, usando la técnica de fluorometría, el potencial de membrana se hiperpolariza a la primera hora de capacitación, para después continuar volviéndose más negativo, pero en intervalos más pequeños de potencial. Pérez-Ocampo *et al.*, (2022) marcó un referente importante en la toma de decisiones del protocolo de capacitación utilizado, principalmente porque los resultados arrojaron la aparición de una meseta de hiperpolarización a partir del tiempo CAP3 y hasta el tiempo CAP6, semejante a los antecedentes revisados para pH<sub>i</sub> y  $[Ca^{+2}]_i$ .

Los resultados del trabajo en el AMNIS demuestran una hiperpolarización desde el inicio de la capacitación y contrario a lo reportado por Pérez-Ocampo *et al.*, (2022), no se presentó un incremento del potencial negativo en las primeras tres horas de capacitación, si no que se mantuvieron similares, incluso con una leve repolarización. Sin embargo, en todas las condiciones capacitantes siempre fue evidente la hiperpolarización de la membrana en comparación con las condiciones NC.

Otro de los hallazgos del trabajo de Pérez-Ocampo *et al.* (2022) que se replicaron en los experimentos realizados, fue la aparente despolarización del potencial de



membrana asociada a la centrifugación (**Figura 11**). Este artefacto experimental hizo que fuera necesario eliminar este proceso mecánico que se utilizaba para concentrar las células y se buscaran alternativas como la sedimentación por gravedad. Estos resultados abren la posibilidad de la presencia de sensibilidad a procesos mecánicos en los canales que controlan el potencial de membrana, algo que a la fecha no se ha reportado al menos en espermatozoide de humano.

### ***Los algoritmos de agrupamiento contribuyen en la búsqueda de subpoblaciones de espermatozoides ante los cambios inducidos por la capacitación***

El análisis individual de los donadores partió con el desarrollo de alternativas que permitieran conjuntar los tres parámetros analizados bajo la misma representación (**Figura 14**) siguiendo a su vez uno de los ejes principales de este trabajo: la búsqueda de subpoblaciones relevantes y consistentes que sean características de la capacitación. La estrategia seleccionada fue el uso de algoritmos de reducción de la dimensionalidad, que se usan como herramientas en el aprendizaje automático y el análisis de *big data* por la facilidad que brindan para analizar y visualizar grandes conjuntos de datos de gran dimensión (Allaoui *et al.*, 2020).

Los algoritmos utilizados fueron Principal Component Analysis (PCA), t-distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) y Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP). Otro de los objetivos de utilizar estos algoritmos es que tienen la facilidad de clasificar los datos y desarrollar estrategias de agrupamiento, definiendo clases a partir de los datos sin conocimiento de las etiquetas de clase (Rodríguez *et al.*, 2019). El propósito de los algoritmos es identificar grupos de datos que son similares entre sí, más que con otros. A la fecha, ninguna de estas estrategias ha sido desarrollada ni publicada utilizando como modelo al espermatozoide, por lo que se considera como un avance en el desarrollo e implementación de nuevas técnicas de análisis de *big data* que puedan sustentarse en los cambios fisiológicos de estas células.

La **Figura 16** muestra las representaciones gráficas resultantes de la aplicación de cada uno de los algoritmos de reducción y agrupamiento. Se seleccionaron tres algoritmos distintos ya que cada uno de ellos cuenta con características particulares al momento de definir los agrupamientos existentes entre las dimensiones de datos.

Para el caso de PCA o Principal Component Analysis, es un algoritmo que se basa en la distribución de las varianzas para encontrar los ejes ortogonales que contengan la mayoría de los datos y de ahí, proyectarse en un plano de menor dimensión. Estos ejes ortogonales son los llamados PC's o Principal Components, que se obtienen de la combinación lineal de las variables originales. Los valores resultantes para las observaciones se denominan puntuaciones factoriales y son las proyecciones de los datos sobre los PC's a menor dimensión (Kurita, 2019).

Tanto t-SNE y UMAP corresponden al grupo de los métodos de reducción dimensional no lineal, basados en modelos matemáticos más complejos. t-SNE modela la distribución de probabilidad de los vecinos más cercanos alrededor de cada punto. En el espacio original de alta dimensión esto se modela como una distribución gaussiana, pero en el espacio de salida bidimensional esto se modela como una distribución t. El objetivo es encontrar un mapeo en el espacio bidimensional que minimice las diferencias entre estas dos distribuciones en todos los puntos. El principal parámetro que controla el ajuste se llama perplejidad, definida como el número de vecinos más cercanos considerados para coincidir las distribuciones original y ajustada (Hoare, 2017).

UMAP se encarga de crear un "complejo simplicial difuso", que es un gráfico donde se representa la probabilidad de que dos puntos estén conectados. Para determinar la conectividad, el algoritmo extiende un radio desde cada punto, conectándolos cuando los radios se superponen. Este radio se determina en función de la distancia al enésimo vecino más cercano de cada punto, estipulando que cada uno debe estar conectado al menos con su vecino más cercano y garantizando que la estructura local se preserve en equilibrio con la estructura global. Entre los parámetros importantes de UMAP está número de vecinos más

cercanos utilizados para construir el gráfico inicial de alta dimensión. Controla eficazmente el equilibrio entre estructura local y global. La distancia mínima entre puntos en un espacio de baja dimensión también importa, pues define qué tan estrechamente se agrupan los puntos (Coenen & Pearce, 2019).

Para todas las representaciones gráficas de los algoritmos se observa sin lugar a duda, la distinción y el cambio que se da de manera simultánea para los tres parámetros analizados:  $[Ca^{+2}]_i$ , pHi y Em, todos en un espacio de baja dimensión que comparado con la representación 3D (**Figura 16**) se distribuyen y analizan de mejor manera. A su vez, es claro el cambio que presentan los tres parámetros justo al inicio de la capacitación (CAP0) y cómo conforme esta sigue su curso hacia el tiempo 3 (CAP3) la población va evolucionando e incrementando el nivel de  $[Ca^{+2}]_i$ , la alcalinización del citoplasma y la hiperpolarización de la membrana.

Está ampliamente reportado en diferentes estudios y bajo el uso de espermatozoides de distintas especies, que no todos los espermatozoides se capacitan, sino que solo una fracción de ellos logran prepararse bajo esta serie de cambios para ser capaces de fertilizar; esto ya sea en humano (López-González, 2014), ratón (Luque *et al.*, 2018), carnero (García-Álvarez *et al.*, 2014), entre muchos otros más. Para el caso de humano, López-González estudió la presencia de una subpoblación con una marcada hiperpolarización a lo largo de la capacitación, sin embargo, a la fecha nuevamente no existe un estudio que se enfoque en la correlación de otros de los parámetros de la capacitación de manera simultánea, como se trata en este trabajo.

