



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA SOBRE LA
RESPUESTA A PROGESTERONA EN ESPERMATOZOIDES DE HUMANO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Daniel Alberto Pérez Ocampo

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay
Instituto de Biotecnología-UNAM

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay
Instituto de Biotecnología-UNAM

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2022



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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Consorcio de la Fisiología del Espermatozoide del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en Cuernavaca Morelos, bajo la supervisión de la Dra. Claudia Treviño Santa Cruz. El proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA-UNAM IN207122 Daniel Alberto Pérez Ocampo fue Becario de CONACYT, No. CVU:1023581.

Se recibió asesoría y apoyo técnico del Biol. José Luis de la Vega Beltrán, M. en C. Paulina Torres Rodríguez, de la Dra. Yoloxochitl Sánchez Guevara, Dra. Ana González Cota, del M. en C. José Arturo Matamoros Volante y del Sr. Antonio Blancas. Además, se agradece el apoyo de la biblioteca virtual: B.A. Dip.Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth, así como de la unidad de cómputo: Omar Arriaga, Juan Manuel Hurtado, Roberto Rodríguez, David Castañeda y Arturo Ocadiz.

Agradezco la asesoría de la Dra. Roberta Salinas Marín y en general a los miembros del Laboratorio Nacional para la Producción y Análisis de Moléculas y Medicamentos Biotecnológicos (LAMMB) así como su disposición en el uso del equipo de citometría de flujo y de sus instalaciones

Agradezco a los miembros del Comité Tutoral: Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay y la Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay por su importante aportación en el desarrollo de este proyecto y a mi tutora la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz por guiarme y darme la oportunidad de desarrollar este trabajo bajo su dirección.

Al consorcio de fisiología del espermatozoide: al Dr. Alberto Darszon, Dr. Takuya Nishigaki, la Dra. Carmen Beltrán, el Dr. Julio Cesar Chávez, por sus observaciones que fueron vitales para la realización de ajustes al protocolo planteado y por su disposición a escucharme en cada ocasión.



Índice general

Índice general	3
Abreviaturas	1
I. Resumen	2
II. Summary	2
III. INTRODUCCIÓN	3
1. EL ESPERMATOZOIDE	4
1.1. ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE	4
1.2. LA CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE	5
1.3. HIPERACTIVACIÓN DE LA MOVILIDAD	6
1.4. LA REACCIÓN ACROSOMAL	7
1.5. CATSPER	8
IV. ANTECEDENTES	11
V. HIPÓTESIS	13
VI. OBJETIVOS	14
1. Objetivo general	14
2. Objetivos Particulares	14
VII. Materiales y métodos:	14
1. MATERIALES	14
2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	15
2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	15
2.2. ADQUISICIÓN DE DATOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	16
2.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA	18
2.4. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A Pg	19
2.5. DETERMINACIÓN DE LA $[Ca^{2+}]_i$ DURANTE LA CALIBRACIÓN DEL Em.	21
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
VIII. RESULTADOS	22
1. LA Pg INDUCE UN INCREMENTO $[Ca^{2+}]_i$ DESDE 1 μ M	22
2. LA ALBÚMINA DE SUERO BOVINO SUPRIME EL EFECTO DE LA IONOMICINA.	23
3. EFECTO DE LA CENTRIFUGACIÓN EN EL ESPERMATOZOIDE	24
4. EL INCREMENTO DE $[Ca^{2+}]_i$ INDUCIDO POR Pg ES MAYOR A MEDIDA QUE LA CAPACITACIÓN AVANZA	26
5. LA Pg INDUCE UNA HIPERPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.	29

6.	LA HIPERPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA ES MAYOR A MEDIDA QUE AVANZA LA CAPACITACIÓN.	30
7.	DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE POTENCIAL DE MEMBRANA Y MONITOREO DE LA $[Ca^{2+}]_i$ EN ESPERMATOZOIDES DE HUMANO	33
8.	LA INHIBICIÓN DE CATSPER PROVOCA UN EFECTO RETARDANTE SOBRE LA HIPERPOLARIZACIÓN DEPENDIENTE DE CAPACITACIÓN	36
9.	¿ES EL CANAL SLO3 EL PRINCIPAL RESPONSABLE DE LA HIPERPOLARIZACIÓN EN ESPERMATOZOIDES DE HUMANO?	39
IX.	DISCUSIÓN	40
X.	CONCLUSIONES	45
XI.	PERSPECTIVAS	46
XII.	REFERENCIAS	46

Índice de figuras

Figura 1. Esquema general del espermatozoide humano.

Figura 2. Movilidad del espermatozoide de mamífero.

Figura 3. Modelo esquemático de la regulación de la actividad de Catsper.

Figura 4. Esquema de la regulación de Catsper durante capacitación.

Figura 5. Adquisición de datos mediante citometría de flujo en espermatozoides de humano.

Figura 6. Esquema general de la estrategia experimental.

Figura 7. Medición de los valores absolutos del potencial de membrana (E_m) en espermatozoides de humano.

Figura 8. Registro de la respuesta a Pg por citometría de flujo.

Figura 9. Curva dosis-respuesta de progesterona en espermatozoides de humano en condiciones capacitantes.

Figura 10. La ASB suprime el efecto de la ionomicina.

Figura 11. La centrifugación repolariza la membrana plasmática de los espermatozoides.

Figura 12. El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por progesterona es mayor a medida que avanza la capacitación.

Figura 13. Aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Pg provoca una hiperpolarización de la membrana plasmática.

Figura 14. Cinética del comportamiento del E_m durante capacitación en espermatozoides de humano.

Figura 15. Análisis Multiparamétrico de la determinación del E_m y dinámica $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de humano.

Figura 16. La hiperpolarización dependiente de capacitación requiere de la participación de Catsper.

Figura 17. La hiperpolarización dependiente de capacitación influye en la activación de Catsper por Pg.

Figura 18. El canal Slo3 es el principal responsable de la hiperpolarización dependiente de capacitación.

Abreviaturas

ASB --- Albúmina de Suero Bovino	μM --- Micromolar
AMPc ---Adenosín monofosfato cíclico	μl ---Microlitro
ATP --- Adenosina trifosfato	Na⁺ ---Ion sodio
BaCl²⁺ - Cloruro de bario	pH ---Potencial de Hidrógeno
Ca²⁺ -----Ion Calcio	pHi ---Potencial de Hidrógeno intracelular
[Ca²⁺]_i --Concentración de calcio Intracelular	Pg ---Progesterona
CAP ---Capacitados	RA -----Reacción Acrosomal
Catsper ---Canal catiónico específico del espermatozoide	SEM ---- Error estándar de la media
Cl⁻ -----Ion cloro	SSC-A ---Área de dispersión lateral
Em --- Potencial de membrana plasmática	ZP -----Zona pelúcida
Fluo3 —Fluo3-AM	
FSC-A -----Área de dispersión Frontal	
FSC-H ----Altura de dispersión Frontal	
HCO₃⁻ --- Ion Bicarbonato	
HTF -----Human Tubal Fluid	
K⁺ ---Ion potasio	
KCl --- Cloruro de potasio	
kDa --- Kilodaltones	
M --- Molar	
Mg ---Miligramos	
mM ---Milimolar	
MnCl₂ -----Cloruro de Manganeso	
MP ---Membrana plasmática	
Mv ---Milivoltios	
[Na²⁺]_i ---Concentración de sodio Intracelular	
NC ---- No capacitante	

I. Resumen

La fecundación es un proceso que involucra la fusión de los gametos sexuales, el óvulo y el espermatozoide. El espermatozoide es incapaz de fecundar al óvulo después de la eyaculación, para eso necesita experimentar un segundo proceso de maduración llamado capacitación, este proceso ocurre durante su viaje por el tracto reproductor femenino donde experimentará cambios bioquímicos y fisiológicos entre los cuales incrementa la $[Ca^{2+}]_i$, y ocurre una hiperpolarización del potencial de membrana (E_m). Estos parámetros junto con la progesterona (Pg) modulan la actividad de Catsper (el principal canal de Ca^{2+} del espermatozoide). Actualmente, no está del todo claro cómo es la relación entre estos tres parámetros durante la capacitación, además, de su interacción durante regulación de la actividad de Catsper. Con esta idea en este trabajo evaluamos si existe una relación entre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Pg y la hiperpolarización de la membrana plasmática que ocurre durante capacitación, para eso empleando citometría de flujo realizamos medidas simultáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ y del E_m , aplicando un estímulo de Pg y, por separado, para saber el valor de E_m , calculamos el potencial de membrana absoluto en espermatozoides de humano a distintos tiempos de capacitación.

Encontramos que tanto el incremento $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Pg como la hiperpolarización dependiente de capacitación alcanzan su máximo después de 2 y 3 horas respectivamente, presentando cambios importantes desde el primer momento que los espermatozoides se encuentran con el medio capacitante (Cap0). Además, al monitorear el cambio del E_m durante la respuesta a Pg observamos que la entrada de Ca^{2+} , está acompañada de una hiperpolarización, tal vez provocado por el canal de K^+ Slo3 el principal responsable de la hiperpolarización dependiente de capacitación en el espermatozoide de humano, que se sabe es regulado por Ca^{2+} , dicha hiperpolarización se hace más intensa a medida que la capacitación avanza hasta alcanzar el punto más alto a las 2 horas de capacitación, al igual que el Ca^{2+} . Por otro lado, al monitorear la Fluorescencia de Fluo 3-AM(Fluo3) durante la determinación del potencial de membrana observamos que los pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes provocados durante el registro afectan el comportamiento de la $[Ca^{2+}]_i$, además, también observamos que los incrementos de Ca^{2+} provocados son dependientes de capacitación y obedecen un comportamiento tiempo-dependiente. También descubrimos que al exponer a los espermatozoides a centrifugación estos incrementos de Ca^{2+} son eliminados y la población de espermatozoides sufre una “repolarización” a valores cercanos a la condición no capacitante (NC), esta observación es muy importante ya que es algo que no se toma en cuenta en trabajos relacionados.