***El análisis de subpoblaciones arrojó una gran heterogeneidad celular y la formación de un grupo de espermatozoides con características particulares***

La aparición y adecuada caracterización de esta subpoblación a partir de la descomposición de gaussianas y el análisis de las imágenes obtenidas a través del AMNIS sugieren que existe una subpoblación de espermatozoides con altos niveles de  $[Ca^{+2}]_i$  y pHi, con una marcada ausencia de señal asociada a la hiperpolarización de la membrana plasmática. A pesar de ser una subpoblación pequeña que se presenta en menos del 5% de células (**Figura 17** y **Figura 19**) en

los tiempos CAP de aparición, particularmente en CAP1 y CAP3, resulta interesante la caracterización de esta respecto a los cambios fisiológicos a los que esté sujeta *in vivo*.

En el reciente trabajo de Pérez-Ocampo *et al.* (2022) así como en muchos otros estudios publicados en espermatozoide de humano y de otras especies (De la Vega-Beltrán *et al.*, 2012; Matamoros-Volante *et al.*, 2021; Suárez, 2008) se ha encontrado la relación entre el aumento de  $[Ca^{+2}]_i$  y la hiperpolarización de la membrana dentro de la red compleja de señalización que se activa y desencadena por el proceso de capacitación, particularmente ante la presencia de inductores fisiológicos como la progesterona (Pg), el bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ) y la albúmina. Recordemos que CatSper como principal canal de entrada de  $Ca^{+2}$ , está regulado de manera multimodal, es decir que diversos estímulos desencadenan su activación: la presencia de Pg, la alcalinización del pH e incluso, se habla de una voltaje-dependencia.

Dentro de las razones fisiológicas que se pueden atribuir en este punto a la presencia de la subpoblación con alto  $[Ca^{+2}]_i$  y  $pH_i$  está parte de lo reportado por Rossato *et al.* (2001) en donde evaluaron el vaciamiento de las pozas internas de  $[Ca^{+2}]_i$  y su relación con la reacción acrosomal. Particularmente de este trabajo llama la atención el fenómeno que encontraron respecto a que existe una despolarización de la membrana plasmática dependiente del influjo de  $[Ca^{+2}]$  al citosol del espermatozoide en presencia de tapsigargina, un inhibidor de la  $Ca^{+2}$ -ATPasa.

Son necesarias más pruebas y ensayos en los que se puedan involucrar marcadores del acrosoma o bien, inhibidores de canales de  $Ca^{+2}$ , tanto para pozas como para CatSper, para comprender si este fenómeno se puede adjudicar al vaciamiento de las pozas internas. Se asocia este fenómeno ya que el aumento es consistente conforme la capacitación avanza, algo que se ha registrado respecto al porcentaje de reacción acrosomal espontánea durante la capacitación *in vitro*. Aldana *et al.*, (2021) reportan un porcentaje de entre 15-20% de espermatozoides que experimentan la reacción acrosomal espontánea en humano. Vázquez &

Verón (2018) mencionan que la RA en espermatozoides recién eyaculados es de menos de 5% y conforme avanza la capacitación aumenta este valor.

Otra de las posibilidades recae en que la subpoblación está en fase de transición a la muerte celular, en donde a pesar de no mostrar señal para Sytox Blue como marcador de viabilidad, podría estar sugiriendo que dentro de los primeros cambios fisiológicos que ocurren en el espermatozoide previo a su muerte sería primero, la despolarización de la membrana y junto a ello, el vaciamiento de las pozas internas de  $\text{Ca}^{+2}$ . Nuevamente, este comportamiento se ha reportado previamente en otros tipos celulares (Smaili *et al.*, 2013; Hajnóczky *et al.*, 2003), es un fenómeno común asociado a la apoptosis y la muerte celular.

En la **Figura 19** se presenta el porcentaje de subpoblación con los 3 parámetros de manera simultánea, partiendo de la selección de criterios de inclusión con valores de corte en los que solo se toman en cuenta los valores de células que cumplan con la normalización de cada colorante respecto a la adición de monensina, valinomicina y ionomicina para BCECF, Calbryte-590 y DiSC<sub>3</sub>. Siendo así, el porcentaje de células con cambios en  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ , pHi y Em un promedio de 10%, consistente entre todas las condiciones CAP. Está reportado en varios estudios (López-González *et al.*, 2014; Buffone *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2011) y en al menos un parámetro, que solo una subpoblación de espermatozoides experimenta cambios asociados a la capacitación.

A la fecha no hay un consenso definido acerca del porcentaje de células que experimenten la capacitación, por lo que los datos contribuyen un poco al entendimiento de que no todos los espermatozoides terminan adquiriendo la capacidad fecundante propia para la que los prepara la capacitación. Entre los reportes que existen está el de Aldana *et al.*, (2021) en donde indica que al menos entre un 20 y 40% de la población total de espermatozoides alcanza a desarrollar los cambios asociados a la capacitación.

En la **Figura 18** se observan las imágenes y distribuciones de los espermatozoides en función a las respuestas bioquímicas en condiciones NC y CAP, siendo altamente heterogéneas las respuestas que puede tener la población

de células para los cambios en  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$  y  $Em$ , como se observa en los gráficos de puntos de esta misma figura, en donde se encontraron hasta 7 clases distintas de cambios, entre células con señal únicamente para 2 marcadores, ya sea  $[Ca^{+2}]_i$  y  $pH_i$ ,  $Em$  y  $[Ca^{+2}]_i$ , o bien,  $Em$  y  $pH_i$ ; con alta y baja fluorescencia de manera indistinta.

La gran heterogeneidad celular presentada en las células y que está asociada a los cambios bioquímicos propios la capacitación, facilitaron la identificación de un segmento poblacional de espermatozoides con incremento en  $[Ca^{+2}]_i$  y  $pH_i$ , pero con despolarización de  $Em$ , que se cree están asociados a otras respuestas moleculares involucradas en la capacitación, como lo es la reacción acrosomal. Por lo tanto, está también asociada al éxito reproductivo o bien, a complicaciones asociadas a la fertilidad masculina.

Los resultados de este trabajo ofrecen un procedimiento novedoso y viable en tiempo y ejecución para el análisis simultáneo de parámetros de la capacitación del espermatozoide. Teniendo en cuenta las ventajas, limitaciones y resolución propia de la metodología, se puede determinar que la activación de la maquinaria molecular del espermatozoide produce cambios en  $[Ca^{+2}]_i$ ,  $pH_i$  y  $Em$ , orquestados simultáneamente en el tiempo, dentro de los primeros instantes de la capacitación.

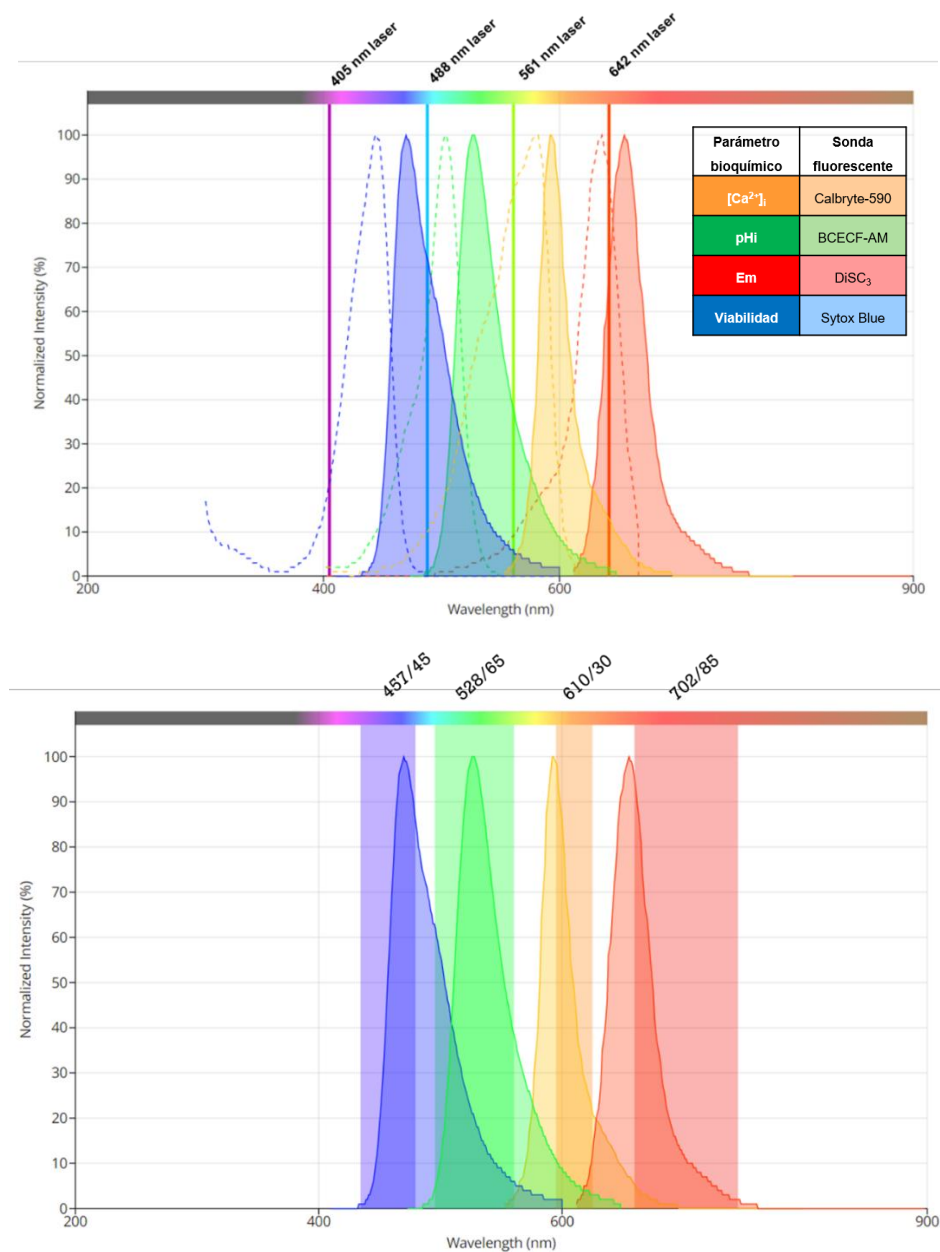
## CONCLUSIONES

- La citometría de flujo acoplada a imágenes permite la identificación de la forma celular del espermatozoide, al igual que de sus porciones subcelulares.
- La combinación de colorantes bajo determinadas concentraciones permite realizar una tinción cuádruple en el espermatozoide para el análisis de parámetros bioquímicos como  $[Ca^{+2}]_i$ , pHi y Em, además de la viabilidad celular.
- Se infiere que la centrifugación tiene un efecto despolarizante en el potencial de membrana del espermatozoide.
- La clasificación de espermatozoides con cambios de  $[Ca^{+2}]_i$  + pHi + Em utilizando algoritmos de reducción de la dimensionalidad contribuye en visualizar el cambio entre de estos parámetros desde el inicio de la capacitación.
- El agrupamiento de espermatozoides que se encontró con un nivel alto de  $[Ca^{+2}]_i$  y pHi, así como una despolarización de la Em, abre paso al estudio de otros fenómenos fisiológicos involucrados en la capacitación que también son de interés: la reacción acrosomal.

## PERSPECTIVAS

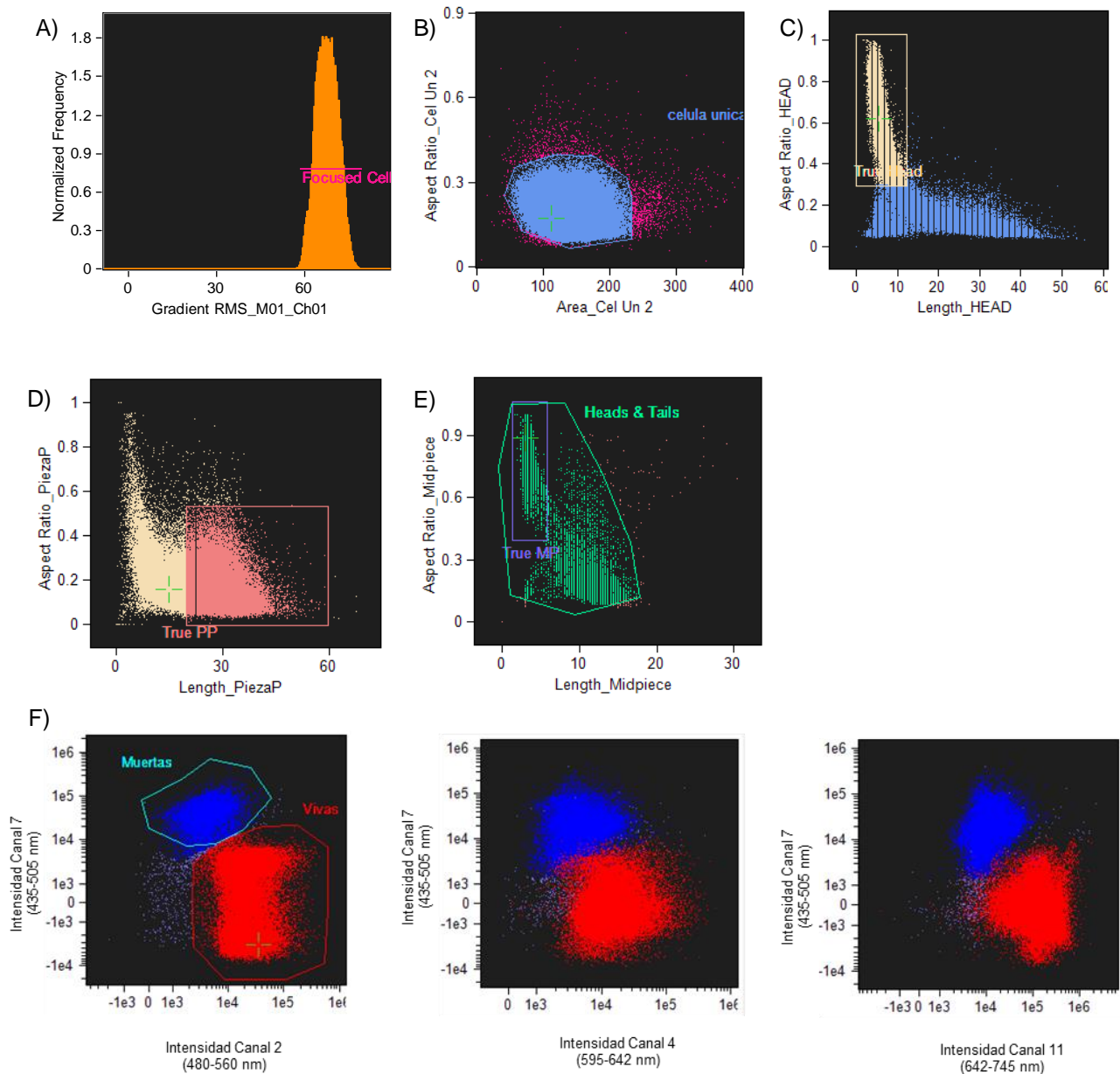
- Emplear inhibidores de canales y entidades moleculares involucradas en los cambios de  $[Ca^{+2}]_i$  + pHi + Em para correlacionar los cambios de manera más concreta en el contexto temporal de la capacitación.
- Seleccionar una quinta sonda fluorescente capaz de detectar reacción acrosomal, permitiendo correlacionar más parámetros de la capacitación y a su vez, la existencia de subpoblaciones de espermatozoides reaccionados.