En este trabajo empleamos herramientas farmacológicas para identificar las entidades moleculares que participan en la regulación del E_m y de la respuesta a Pg. Se encontró que la Hiperpolarización dependiente de capacitación requiere de la participación del canal Slo3, y que dicha hiperpolarización al ser inhibida reduce significativamente la respuesta a Pg (~40%). Además, nuestros resultados sugieren que Catsper tiene influencia sobre la hiperpolarización ya que al bloquearlo se impide la hiperpolarización cerca de un 50%. Nuestros resultados obtenidos sugieren que existe un sistema de regulación entre la dinámica del Ca^{2+} intracelular y el E_m durante capacitación, mediado principalmente por los canales Catsper y Slo3.

II. Summary

Fertilization is a process that involves the fusion of the sexual gametes, the egg and the sperm. The sperm is unable to fertilize the egg after ejaculation, to obtain this capacity it must undergo a final maturation process called capacitation, which takes place during its journey through the female reproductive tract several biochemical and physiological changes occur during this process, like an uptake in $[Ca^{2+}]_i$, and a hyperpolarization of the membrane potential (E_m). These parameters as well as progesterone (Pg) modulate the activity of Catsper (the main Ca^{2+} channel present in sperm). Currently, it is not entirely clear the connections among these three parameters during capacitation, and their interaction on the regulation of Catsper activity. Taking this into consideration, in this work we evaluated if there is connection between $[Ca^{2+}]_i$ rise in response to Pg and the capacitation-dependent hyperpolarization, using flow cytometry we performed simultaneous measurements of the $[Ca^{2+}]_i$ and E_m , stimulating with Pg and, separately, to know the E_m value, we determine the absolute membrane potential in human spermatozoa at different capacitation times.

We found that both the $[Ca^{2+}]_i$ rise induced by Pg and the capacitation-dependent hyperpolarization reach their maximum after 2 and 3 hours, respectively. In addition we observed an important changes at the very first moment that the sperm have contact with the capacitating medium (Cap0). In addition, when monitoring the change in E_m during the response to Pg, we observed that the rise of $[Ca^{2+}]_i$ comes with a hyperpolarization, probably via by the activation of K^+ channel Slo3, the main channel responsible for capacitation-dependent hyperpolarization in human sperm, according to our results this channel is Ca^{2+} sensitive, this hyperpolarization is higher as capacitation time increases, reaching their maximum at 2 hours of capacitation, as well as Ca^{2+} . On the other hand, when monitoring the Fluorescence of Fluo 3-AM(Fluo3) during E_m determination, we observed that the hyperpolarizing and depolarizing pulses caused during the determination, affect the levels of $[Ca^{2+}]_i$ and we noticed that this changes are capacitation-dependent, and follow a time-dependent behavior too. We also discovered that by exposing the sperm to centrifugation, these increases in $[Ca^{2+}]_i$ are eliminated and the sperm population undergoes a "repolarization" to values close to the non-capacitating condition (NC). This observation is very important because it is not considering in related works.

In this work, pharmacological tools were used to identify the molecular entities involved in the regulation of E_m and the response to Pg. It was found that capacitation-dependent hyperpolarization requires the participation of the Slo3 channel, we also observed that by inhibiting hyperpolarization, significantly reduces the $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by Pg (~40%). In addition, our results suggest that Catsper has an influence on hyperpolarization since blocking Catsper the hyperpolarization is reduced in about 50% compared with the control samples. Our results suggest that there is regulation feedback between the dynamics of intracellular Ca^{2+} and E_m during capacitation, mediated by the Catsper and Slo3 channels.

III. INTRODUCCIÓN

El objetivo más importante de todo organismo es reproducirse y dejar una progenie con su información genética. El éxito reproductivo depende de un proceso llamado fecundación (en organismos con reproducción sexual). Este es un evento complejo en el cual participan células especializadas llamadas gametos, el espermatozoide (gameto masculino) y el óvulo (gameto femenino), los cuales se fusionan para dar origen a un nuevo organismo con un genoma distinto a los de sus progenitores (madre y padre). Sin embargo, antes de que ocurra esta fusión ambos gametos deben pasar por distintas etapas de maduración hasta ser células completamente diferenciadas. Además, el espermatozoide una vez maduro deberá adquirir su capacidad fecundante, a través de una serie de modificaciones fisiológicas durante su viaje por el tracto reproductor femenino en un proceso llamado capacitación (Austin,1952). En este trabajo estudiamos algunas de estas modificaciones que son cruciales para el buen funcionamiento espermático.

1. EL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula altamente diferenciada, resultado de la maduración final en un proceso denominado espermatogénesis, en dicho proceso un tipo de células germinales llamadas espermatogonias maduran hasta formar espermaticitos primarios, estos a su vez experimentan una primera división meiótica para formar espermaticitos secundarios y luego en una segunda división meiótica se forman las espermátidas, las cuales son células haploides, finalmente las espermátidas se diferencian hasta formar espermatozoides (Ganong *et. al.*, 2010)

1.1. ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula altamente compartimentalizada (Figura 1). Consta de un flagelo, que se divide en pieza media, pieza principal y pieza terminal, el cual está encargado de la movilidad de la célula, y de la cabeza, donde se encuentra compactado el ADN en el núcleo, el cual está rodeado por una vesícula llamada acrosoma (Ritagliati *et. al.*, 2018). Entregar el material genético contenido en la cabeza al ovocito es el único objetivo del espermatozoide.

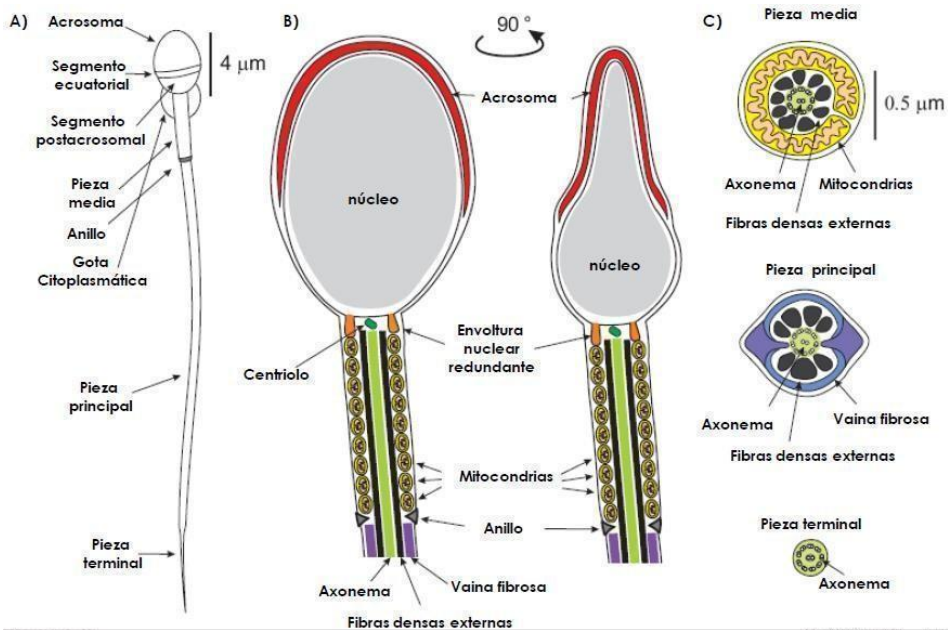


Figura 1. Esquema general del espermatozoide humano. **A)** Cuerpo completo del espermatozoide humano conformado de una cabeza redondeada y un flagelo. El flagelo se divide en pieza media, pieza principal y pieza terminal. **B)** Acercamiento a la sección de la cabeza del espermatozoide humano vista desde dos ángulos diferentes, donde se observa que el núcleo ocupa la mayor parte de la cabeza, el cual se encuentra rodeado por el acrosoma, el centriolo y la envoltura nuclear redundante se encuentran en la base de la cabeza, y en la pieza media se encuentran las mitocondrias. El axonema está rodeado por las fibras externas densas en la pieza media y la pieza principal. **C)** Corte transversal del flagelo, donde el axonema, el aparato motor del flagelo, se localiza en el centro y a lo largo de todo el flagelo, está rodeado por las mitocondrias y fibras densas externas en la pieza media, mientras que en la pieza principal está rodeado por las fibras densas externas y por una vaina fibrosa, la pieza final sólo contiene el axonema (Modificado de Darszon et al., 2011).

1.2. LA CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

Los espermatozoides de mamífero no son capaces de fecundar al óvulo inmediatamente después de ser eyaculados, estos adquieren esa capacidad durante su migración por el tracto reproductor femenino, en un proceso de maduración llamado capacitación (Darszon *et al.*, 2011). La capacitación permite que ocurran en el espermatozoide, dos eventos esenciales para la fecundación: la hiperactivación de la movilidad (desarrollo de una movilidad vigorosa con un batido flagelar asimétrico) y la posibilidad de experimentar la reacción acrosomal (RA). Durante la capacitación el espermatozoide sufrirá cambios en su fisiología, tales como: cambios en la composición de la membrana plasmática (MP), activación de cascadas de fosforilación, alcalinización de pHi, a través de diferentes entidades moleculares entre los que destacan, el canal Hv1 (en espermatozoide de humano), intercambiadores $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ entre otros (Chávez *et al.*, 2014), aumento en la permeabilidad al Ca^{2+} (a través de un canal de calcio como el canal específico del espermatozoide llamado Catsper), además, ocurre una hiperpolarización de la MP (provocada principalmente por un canal de K^+ específico del

espermatozoide llamado Slo3 en ratón y humano y con la posible contribución de Slo1 en espermatozoide de humano.