## FIGURAS SUPLEMENTARIAS

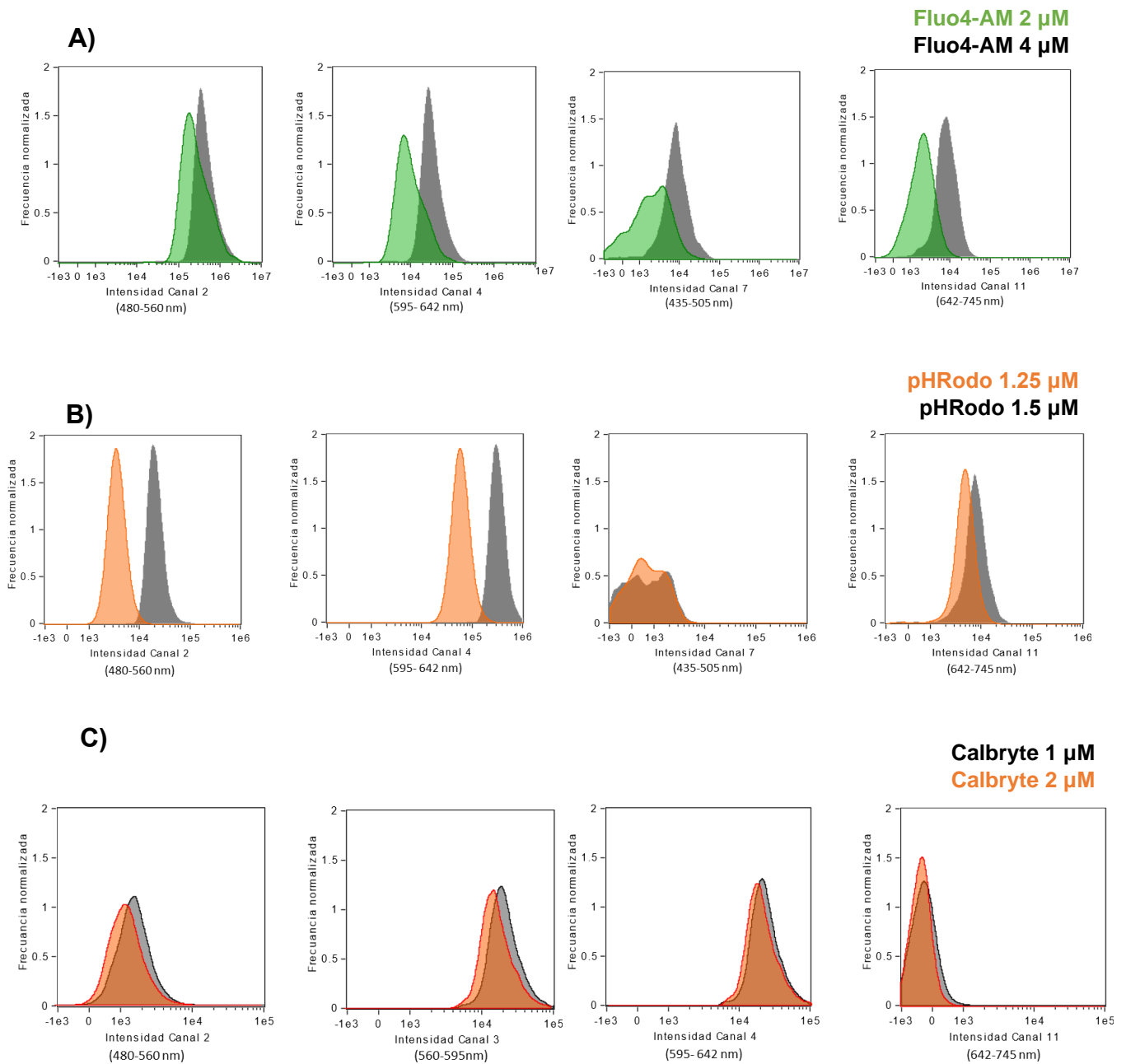


**Figura suplementaria 1. Diseño de panel de colorantes en Spectrum Viewer.** A) Espectros de excitación y emisión de los colorantes Sytox Blue, BCECF-AM, Calbryte-590 y DiSC<sub>3</sub>, respectivamente; seleccionados para la cuádruple tinción. Se incluyen también los láseres propios para la excitación de cada una de las sondas. B) Disposición de los filtros de paso de banda para cada uno de los espectros de emisión de los colorantes.

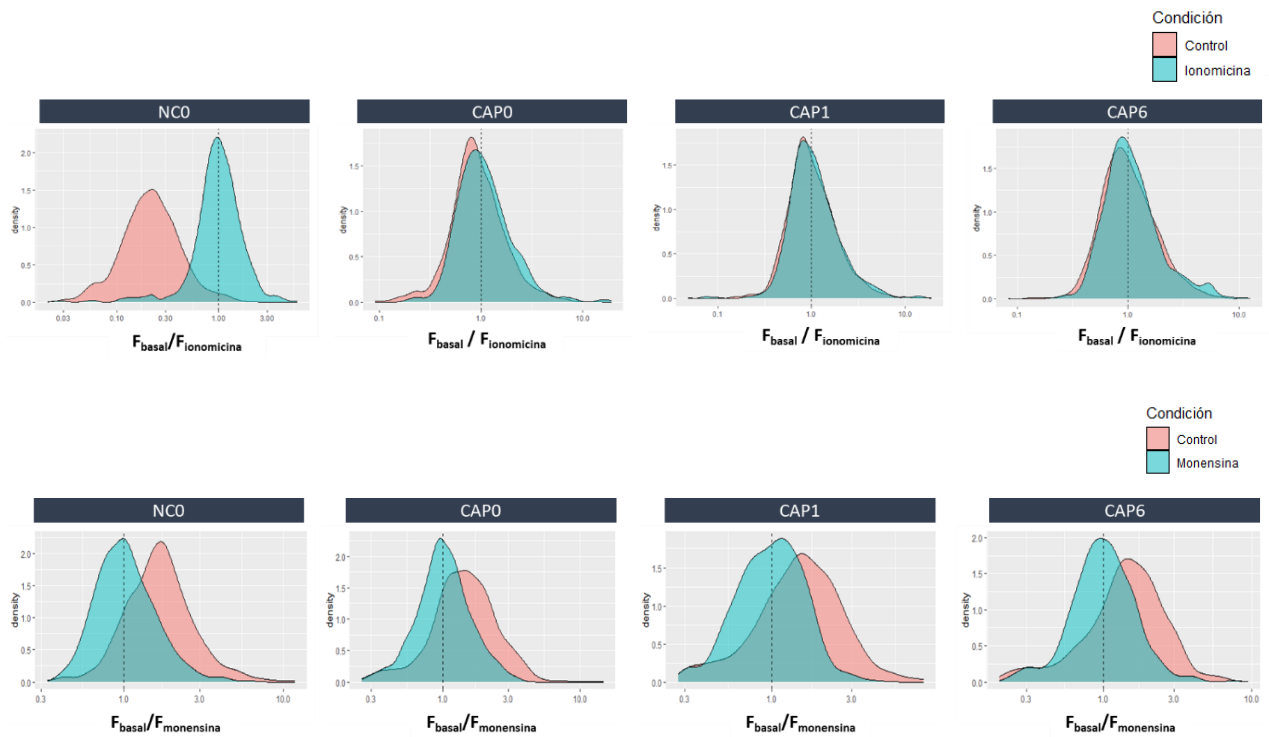




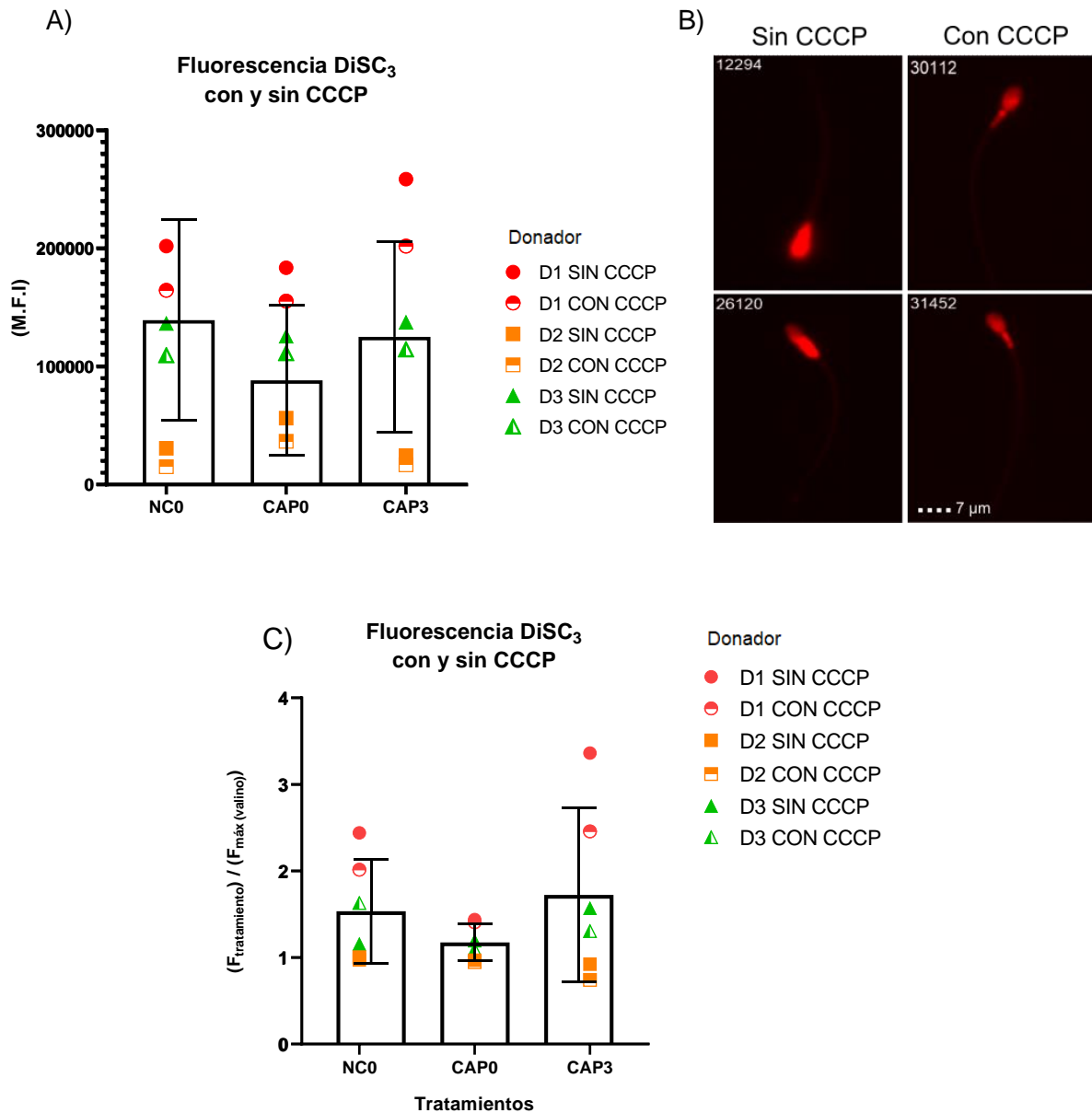
**Figura suplementaria 2. Tamizaje de la población de espermatozoides.** A) Delimitación de la población a partir de un gradiente RMS mayor a 60, correspondiente al mayor enfoque de las imágenes obtenidas. B) Primer filtro de selección de células únicas, ubicadas entre los 50 y 200  $\mu\text{m}^2$ , y un Aspect Ratio menor a 0.3. C) Selección de cabezas a partir de la región de célula única, con Aspect Ratio mayor a 0.4 y largo menor a los 10  $\mu\text{m}$ . D) Selección de flagelos a partir de la región de cabezas, delimitándose a partir de un largo mayor a 20  $\mu\text{m}$  y un Aspect Ratio menor a 0.3. E) Delimitación final de las células utilizando como parámetro la pieza media, con un largo menor a los 8  $\mu\text{m}$  y un Aspect Ratio mayor a 0.35. F) Discriminación de población viva y muerta de espermatozoides. Comparación de los canales correspondientes a BCECF-AM, Calbryte-590 y DiSC<sub>3</sub> ([regresar a Resultados<sup>1-2</sup>](#))