1.3. HIPERACTIVACIÓN DE LA MOVILIDAD

Los espermatozoides de mamíferos adquieren la capacidad de movilidad una vez que se depositan en el tracto reproductor femenino ya que al final de su maduración en el aparato reproductor masculino se mantienen inmóviles. La movilidad inicial, presenta un batido flagelar simétrico con baja curvatura y un nado progresivo, a la cual se le conoce como movilidad activada. Sin embargo, a medida que avanzan en el tracto reproductor femenino esta movilidad se caracteriza por presentar un aumento en la amplitud del batido flagelar, originándose trayectorias con un mayor desplazamiento lateral de la cabeza, que se conoce como motilidad hiperactivada (Figura 2A) (Suarez, 2008). La hiperactivación de la movilidad es un proceso vital en el proceso de fecundación que se dispara por Ca^{2+} (Suarez *et. al.*, 1993, Darszon *et al.*, 2011,) por lo que la participación de canales de Ca^{2+} (por ejemplo, Catsper) que modulen cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ juegan un papel vital en la regulación de la hiperactivación.

La importancia de la hiperactivación de la movilidad radica en que ésta le confiere al espermatozoide la capacidad de desplazarse progresivamente en fluidos viscosos, como el que se encuentra en el tracto reproductor femenino (Figura 2B), permitiéndole avanzar a lo largo del epitelio oviductal, además que le permite penetrar las células del cumulus y la zona pelúcida que rodean al ovocito y así tener la posibilidad de fecundarlo (Darszon *et. al.*, 2011) (Figura 2B). Por otro lado, experimentos utilizando ratones transgénicos nulos a una de las subunidades de Catsper (Quill *et al.*, 2003), demostraron que, por defectos en la movilidad, los espermatozoides son incapaces de fecundar ovocitos, esto se atribuyó a la incapacidad de las células de iniciar la hiperactivación de la movilidad.

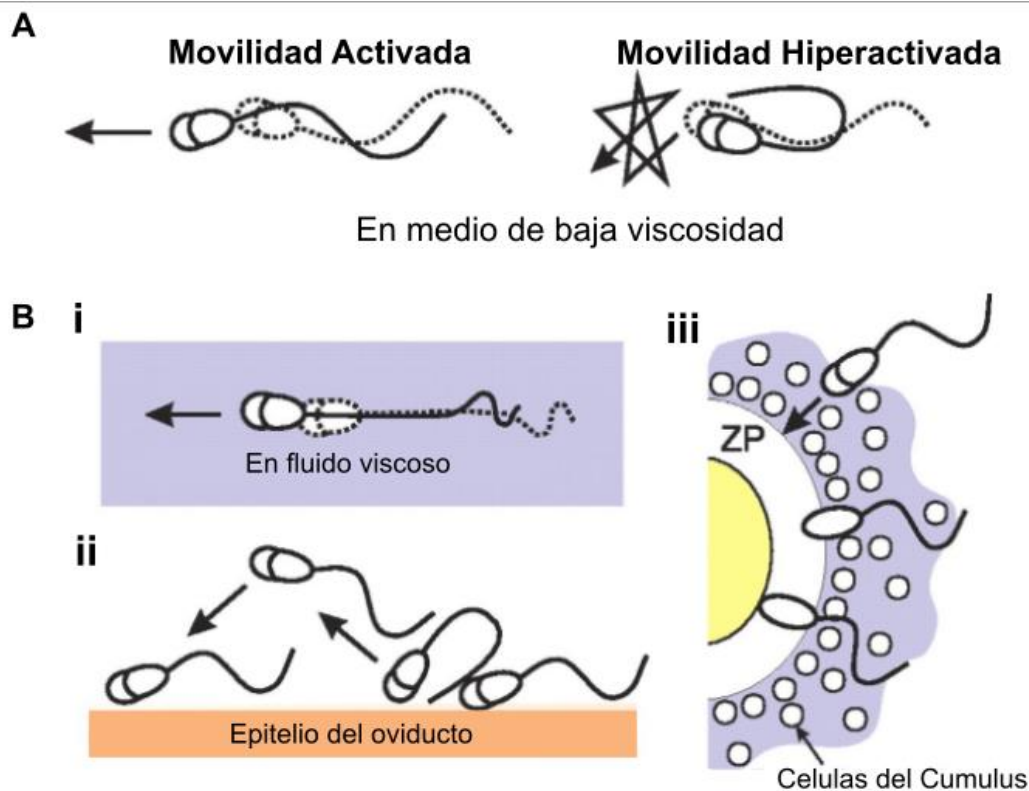


Figura 2. Movilidad del espermatozoide del mamífero. **A)** Movilidad activada (izquierda) e hiperactivada (derecha). La forma flagelar y la dirección de la motilidad se muestra con las flechas, estos tipos de motilidad son los que experimentan los espermatozoides en condiciones experimentales con baja viscosidad. **B)** Importancia de la motilidad hiperactivada de los espermatozoides: i) avanzar en la alta viscosidad del tracto genital femenino de manera más eficiente que el espermatozoide con motilidad activada, ii) poder separarse de los espermatozoides del reservorio (istmo) y avanzar hacia el útero (sitio de la fertilización) y iii) facilita la penetración de los espermatozoides a través de las células del cumulus y la ZP (modificada de Darszon et. al., 2011).

1.4. LA REACCIÓN ACROSOMAL

La RA es un evento único de exocitosis, que involucra la liberación del contenido de una vesícula llamada acrosoma. Esta vesícula está localizada en la cabeza del espermatozoide rodeando la parte apical del núcleo (en humano), está conformada por la membrana acrosomal interna y la membrana acrosomal externa y en su interior contiene enzimas hidrolíticas que le facilitarán la penetración de la ZP del óvulo, para finalmente entrar en contacto con la membrana plasmática del óvulo y fecundarlo .

La RA involucra la fusión en múltiples puntos entre la membrana acrosomal externa y la MP, esto provoca la liberación del contenido acrosomal y la exposición de una nueva membrana

producto de esta fusión (Mayorga *et. al.*, 2007). En el laboratorio se puede inducir la RA de forma artificial utilizando ionóforos de Ca^{2+} tales como A23187 o Ionomicina. Estas moléculas son de características hidrofóbicas y permiten el intercambio de H^+ , por Ca^{2+} , incrementándolo al interior celular y desencadenando la RA. Por otro lado, podemos emplear inductores fisiológicos como la Pg la cual provoca un influjo de Ca^{2+} a través del canal Catsper, entre otros, que desencadena la RA (Linares *et. al.*, 1998). Cabe destacar que la inducción de la RA con Pg, solo se observa en aquellas células incubadas en medio que promueva la capacitación, es decir en células capacitadas, además la eficiencia de inducción de los ionóforos también aumenta en células capacitadas (De La Vega-Beltrán *et al.*, 2012).

1.5. CATSPER

Una vez que los espermatozoides inician la carrera por fertilizar al óvulo, se enfrentan a cambios en el ambiente, entre los que se encuentran cambios en el pH y en la viscosidad del medio. Los espermatozoides adaptan su nado con el fin de avanzar progresivamente, este cambio en la movilidad como ya se mencionó anteriormente, se le denomina hiperactivación de la movilidad. La principal entidad molecular responsable de este proceso es el canal de cationes del espermatozoide o Catsper (Qui H. *et. al.*, 2007). Catsper es un canal permeable a Ca^{2+} localizado en la pieza principal del flagelo y es un complejo multimérico (Figura 3A) sensible a pH y a cambios en el potencial de membrana.

Catsper es esencial para la motilidad y fertilidad espermática, es el principal responsable de la permeabilidad del espermatozoide a Ca^{2+} (Kirichok *et al.*, 2006, Lishko *et al.*, 2010). Está constituido por al menos 10 subunidades; CatSper 1-4 que son las subunidades formadoras del poro del canal, además de subunidades accesorias: CatSper β , CatSper γ , CatSper δ , CatSper ϵ , y CatSper ζ , EFCAB y CD2CD6 (Yang *et. al.*, 2022). Cabe resaltar que recientemente Lin *et al.* 2021, empleando microscopía electrónica criogénica describieron nuevas proteínas asociadas al complejo, tales como SLCO6C1, además de nuevas subunidades como CatSper η y TMEM249 (Lin *et al.*, 2021). El Complejo Catsper está organizado de forma cuadrilateral en nano dominios longitudinales en un patrón en zigzag de 4 líneas a lo largo de la pieza principal del flagelo (Figura 3A), esto propicia la eficiente propagación de la señal de Ca^{2+} a lo largo del flagelo al sincronizar la apertura del complejo (Zhao Y. *et. al.*, 2021).

Este canal es importante para la fertilidad espermática ya que mutaciones sobre alguna de

las subunidades formadoras de poro CatSper1– 4 o de la subunidad accesoria Catsper δ han resultado ser indispensables para el correcto funcionamiento del canal y generan espermatozoides incapaces de fecundar tanto en ratones como en humanos (Ren *et al.*, 2001).

Como ya se mencionó Catsper es un canal sensible a pH y al voltaje, por otro lado, Catsper se activa indirectamente por Pg, una hormona esteroidea liberada por las células del cumulus en el tracto reproductor femenino humano. La lipasa ABHD2 funge como el receptor flagelar de la Pg, la cual activa a la lipasa, hidrolizando inhibidores endógenos de Catsper, específicamente los endocannabinoides 1AG/2AG (Miller *et al.*, 2016), permitiendo así la activación de Catsper. El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ provocada por Catsper, desencadena la hiperactivación de la movilidad (también podría participar en la quimiotaxis), este incremento de Ca^{2+} , también se detecta en la cabeza del espermatozoide por lo que se ha propuesto que también contribuye a desencadenar la RA (evento dependiente de Ca^{2+}) (Lishko *et al.*, 2011). En la figura 3B se muestra un modelo (Rahban R., *et.al.*, 2021) que ejemplifica lo anteriormente mencionado. En el modelo se ilustran los moduladores de Catsper (pH, Em, y Pg) sin embargo, aún no es claro la retroalimentación que pudiera ocurrir entre ellos a medida que avanza la capacitación. A la fecha, no hay información sobre cómo la actividad de Catsper en respuesta a Pg, podría cambiar a diferentes valores de pH o Em, cambios que fisiológicamente ocurren durante la capacitación.