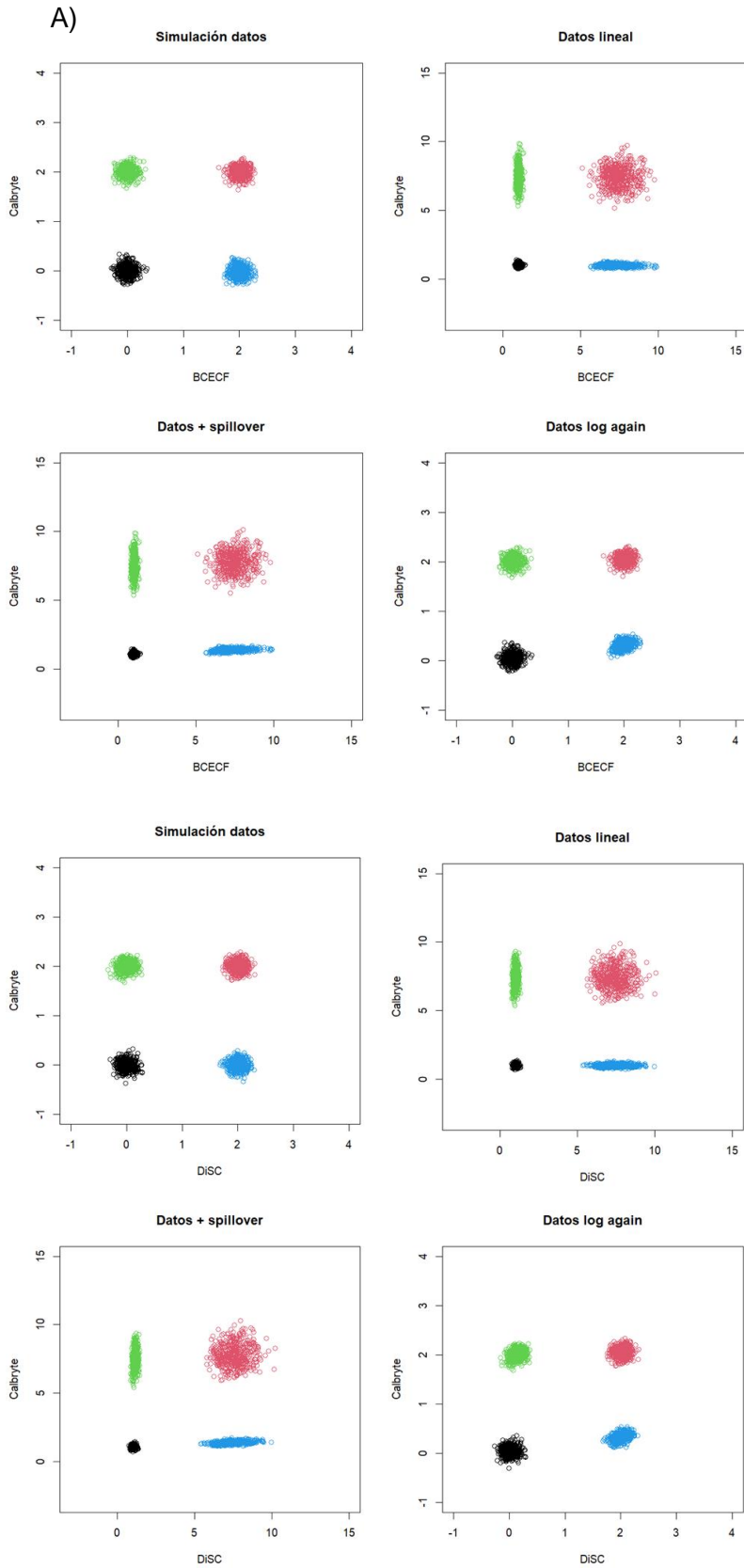
**Figura suplementaria 3. Comparación de la señal de fluorescencia a diferentes concentraciones de colorantes para  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $\text{pH}_i$  en espermatozoide humano.** Histogramas de intensidad de fluorescencia resultantes del uso de A) Fluo4-AM, B) pHRodo Red y C) Calbryte-590, a las concentraciones indicadas, en los canales de emisión del AMNIS para los colorantes restantes. \*Nota: la intensidad de fluorescencia está medida en UAF (Unidades Arbitrarias de Fluorescencia). ([regresar a Resultados<sup>1</sup> - 2](#))



**Figura suplementaria 4. Histogramas normalizados de  $[Ca^{2+}]_i$  y  $pH_i$  a los diferentes tratamientos no capacitantes y capacitantes.** Comparación de los histogramas normalizados al máximo de fluorescencia ( $F / F_{m\acute{a}ximo}$ ) para A) Fluo4-AM 2  $\mu M$  y B) pHRodo Red 1.5  $\mu M$ . Muestra representativa de uno de los individuos que componen a la respectiva  $n$  de cada combinación de colorantes.  $n = 2000$  células. ([regresar a Resultados<sup>1</sup>](#))



**Figura suplementaria 5. Adición de CCCP en espermatozoides teñidos con DiSC<sub>3</sub>.** A) Valores de fluorescencia obtenida para tratamientos con y sin adición de CCCP para DiSC<sub>3</sub>. (n = 3, Donadores D1, D2 y D3). (B) Imágenes representativas de la tinción con DiSC<sub>3</sub> en espermatozoide y el efecto que tiene CCCP en la tinción. (C) Valores normalizados de la fluorescencia de DiSC<sub>3</sub> a partir del uso de valinomicina ( $F_{\text{tratamiento}}/F_{\text{máx}}(\text{valinomicina})$ ), en presencia y ausencia de CCCP. ([regresar al Resultados](#))



**Figura suplementaria 6. Simulación de datos para la corrección del spillover de los colorantes utilizados.** Modelación *in silico* de 4 poblaciones aleatorias: negativa para X y Y (negro), positiva solo para Y (verde), positiva solo para X (azul) y positiva para X y Y (roja).  $n = 500$  puntos para cada gráfico. A) Gráfico de puntos para valores con señal entre Calbryte-590 y BCECF. Los datos logarítmicos se transforman en lineales y se adiciona el valor de cruzamiento de señal para cada colorante, visualizando el desplazamiento de las 4 poblaciones hacia el eje de BCECF o Calbryte. B) Gráfico de puntos para valores con señal entre Calbryte-590 y DiSC<sub>3</sub>. Mismo procedimiento que en las gráficas del inciso A). ([regresar a Resultados](#))

## BIBLIOGRAFÍA

- Aldana, A., Carneiro, J., Martínez-Mekler, G., & Darszon, A. (2021). Discrete Dynamic Model of the Mammalian Sperm Acrosome Reaction: The Influence of Acrosomal pH and Physiological Heterogeneity. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.682790>
- Allaoui, M., Kherfi, M.L., Cheriet, A. (2020). Considerably Improving Clustering Algorithms Using UMAP Dimensionality Reduction Technique: A Comparative Study. In: El Moataz, A., Mammass, D., Mansouri, A., Nouboud, F. (eds) Image and Signal Processing. ICISP 2020. Lecture Notes in Computer Science, vol 12119. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-51935-3\\_34](https://doi.org/10.1007/978-3-030-51935-3_34)
- Austin, C. (1952) The capacitation of the mammalian sperm. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 170, 326.
- Austin, C., Bishop, M. (1958). Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 149:241248.
- Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, C., Maggi, M., & Forti, G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 12, 323–330.
- Baro Graf, C., Ritagliati, C., Stival, C., Balestrini, P. Buffone, M. G., & Krapf, D. (2019). Determination of a robust assay for human sperm membrane potential analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 101.
- Baro Graf, C.; Ritagliati, C.; Torres-Monserrat, V.; Stival, C.; Carizza, C.; Buffone, M.G.; Krapf, D. (2020) Membrane Potential Assessment by Fluorimetry as a Predictor Tool of Human Sperm Fertilizing Capacity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*: 7, 1–10.
- Bravo, A.; Treulen, F.; Uribe, P.; Boguen, R.; Felmer, R.; Villegas, J.V. (2015) Effect of mitochondrial calcium uniporter blocking on human spermatozoa. *Andrologia*, 47, 662–668.
- Brown, S. G., Publicover, S. J., Mansell, S. A., Lishko, P. V., Williams, H. L., Ramalingam, M., *et al.* (2016). Depolarization of sperm membrane potential is a common feature of men with subfertility and is associated with low fertilization rate at IVF. *Human Reproduction*: 31, 1147–1157.
- Brukman, N. G., Nuñez, S. Y., Puga Molina, L. del C., Buffone, M. G., Darszon, A., Cuasnicu, P. S., & Da Ros, V. G. (2019). Tyrosine phosphorylation signaling regulates Ca<sup>2+</sup> entry by affecting intracellular pH during human sperm capacitation. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 5276–5288.
- Baro Graf, C., Ritagliati, C., Torres-Monserrat, V., Stival, C., Carizza, C., Buffone, M. G., & Krapf, D. (2020). Membrane Potential Assessment by Fluorimetry as a Predictor Tool of Human Sperm Fertilizing Capacity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00383>
- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Mongioì, L. M., Vignera, S. La, & Calogero, A. E. (2020). Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 1728, 21(5), 1728.
- Chang, M. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*: 168, 697-698.
- Cho, J. H., Li, Z. A., Zhu, L., Muegge, B. D., Roseman, H. F., Lee, E. Y., ... & Hughes, J. W. (2022). Islet primary cilia motility controls insulin secretion. *Science Advances*, 8(38).
- Coenen, A; Pearce, A. (2019) Understanding UMAP. Página web: <https://pair->

[code.github.io/understanding-umap/](https://code.github.io/understanding-umap/)

- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*, 91(4), 1305–1355.
- Demarco, I.A.; Espinosa, F.; Edwards, J.; Sosnik, J.; De La Vega-Beltran, J.L.; Hockensmith, J.W.; Kopf, G.S.; Darszon, A.; Visconti, P.E. Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub> cotransporter in mouse sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278, 7001–7009.
- De La Vega-Beltran, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Krapf, D., Hernandez-González, E. O., Wertheimer, E., Treviño, C. L., Visconti, P. E., & Darszon, A. (2012). Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44384–44393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393488>
- Escoffier J, Krapf D, Navarrete F, Darszon A, Visconti PE. (2012) Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *Journal of Cell Science*; 125:473–485.
- Ford, W.C.L. Comments on the release of the 5th edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian Journal of Andrology*. 2010, 12, 59–63.
- Gao, T., Li, K., Liang, F., Yu, J., Liu, A., Ni, Y., & Sun, P. (2021). KCNQ1 potassium channel expressed in human sperm is involved in sperm motility, acrosome reaction, protein tyrosine phosphorylation, and ion homeostasis during capacitation. *Frontiers in Physiology*, 12, 761910.
- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Ramón, M., del Olmo, E., Jiménez-Rabadán, P., Fernández-Santos, M. R., Anel-López, L., Garde, J. J., & Soler, A. J. (2014). Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilisation. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(5), 725–732. <https://doi.org/10.1071/RD13034>
- Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 979. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2016.2723>
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2016). Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Molecular Reproduction and Development*, 83(10), 860–874. <https://doi.org/10.1002/mrd.22663>
- Gunderson, S. J., Molina, L. C. P., Spies, N., Balestrini, P. A., Buffone, M. G., Jungheim, E. S., ... & Santi, C. M. (2021). Machine-learning algorithm incorporating capacitated sperm intracellular pH predicts conventional in vitro fertilization success in normospermic patients. *Fertility and Sterility*, 115(4), 930-939.
- Gurung, P., Yetiskul, E., & Jialal, I. (2022). *Physiology, male reproductive system*. In StatPearls [Internet]. Statpearls publishing.
- Hajnóczky, G., Davies, E., & Madesh, M. (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), 445-454.
- Hoare, J. (2017) *Cómo funciona t-SNE y reducción de dimensionalidad*. Página web: <https://www.displayr.com/author/jake-hoare/>
- Hotelling, H. (1933). Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, 24, 417–441, and 498–520.
- Inaba, K. (2003). Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zoological Science*, 20(9), 1043–1056.
- Jiang, Y., He, Y., Pan, X., Wang, P., Yuan, X., & Ma, B. (2023). *Advances in Oocyte*



- Maturation In Vivo and In Vitro in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/ijms24109059>
- Kelly, M. C., Brown, S. G., Costello, S. M., Ramalingam, M., Drew, E., Publicover, S. J., Barratt, C. L. R., Martins, S., & Silva, D. (2018). Single-cell analysis of [Ca<sup>2+</sup>] i signalling in sub-fertile men: characteristics and relation to fertilization outcome. *Human Reproduction*, 33(6), 1023–1033. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey096>
  - Kierzek, M., Wachten, D., Baumann, A., & Jülich, F. (2021). *Simultaneous recording of multiple cellular signaling events by frequency-and spectrally-tuned multiplexing of fluorescent probes*. <https://www.researchgate.net/publication/357528260>
  - Kennedy CE, Krieger KB, Sutovsky M, Xu W, Vargovič P, Didion BA, Ellersieck MR, Hennessy ME, Verstegen J, Oko R *et al.* (2014) Protein expression pattern of PAWP in bull spermatozoa is associated with sperm quality and fertility following artificial insemination. *Molecular Reproduction Development*; 81:436–449.
  - Kirichok, Y., Navarro, B. & Clapham, D. E. (2006) Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature* 439, 737–740.
  - Kurita, T. (2019). Principal component analysis (PCA). *Computer Vision: A Reference Guide*, 1-4.
  - Lehti, M. S., & Sironen, A. (2017). Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biology of Reproduction*, 97(4), 522–536. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOX096>
  - Li, X., Wu, S., Yu, K., Hou, J., Jiang, C., Li, K., ... & Xu, W. (2021). A dual-site controlled pH probe revealing the pH of sperm cytoplasm and screening for healthy spermatozoa. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(17), 3662-3665.
  - Linares-Hernández, L., Guzmán-Grenfell, A. M., Hicks-Gomez, J. J., and González-Martínez, M. T. (1998). Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1372, 1–12.
  - Lishko, P; Kirichok, Y. (2010) The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *The Journal of Physiology*, 588. 4667-4672
  - Liu, Y., Wang, D.-K., & Chen, L.-M. (2012). The Physiology of Bicarbonate Transporters in Mammalian Reproduction. *Biology of Reproduction*, 86(4). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.111.096826>
  - López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís- López, A., Santi, C. M., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2014). Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction*, 20, 619–629.
  - Luque, G. M., Dalotto-Moreno, T., Martín-Hidalgo, D., Ritagliati, C., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Balestrini, P. A., Schiavi-Ehrenhaus, L. J., Gilio, N., Krapf, D., Visconti, P. E., & Buffone, M. G. (2018). Only a subpopulation of mouse sperm displays a rapid increase in intracellular calcium during capacitation. *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), 9685–9700. <https://doi.org/10.1002/jcp.26883>
  - 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms22010093>
  - Matamoros-Volante, A., & Trevino, C. L. (2020). Capacitation-associated alkalization in human sperm is differentially controlled at the subcellular level. *Journal of Cell Science*, 133(2). <https://doi.org/10.1242/jcs.238816>
  - Matamoros-Volante, A., Moreno-Irusta, A., Torres-Rodríguez, P., Giojalas, L., Gervasi, M. G., Visconti, P. E., & Treviño, C. L. (2018). Semi-automatized segmentation method