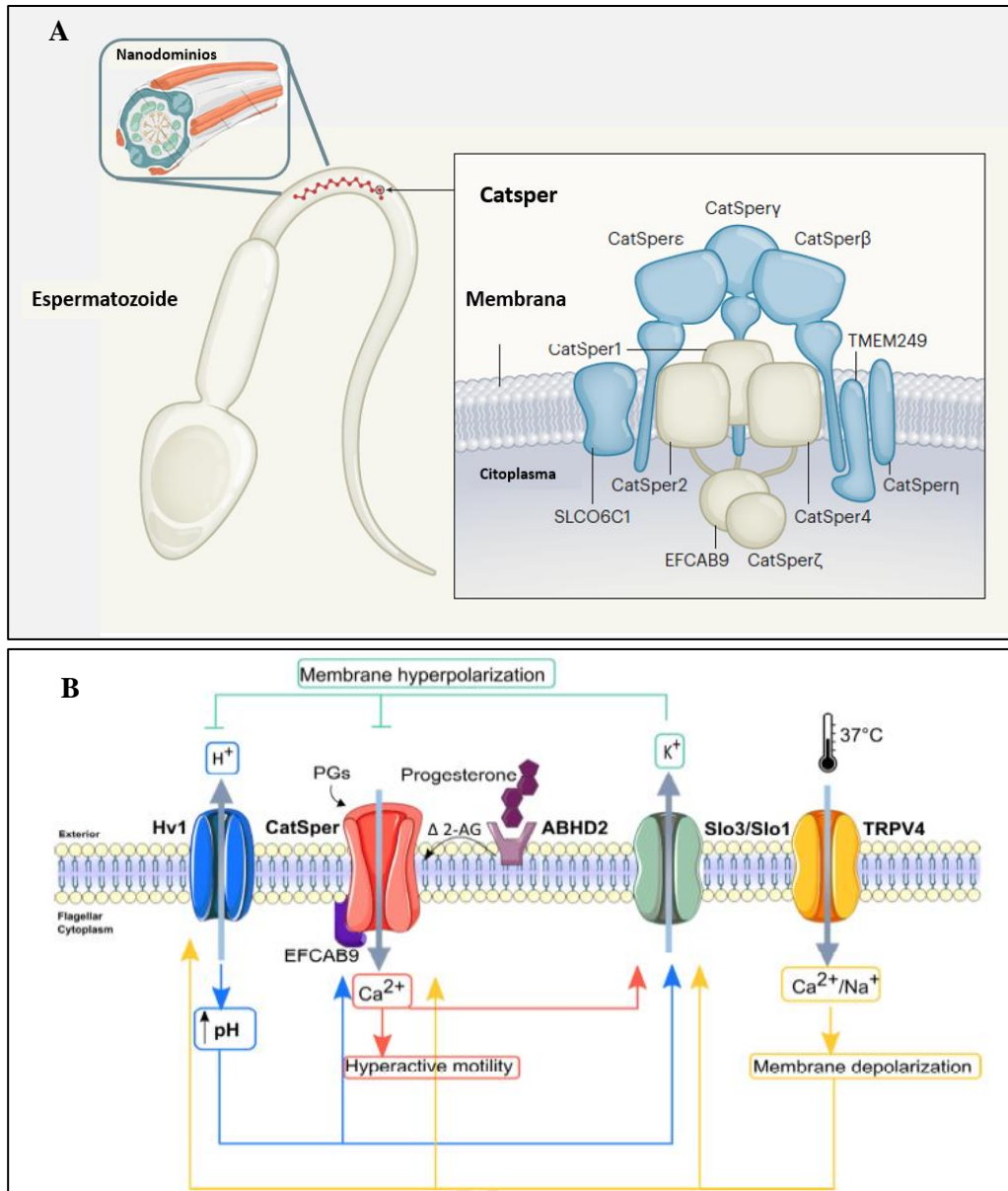


Figura 3. Modelo de la regulación de la actividad de Catsper. **A)** Estructura topológica de Catsper, se representan 6 estructuras transmembranales además de sus subunidades accesorias. **B)** La regulación de Catsper en espermatozoides de humano; Catsper es activado por 3 vías: 1) despolarización de la membrana plasmática, 2) alcalinización intracelular y 3) presencia de Pg. durante el viaje de los espermatozoides al sitio de la fertilización, se exponen a una temperatura elevada (37 °C) la cual induce la activación del canal de sodio TRPV4, que produce la despolarización de la membrana. Dicha despolarización activa al canal Hv1 y Catsper, lo que lleva la salida de protones por parte de Hv1 y una mayor activación de Catsper debido a la alcalinización intracelular. Además, De manera significativa, la Pg (activador fisiológico de Catsper) se une a ABHD2 y libera la inhibición de Catsper por 2-AG, promoviendo la entrada de calcio, por otro lado, la salida de potasio también es promovida por la actividad de TRPV4, Hv1 y por Catsper a través del canal de potasio

Slo3 (también llamado KSper) provocando una hiperpolarización (A: modificada de Clapham y Hulse 2021, B:Rahban R. *et. al.*, 2021).

IV. ANTECEDENTES

Como ya se mencionó, la capacitación está asociada a cambios en el Em y en el pHi, ambos parámetros, son moduladores de Catsper además de la Pg (Figura 4A). Actualmente, no está del todo claro cómo es la relación entre estos tres moduladores y de su participación en la activación de Catsper durante la capacitación.

Referente al pHi, si bien se sabía que aumenta durante capacitación, solo recientemente nuestro grupo reportó una cinética del cambio de pHi durante la capacitación, en ella se determinó el porcentaje de células que presentaban valores de pH más alcalinos, a distintos tiempos de capacitación (0-240 min.), en tres diferentes regiones subcelulares del espermatozoide (cabeza, pieza principal y pieza media). Determinaron un incremento en el porcentaje de células con valor de pHi más alcalino en la región de la cabeza y la pieza principal del flagelo, que llegó a su máximo a los 30 minutos de incubación en medio capacitante (Figura 4B; Matamoros-Volante y Treviño, C., 2020). Con respecto al Ca^{2+} , Brukman y colaboradores (2019) registraron los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ durante 6 horas de capacitación, reportaron que después de las dos primeras horas de capacitación ya no hay incrementos significativos en la $[Ca^{2+}]_i$ (sin estimular con Pg) (Figura 4C). Finalmente, con respecto al Em, Baro y colaboradores en 2020, empleando fluorimetría determinaron el Em en espermatozoides de humano durante 1, 3 y 5 hrs de capacitación, obteniendo valores que van desde -30mV al inicio de la capacitación a -45 mV al finalizar. Sin embargo, la fluorimetría es una técnica que no permite separar células vivas de muertas, por lo que el valor obtenido refleja el promedio de toda la población. Por otro lado, López-González y colaboradores en el 2014 determinaron el porcentaje de hiperpolarización en espermatozoides de humano por citometría de flujo empleando la sonda potenciométrica DiSC₃(5) y yoduro de propidio (IP) para descartar la población no viable. Observaron que sólo una subpoblación de espermatozoides se hiperpolariza durante la capacitación y que un porcentaje (~10%) de células están muertas al momento de la determinación. Otros trabajos solo contemplan valores de punto final, es decir valores antes y después de la capacitación (entre 6 y 24 horas de capacitación) (Moreno-Irusta A. *et. al.*, 2019). Por ejemplo, Muñoz-Garay C. y colaboradores reportaron en espermatozoides de ratón, un valor promedio de -30mV y -60mV para antes y después de la capacitación, respectivamente.

Con el fin de establecer la regulación entre Catsper y la hiperpolarización asociada a la capacitación, mediada por Slo3, dado que los ratones nulos a este canal no se hiperpolarizan durante capacitación, Chávez y colaboradores mostraron en 2014, que espermatozoides de ratones nulos a Slo3 son incapaces de incrementar su $[Ca^{2+}]_i$ tras una depolarización inducida por K^+ , evento que sí ocurre en ratones silvestres. Dicha respuesta se rescata hiperpolarizando artificialmente con valinomicina (un ionóforo de K^+) o incrementando el pH extracelular (que en turno alcaliniza el pH*i*). Estos resultados muestran la importancia del Em y del pH*i* en la activación de Catsper en espermatozoides de ratón. En este trabajo proponemos medir la cinética de los cambios de Em durante la capacitación y explorar cómo se relacionan con el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Pg. Dado que contamos con los datos cinéticos del cambio de pH*i*, con esta información podemos contribuir a entender la activación del canal Catsper por sus diferentes moduladores y contribuir a aclarar las discrepancias en los modelos existentes. Si bien todos los modelos convergen en que la activación de Catsper se regula a través de sus tres moduladores principales (Em, pH*i* y Pg) la secuencia de la participación de las diferentes entidades moleculares, difiere importantemente entre ellos y en ningún caso se toma en cuenta la cinética de los cambios de los distintos moduladores durante la capacitación.

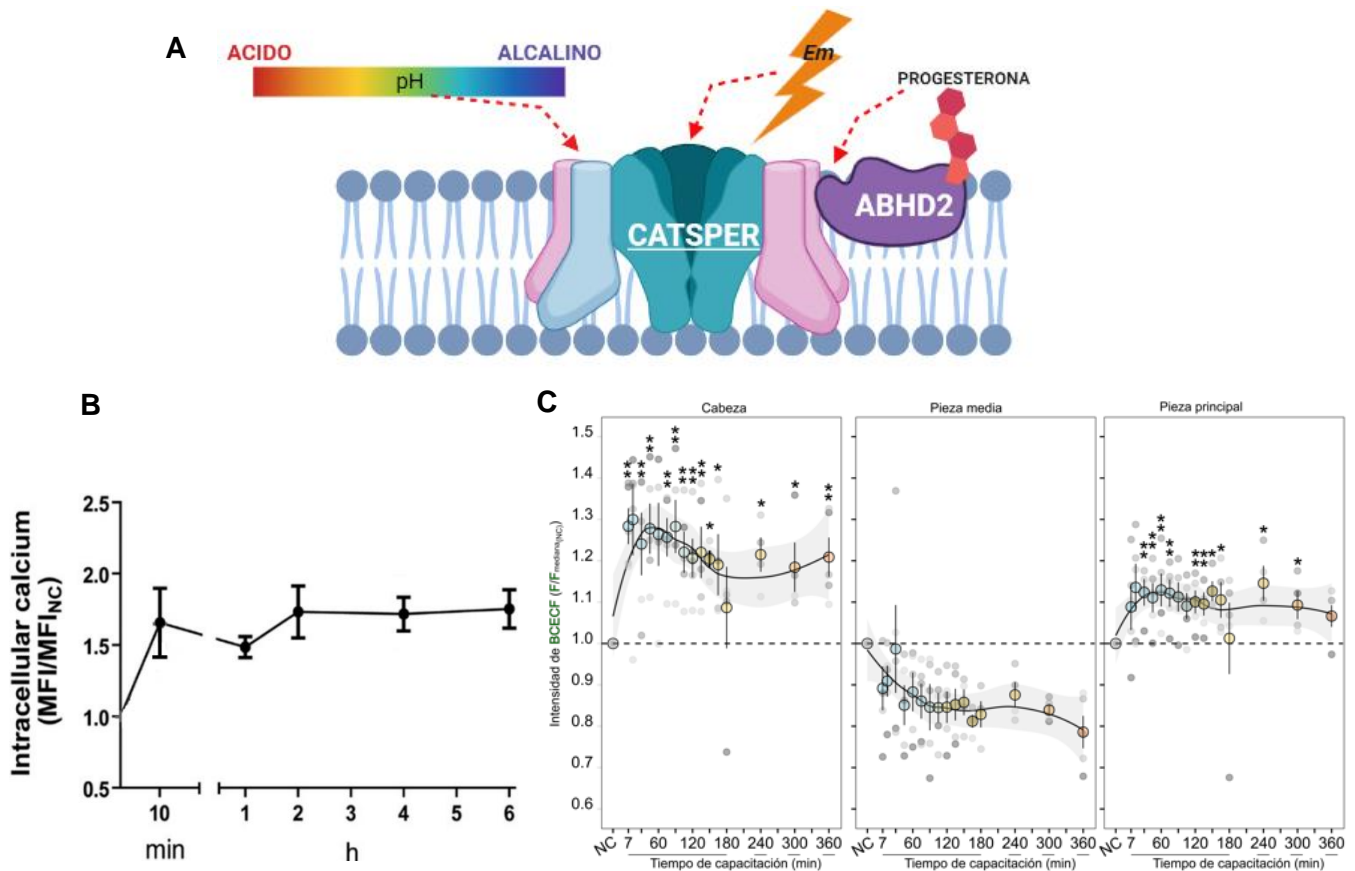


Figura 4. Esquema de la regulación de Catsper durante capacitación **A)** La regulación de Catsper en espermatozoides de humano; es activado por 3 vías. 1) despolarización de la membrana plasmática, 2) alcalinización intracelular y 3) presencia de Pg. **B)** Cinética del comportamiento de la $[Ca^{2+}]_i$ durante la capacitación (Modificado de Brukman *et. al.*, 2019). **C)** Cinética del cambio de fluorescencia del colorante BCECF en la cabeza, pieza media y pieza principal de espermatozoides de humano, dicho cambio se traduce como una alcalinización o acidificación de dicha región subcelular si incrementa o disminuye la fluorescencia respectivamente tomando como punto inicial los valores de células no capacitadas, cada punto gris corresponde al valor obtenido en un experimento independiente y las de color el promedio de cada tiempo de capacitación. (Matamoros-Volante y Treviño C., 2020).

El estudio de E_m se ha realizado con el empleo de diferentes métodos como registros de corriente por patch-clamp y microscopía (Brown *et. al.*, 2016; Kelly *et. al.*, 2018), que nos arrojan valores muy precisos, sin embargo, sólo permiten obtener información de una o muy pocas células a la vez. Aunque existen métodos que nos permiten determinar el E_m a nivel de población, como la espectrofluorometría, lo que se obtiene es un promedio de las respuestas de toda la población de células, por lo que se pierde información cuando la población es heterogénea y además no podemos descartar a las células muertas. Estas limitaciones han llevado al desarrollo de protocolos que nos permitan solventarlas, un ejemplo es el empleo de la citometría de flujo donde se obtiene información a nivel de célula única, pero en número grande de células, y además permite la evaluación de múltiples parámetros. En el caso del presente trabajo, se pueden medir las respuestas del E_m y de Ca^{2+} simultáneamente. Los citómetros convencionales operan con sistemas presurizados para la absorción de la muestra, lo que imposibilita registrar las respuestas a un estímulo en tiempo real, es decir, sin interrumpir la adquisición. El citómetro **BD Accuri C6 plus**, es una opción que soluciona esta limitación, ya que opera con una bomba peristáltica, eliminando la necesidad de generar vacío. Además, Matamoros-Volante y colaboradores en 2020 desarrollaron una metodología utilizando este equipo, donde registraron parámetros de pH, E_m , y Ca^{2+} en el espermatozoide humano, obteniendo resultados similares a los obtenidos con los métodos convencionales. Utilizando esta metodología podremos monitorear la respuesta a Pg a diferentes tiempos de capacitación calibrando el E_m de forma simultánea.

V. HIPÓTESIS

El aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Pg se correlaciona el cambio del E_m durante la capacitación.

VI. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Determinar la relación entre los cambios de E_m que ocurren en el proceso de capacitación y el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Pg en espermatozoides humanos.

2. Objetivos Particulares

- Medir el valor de potencial de membrana durante la capacitación.
- Cuantificar el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Pg durante la capacitación.
- Realizar medidas simultáneas del incremento del $[Ca^{2+}]_i$ y E_m durante la capacitación.
- Determinar el cambio en el E_m en respuesta Pg
- Determinar cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a cambios en el E_m durante la calibración

VII. Materiales y métodos:

1. MATERIALES

Los reactivos Yoduro de propidio (IP), 3,3'-dipropiltiadicarbocianina (DiSC₃(5)) y Fluo3 se obtuvieron de ThermoFisher Scientific, la Ionomicina de Alomone Labs, KCl, MnCl₂, Pg y las sales para preparar el medio de fluido tubárico humano (HTF, por sus siglas en inglés) de Sigma Aldrich. Todas las soluciones Stock se prepararon en Dimetil sulfóxido (DMSO), exceptuando KCl y MnCl₂, los cuales se prepararon en agua y se diluyeron en medio HTF antes de cada experimento al igual que las soluciones en DMSO. El medio HTF se preparó

en agua destilada y filtrada, con la siguiente composición en mM: NaCl₂, 120; KCl, 4; NaHCO₃, 15; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; piruvato de sodio, 1; L-lactato de sodio, 10; D- glucosa, 5; HEPES-N bis, 25, medio que corresponde a las condiciones No capacitantes (NC). El medio capacitante (CAP) es HTF suplementado con NaHCO₃ y Albúmina de suero bovino (ASB) a una concentración final de 25 mM y 75 mM respectivamente, finalmente se ajusta el pH a 7.4 utilizando NaOH.

2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

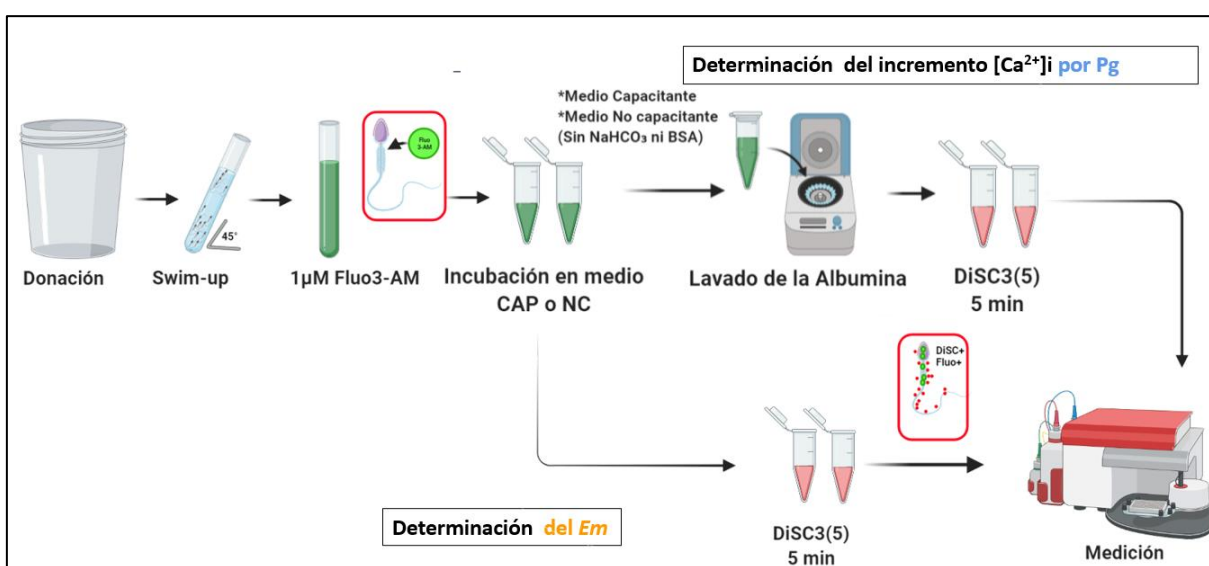


Figura 6. Esquema general de la estrategia experimental. Obtenemos la muestra por medio de donación para posteriormente realizar la selección de los espermatozoides motiles por medio de Swim up, posteriormente los espermatozoides ya purificados se marcan con el colorante fluorescente Fluo3 y se incuban en medio capacitante o no capacitante, en este punto se divide la muestra en dos tubos para medir la respuesta a Pg y la determinar el Em absoluto, la diferencia entre las dos determinaciones es que para medir la respuesta a Pg se centrifuga a 300xg/3minutos para lavar la albumina, por último, antes de cada medición se realiza el marcado con IP y la sonda potenciométrica DiSC₃(5) finalmente se realiza la medición en el citómetro de flujo Accuri C6 plus.