using image-based flow cytometry to study sperm physiology: The case of capacitation-induced tyrosine phosphorylation. *Molecular Human Reproduction*, 24(2), 64–73. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax062>

- McInnes, L., Healy, J., & Melville, J. (2018). Umap: Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction. *arXiv preprint arXiv:1802.03426*.
- Mishra, A. K., Kumar, A., Swain, D. K., Yadav, S., & Nigam, R. (2018). Insights into pH regulatory mechanisms in mediating spermatozoa functions. *Veterinary World*, 11(6), 852–858. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.852-858>
- Molina, L. C. P., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A., & Buffone, M. G. (2018). Molecular basis of human sperm capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(July), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00072>
- Molina, L. C. P., Gunderson, S., Riley, J., Lybaert, P., Borrego-Alvarez, A., Jungheim, E. S., & Santi, C. M. (2020). Membrane potential determined by flow cytometry predicts fertilizing ability of human sperm. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 387.
- Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D. *et al.* (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP- dependent pathway. *Development*, 121, 1139–1150.
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A. L., Romero, F., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(3), 1149–1158. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.05.100>
- Nowicka-Bauer, K., & Szymczak-Cendlak, M. (2021). Structure and function of ion channels regulating sperm motility—an overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/ijms22063259>
- OMS (2010). "WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen" Cambridge: Cambridge University. 5<sup>th</sup> Edition. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf)
- OMS (2021) Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Suiza: World Health Organization.
- Panchal, D., Bhagwat, S., & Parte, P. (2022). N-Formyl-L-aspartate mediates chemotaxis in sperm via the beta-2-adrenergic receptor. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 959094.
- Patrat, C., Serres, C., and Jouannet, P. (2002). Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 66, 1775–1780.
- [Pearson, K.](#) (1901). On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space. *Philosophical Magazine*. 2 (11): 559–572. [doi:10.1080/14786440109462720](https://doi.org/10.1080/14786440109462720).
- Peng, W., Wu, Z., Song, K., Zhang, S., Li, Y., & Xu, M. (2020). Regulation of sleep homeostasis mediator adenosine by basal forebrain glutamatergic neurons. *Science*, 369(6508).
- Pérez-Ocampo, D; *et al.* (2022) Estudio de la influencia del potencial de membrana sobre la respuesta a progesterona en espermatozoides de humano. (Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México). TESIUNAM. <http://132.248.9.195/ptd2022/noviembre/0833476/Index.html>
- Ren, D. *et al.* (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603–609.
- Rodriguez, M. Z., Comin, C. H., Casanova, D., Bruno, O. M., Amancio, D. R., Costa, L. da F., & Rodrigues, F. A. (2019). Clustering algorithms: A comparative approach. *PLOS ONE*, 14(1), e0210236. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0210236>
- Ritagliati, C., Baro Graf, C., Stival, C., & Krapf, D. (2018). Regulation mechanisms and

- implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mechanisms of Development*, 154(February), 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.04.004>
- Ruknudin, A., & Silver, I. A. (1990). Ca<sup>2+</sup> uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca<sup>2+</sup> uptake. *Molecular Reproduction and Development*, 26, 63–68.
  - Santiani A, Ugarelli A, Evangelista-Vargas S. (2016) Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging Flow cytometry. *Animal Reproduction Science*;173:49–55.
  - Sengupta, P., Durairajanayagam, D., Agarwal, A. (2020). Fuentes de combustible/energía de los espermatozoides. En: Parekattil, S., Esteves, S., Agarwal, A. (eds) *Male Infertility*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-32300-4\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-030-32300-4_26)
  - S Smaili, S., JS Pereira, G., M Costa, M., K Rocha, K., Rodrigues, L., G do Carmo, L., ... & Hsu, Y. T. (2013). The role of calcium stores in apoptosis and autophagy. *Current Molecular Medicine*, 13(2), 252-265.
  - Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo P, *et al.* (2011) Not All Sperm Are Equal: Functional Mitochondria Characterize a Subpopulation of Human Sperm with Better Fertilization Potential. *PLOS ONE* 6(3): e18112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018112>
  - Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*, 14(6), 647-657.
  - Vazquez, M.; Verón, G. (2018) Laboratory evaluation of sperm-ovum interaction; Elsevier Inc; 5; 98-106.
  - van der Maaten, L; Hinton G. Visualizing data using t-sne. *Journal of Machine Learning Research*, 9(86):2579–2605, 2008. URL <http://jmlr.org/papers/v9/vandermaaten08a.html>
  - Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121, 1129–1137.
  - Visconti, P. E., Ning, X., Fornés, M. W., Alvarez, J. G., Stein, P., *et al.* (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: Cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Developmental Biology*, 214, 429–443.
  - Visconti, P. E., Krapf, D., De La Vega-Beltrán, J. L., Acevedo, J. J., & Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology*, 13(3), 395–405. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.69>
  - Wang, H., McGoldrick, L. L., & Chung, J. J. (2021). Sperm ion channels and transporters in male fertility and infertility. *Nature Reviews Urology*, 18(1), 46–66. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00390-9>
  - Yanamigachi, R. (1994) Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371-372.
  - Zhao, Q., Guo, H., Ruogu, P., Jixiang, L., Liao, J., & Diwu, Z. (2019). New Red Fluorescent Calcium Indicators for Functional Analysis of GPCRs and Ca<sup>2+</sup> Channel Targets. *Biophysical Journal*, 116(3), 240a.
  - Zeng, Y., Clark, E. N., & Florman, H. M. (1995). Sperm membrane potential: Hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida- dependent acrosomal secretion. *Developmental Biology*, 171, 554–563.
  - Zeng, Y., Oberdorf, J. A., & Florman, H. M. (1996). pH regulation in mouse sperm: Identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO<sub>3</sub>(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Developmental Biology*, 173, 510–520.