2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El semen humano se obtuvo de donantes sanos con tres o más días de abstinencia sexual. Los donadores conocieron y firmaron una carta de consentimiento informado sobre el uso experimental de su muestra. Los protocolos para el uso de semen humano cuentan con la autorización del Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología (UNAM, México). Todos los donantes firmaron el consentimiento informado.

Las muestras se seleccionaron según los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010) densidad celular $\geq 20 \times 10^6$ espermatozoides/ml; movilidad $> 50\%$ y con una morfología normal $>4\%$ (Anexo A). Una vez que se colecta la muestra, se incubaba 30 minutos a 37°C para su licuefacción. Posteriormente se realiza un protocolo de nado ascendente en tubos de ensayo inclinados 45° , con $\sim 300\mu\text{l}$ de semen en medio HTF durante 1 hora, al terminar la hora, se colecta el sobrenadante, esto nos permite seleccionar aquellas células que nadaron del semen al medio HTF y por lo tanto son células vivas con buena movilidad. Posteriormente la muestra se ajusta a una concentración de 10×10^6 células/ml y se incuban con el colorante sensible Ca^{2+} , Fluo3, después de media hora, se colocan 3×10^6 células en diferentes tubos y se ajusta el volumen a 1 ml de medio CAP o NC con el objetivo de analizarlas cada hora durante las siguientes 6 hrs de capacitación. Antes de cada registro se incuban con la sonda potenciométrica $\text{DiSC}_3(5)$, IP un colorante de viabilidad, siempre manteniendo una temperatura de 37°C y protegidos de la luz.

2.2. ADQUISICIÓN DE DATOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se empleó un citómetro de flujo BD Accuri C6 plus, para medir $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y Em en respuesta a Pg a diferentes tiempos de capacitación (0 a 6 horas) en espermatozoides humanos. Para seleccionar los eventos que corresponden a espermatozoides se utilizan los parámetros del área de dispersión frontal (FSC-A) y del área de dispersión lateral (SSC- A), se utilizó un diagrama de puntos para definir la población de interés (Figura 5A). Los eventos dobles (agregados celulares) se excluyeron mediante un diagrama de puntos graficando FSC-A versus altura de dispersión frontal (FSC-H) (Figura 5B).

Para evaluar el Em se empleó el colorante $\text{DiSC}_3(5)$ (ex/em = 651/670 nm) con una concentración de 10 nM (Figura 5C, 5F). Por otro lado, Para evaluar el $[\text{Ca}^{2+}]$ se utilizó el colorante Fluo3 a una concentración de $1 \mu\text{M}$ (ex/em = 506/526 nm) y se aplicó un estímulo con Pg a una concentración de $1 \mu\text{M}$, concentración que se determinó al realizar una curva dosis-respuesta (Figura 5D, 5E). Es importante señalar que se monitoreó de forma simultánea ambos parámetros. Es decir, se midió Em durante el estímulo de Pg y se midió $[\text{Ca}^{2+}]$ durante la calibración del Em (Figura 5C y 5D).

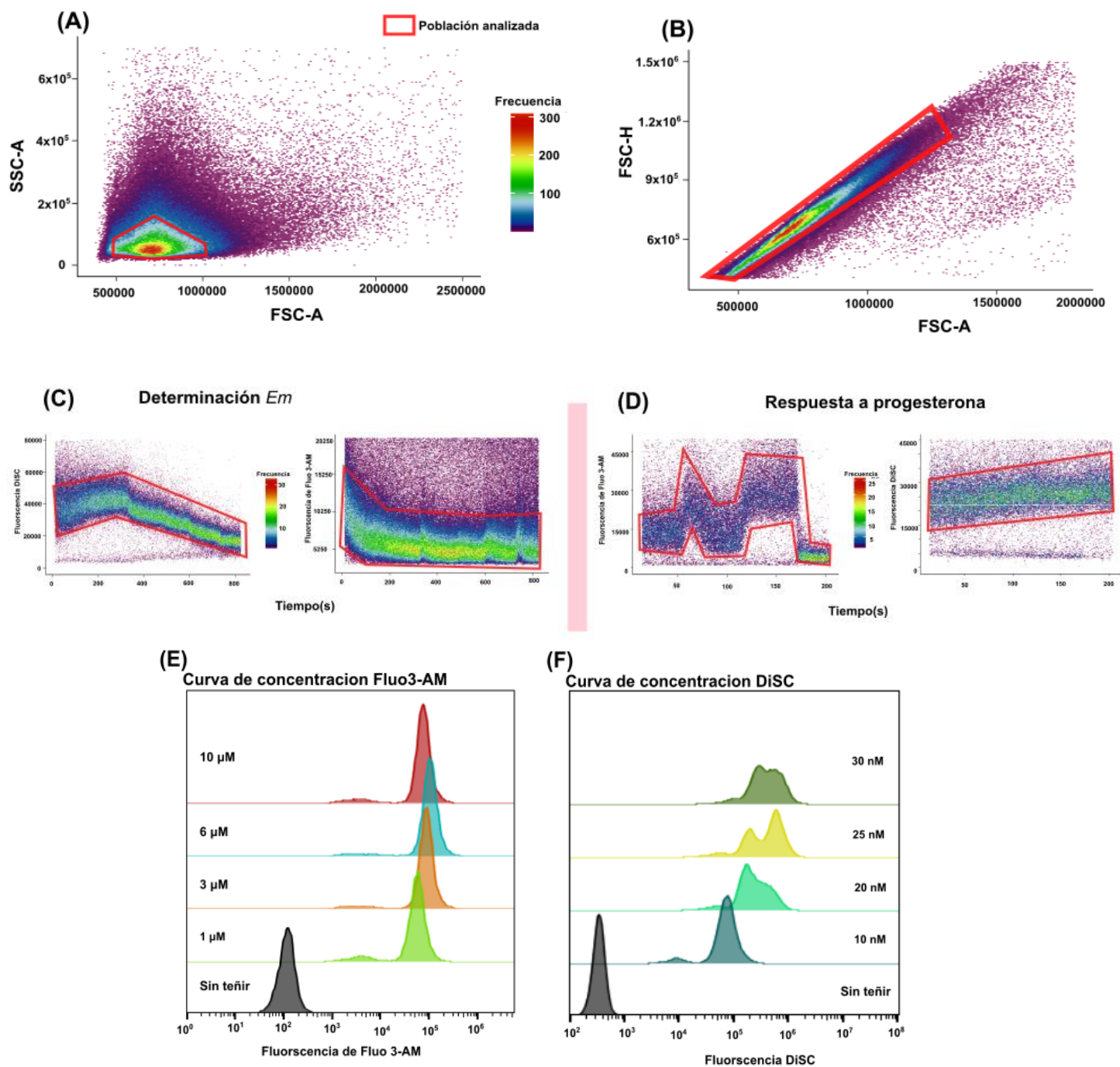


Figura 5. Adquisición de datos mediante citometría de flujo en espermatozoides de humano. **A)** Gráfico representativo de densidad del área de dispersión lateral (SSC-A) contra el área de dispersión frontal (FSC-A) de una muestra de espermatozoides de humano. **B)** Gráfico representativo de FSC-A contra la altura de dispersión frontal (FSC-H), que permite excluir eventos dobles. Trazos representativos de la fluorescencia emitida por DiSC₃(5) (Izquierda) y Fluo3 (derecha) durante la determinación del *Em* (C) y de la respuesta a Pg (D). **E)** Histograma de la frecuencia de eventos contra la fluorescencia obtenida con distintas concentraciones del colorante Fluo3 (E) y DiSC₃(5) (F).

2.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA

Los espermatozoides que se obtienen mediante la técnica de nado hacia arriba de acuerdo con Matamoros-Volante, se incuban a una concentración de 3×10^6 células/mL, en un medio que promueva, o no, la capacitación. Posteriormente se cargan con 15 nM del colorante Disc₃(5) durante al menos 5 min. Se inicia la medición colocando el tubo en el soporte y este a su vez en el agitador en el área de registro del BD Accuri C6 plus . Se emplea el láser de 633 nm para excitar al Disc₃(5) y se utiliza el filtro paso banda denominado APC (620/20) para detectar la fluorescencia. Se realiza una medición continua durante 1 min que corresponde a los valores de fluorescencia basales o de potencial en reposo de las células. Pasado este tiempo se realiza una adición de 2 μ M de valinomicina (ionóforo de K⁺), se registra el comportamiento durante al menos 4 min, el tiempo necesario para visualizar que la fluorescencia de la población se estabiliza o, lo que indica que el potencial membranal de las células se igualó con el potencial de equilibrio del K⁺, de acuerdo con las concentraciones internas y externas del ion (lo que corresponde a un Em de aproximadamente -84 mV). Posteriormente, se realizan adiciones subsecuentes de concentraciones crecientes de KCl, 5, 10, 15, 25, y 40 mM (Matamoros-Volante *et al.*, 2020). Esto con el fin de aumentar la concentración extracelular de K⁺, lo que genera que este ion ingrese a la célula produciendo una depolarización del Em (Figura 7A). Los valores de fluorescencia que se obtienen permiten la construcción de una curva que se relaciona con los valores de Em, ya que, al estimar, respectivamente, las concentraciones internas y externas de K⁺, se puede emplear la ecuación de Nerst para calcular el valor del Em (Figura 7C). Estos cálculos permiten inferir los valores de Em de las células en su estado basal, para que, finalmente se puedan comparar los valores en las condiciones no capacitantes y capacitantes a los distintos tiempos.

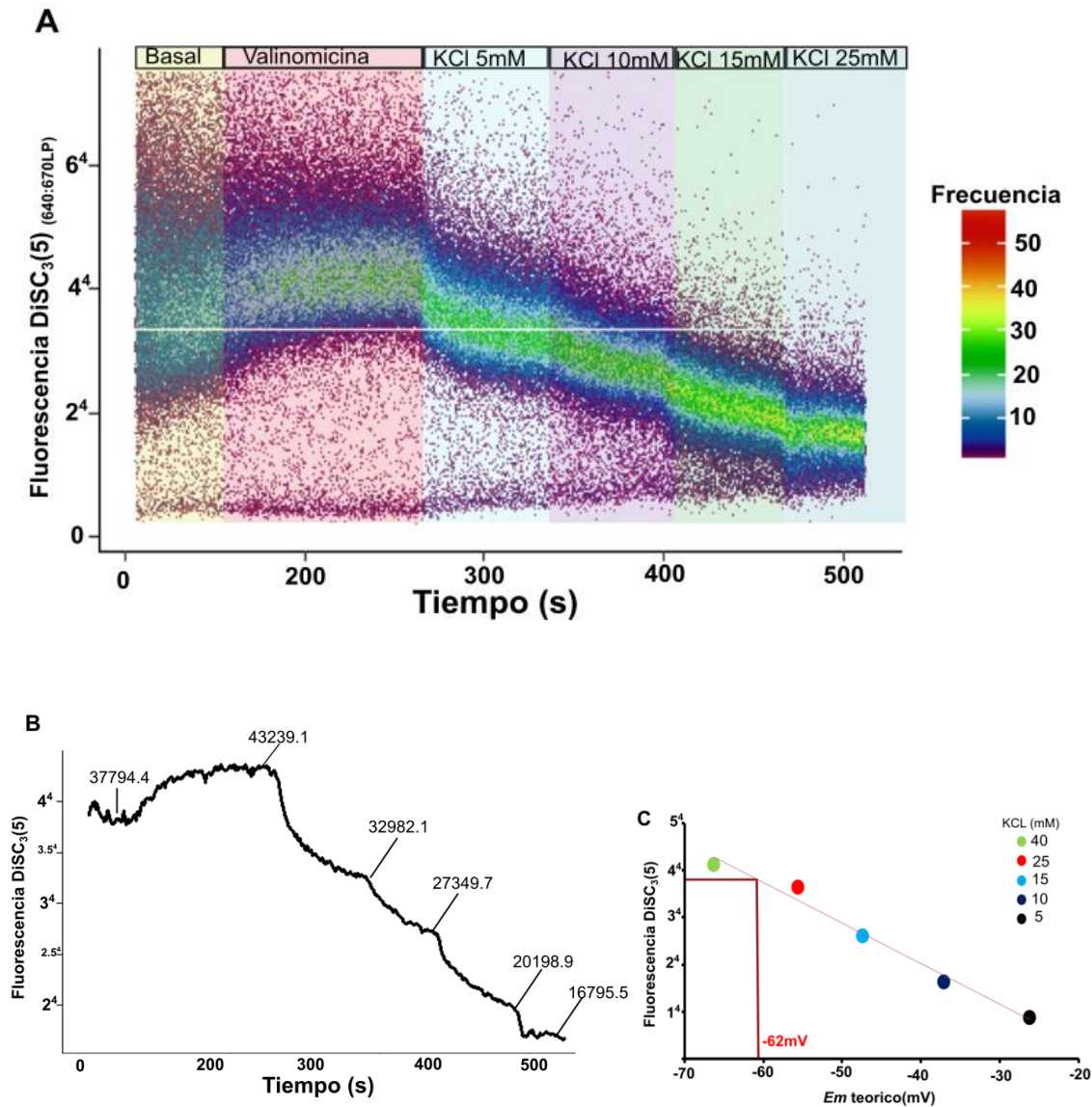


Figura 7. Medición de los valores absolutos del potencial de membrana (E_m) en espermatozoides de humano. **A)** Gráfico representativo de 3 dimensiones que representa la intensidad de fluorescencia en el eje X, el tiempo en el eje Y, y la escala de colores indica la frecuencia de eventos, valores obtenidos por citometría de flujo empleando el colorante DiSC₃(5) en espermatozoides en medio capacitante. En la parte superior se indican las adiciones para la calibración del E_m . **B)** Mediana de los valores de fluorescencia, marcando subpoblaciones seleccionados para los cálculos en C. **C)** Mediana de los valores de fluorescencia seleccionados en B contra el Valor teórico de E_m calculado con la Ecuación de Nerst; la línea entre los puntos marca el ajuste lineal- ($Y=1248.9x - 21,890$; $R^2 = 0.946$).

2.4. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A Pg

Los espermatozoides que se obtienen mediante la técnica de nado hacia arriba de acuerdo con Matamoros-Volante, ajustados a una concentración de 10×10^6 células/mL, se incuban en un medio que promueva, o no, la capacitación durante 30 min en presencia de $1 \mu\text{M}$ del

colorante sensible Ca^{2+} Fluo3. Después las células con el colorante se diluyen duplicando el volumen con el medio en el que se encuentran inicialmente, antes del registro en condiciones CAP se lava la ASB por centrifugación y se resuspenden en medio capacitante que solo contenga NaHCO_3 . Se colocan en tubos para la medición como se mencionó en la sección anterior y se registra la fluorescencia empleando un láser de excitación de 488 nm y un filtro de emisión paso banda denominado FITC (530/30). Igualmente se hace un registro inicial de la fluorescencia durante 30 segundos que corresponde a los valores basales de Ca^{2+} intracelular. Posteriormente se adiciona 1 μM de Pg lo que, idealmente, genera un aumento del Ca^{2+} intracelular que se registra durante 1 minuto. A continuación, se realiza una adición de 15 μM del ionóforo de Ca^{2+} ionomicina, el cual genera un aumento masivo de Ca^{2+} que reporta el valor máximo de fluorescencia. Finalmente se añaden 5 mM de MnCl_2 con el objetivo de obtener un valor mínimo de fluorescencia, ya que este compuesto funciona como un apagador de ésta (Figura 8A), estos últimos para la normalización de los resultados. En la figura 8C se muestra un trazo representativo de los valores normalizados de fluorescencia y diferentes parámetros cinéticos evaluados en los distintos tiempos de capacitación. La normalización de los datos $(F_0 - F_{\text{min}})/(F_{\text{max}} - F_{\text{min}})$, nos permite ajustar los datos a un máximo de 1, tomando en cuenta el estado de fluorescencia basal, que es distinto entre cada determinación.

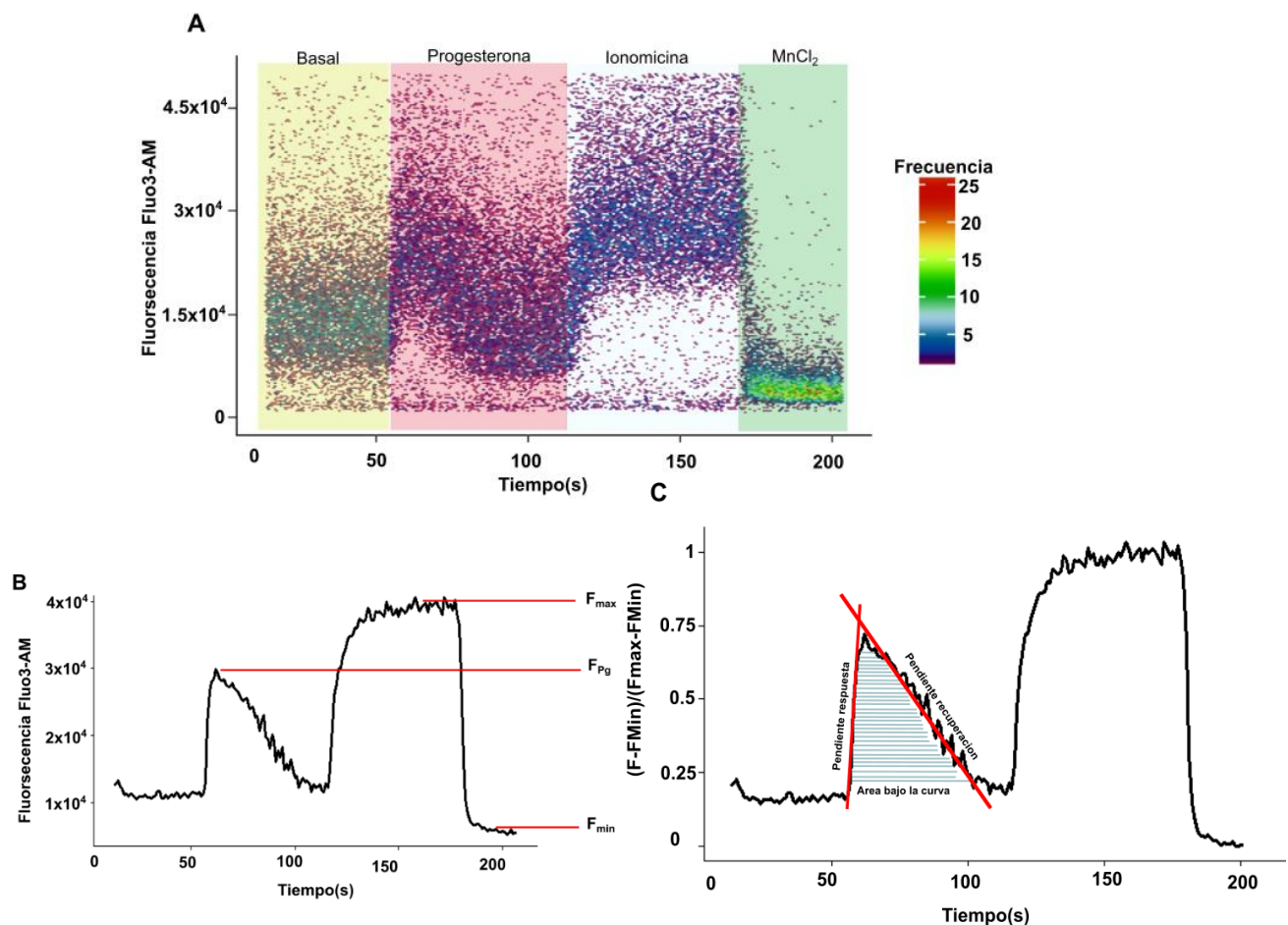


Figura 8. Registro de la respuesta a Pg por citometría de flujo. **A)** Gráfico representativo de 3 dimensiones que representa la intensidad de fluorescencia en el eje X, el tiempo en el eje Y, y la escala de colores indica la frecuencia de eventos. Se muestran los valores obtenidos por citometría de flujo empleando el colorante Fluo3 en espermatozoides de humano en medio capacitante. En la parte superior se indican las adicciones realizadas, Pg, ionomicina y MnCl₂. **B)** Mediana de los datos de (A) mostrando puntos importantes de la determinación de la respuesta a Pg. **C)** Normalización de la mediana de los valores de fluorescencia $((F-F_{min})/(F_{max}-F_{min}))$, mostrando parámetros cinéticos, como la velocidad de inicio y recuperación de la respuesta representado por la pendiente de respuesta y la pendiente de recuperación. El área bajo la curva que es un valor directo de la cantidad de Ca²⁺, internalizado, después de la respuesta a Pg.

2.5. DETERMINACIÓN DE LA [Ca²⁺]_i DURANTE LA CALIBRACIÓN DEL Em.

El procedimiento de la determinación de la respuesta de Ca²⁺, se realiza de forma simultánea a la determinación del Em, con su respectiva adición de valinomicina seguida de las adicciones de KCl. La muestra está teñida con ambos colorantes, pero el estímulo no será la Pg, si no la propia calibración realizada para determinar el valor de Em.

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos que se obtienen por citometría de flujo fueron a través del software BD Accuri C6 Plus y se exportan en formato FCS, para su posterior análisis inicial con el software FlowJo versión 10.1 (BD). Posteriormente, los datos de fluorescencia y tiempo se exportan a un formato .xlsx y se analizan en RStudio versión 1.3.1093.

Los datos de intensidad de Fluorescencia se muestran también como gráficos de densidad donde los colores más cálidos representan una mayor densidad celular. Los trazos representativos en las cinéticas corresponden al valor de la mediana de fluorescencia para cada punto de tiempo. Los gráficos se crearon con la paquetería ggplot2. Los valores calculados se presentan como media +/- SEM. Las diferencias en

estos valores se evaluaron utilizando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, (ya que nuestros datos no presentan una distribución normal al no pasar la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk) considerando el tiempo NC como un factor y el tratamiento (por ejemplo, CAP0, CAP1, CAP2, etc.) como el segundo factor. Posteriormente se aplicó la prueba de Dunn para determinar diferencias entre tratamientos (los cálculos se realizaron en RStudio versión 1.3.10938). Un valor de probabilidad (p) $< 0,05$ se consideró como una diferencia estadísticamente significativa. Las versiones finales de las figuras se realizaron en Inkscape 0.91 (Inkscape.org)

VIII. RESULTADOS

1. LA Pg INDUCE UN INCREMENTO $[Ca^{2+}]_i$ DESDE 1 μM

Con el fin de determinar la concentración óptima de Pg para los experimentos propuestos, los espermatozoides cargados con 1 μM Fluo3 se estimularon con dosis crecientes (en μM 0.25, 0.5, 1, 2 y 3) de Pg y se midió el cambio en la $[Ca^{2+}]_i$. Cada condición se realizó como se describió en la sección de Métodos, es decir, estimulando con Pg y normalizando con valores obtenidos con ionomicina (máximo) y $MnCl_2$ (mínimo). La figura 9 muestra que a partir de 1 μM de Pg obtenemos una respuesta ideal, que no aumenta de forma significativa al duplicar o triplicar la concentración, por otro lado, incrementar la concentración de Pg podría interferir con algún otro proceso fisiológico, como inducir la RA.

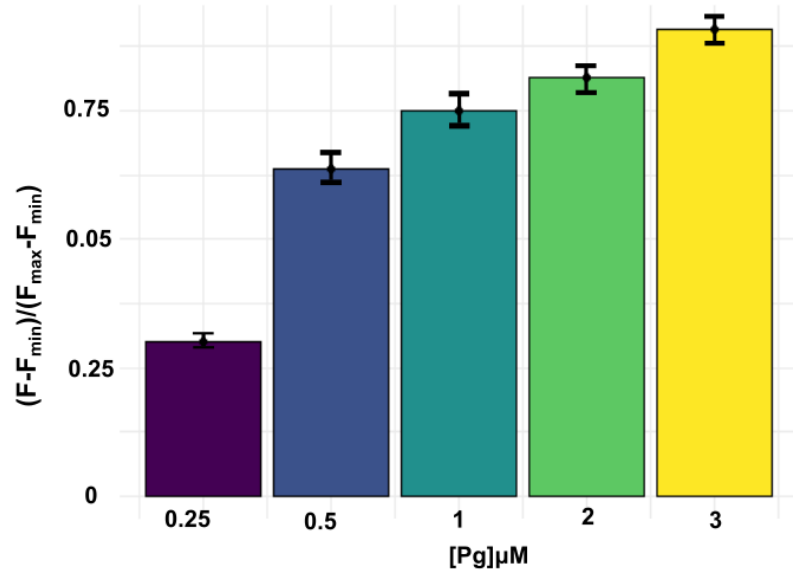


Figura 9. Curva dosis-respuesta de Pg en espermatozoides de humano en condiciones capacitantes. Gráfica de barras que representa la magnitud de la respuesta a Pg en espermatozoides en condiciones capacitantes, la cual incrementa a medida que aumenta la concentración de Pg. Concentraciones empleadas en μM 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 (n:4)

2. LA ALBÚMINA DE SUERO BOVINO SUPRIME EL EFECTO DE LA IONOMICINA.

La ionomicina es una molécula altamente hidrofóbica, este ionóforo forma complejos con cationes divalentes, como el Ca^{2+} , dichos complejos son liposolubles, y gracias a eso pueden cruzar a través de membranas biológicas, esta misma propiedad la hace susceptible a proteínas séricas como la albúmina, que, debido a su estructura, puede atrapar rápidamente las moléculas hidrofóbicas (Kao J. *et al.* 2010). Como se aprecia en la figura 10, en muestras sin lavar, la ASB suprime totalmente el efecto de la ionomicina, lo que no permite normalizar los trazos y hacer una comparación semi cuantitativa. La albúmina es un componente necesario para la capacitación, por lo que se soluciona con un ajuste metodológico, antes de cada registro, se incluye un lavado y resuspensión en medio HTF capacitante que solo contenga NaHCO_3 , lo que resultó en la recuperación del efecto de la ionomicina (Figura 10A).

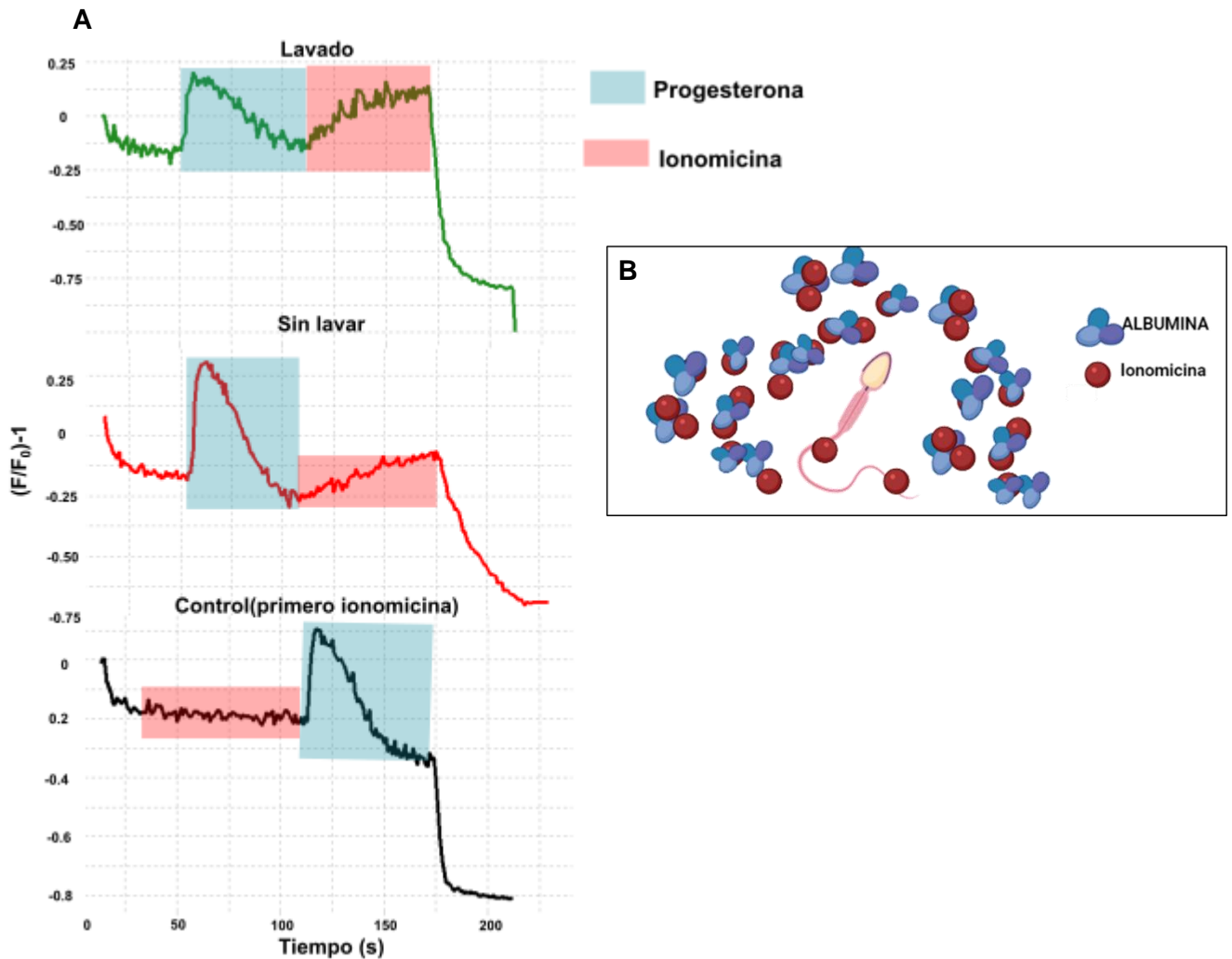
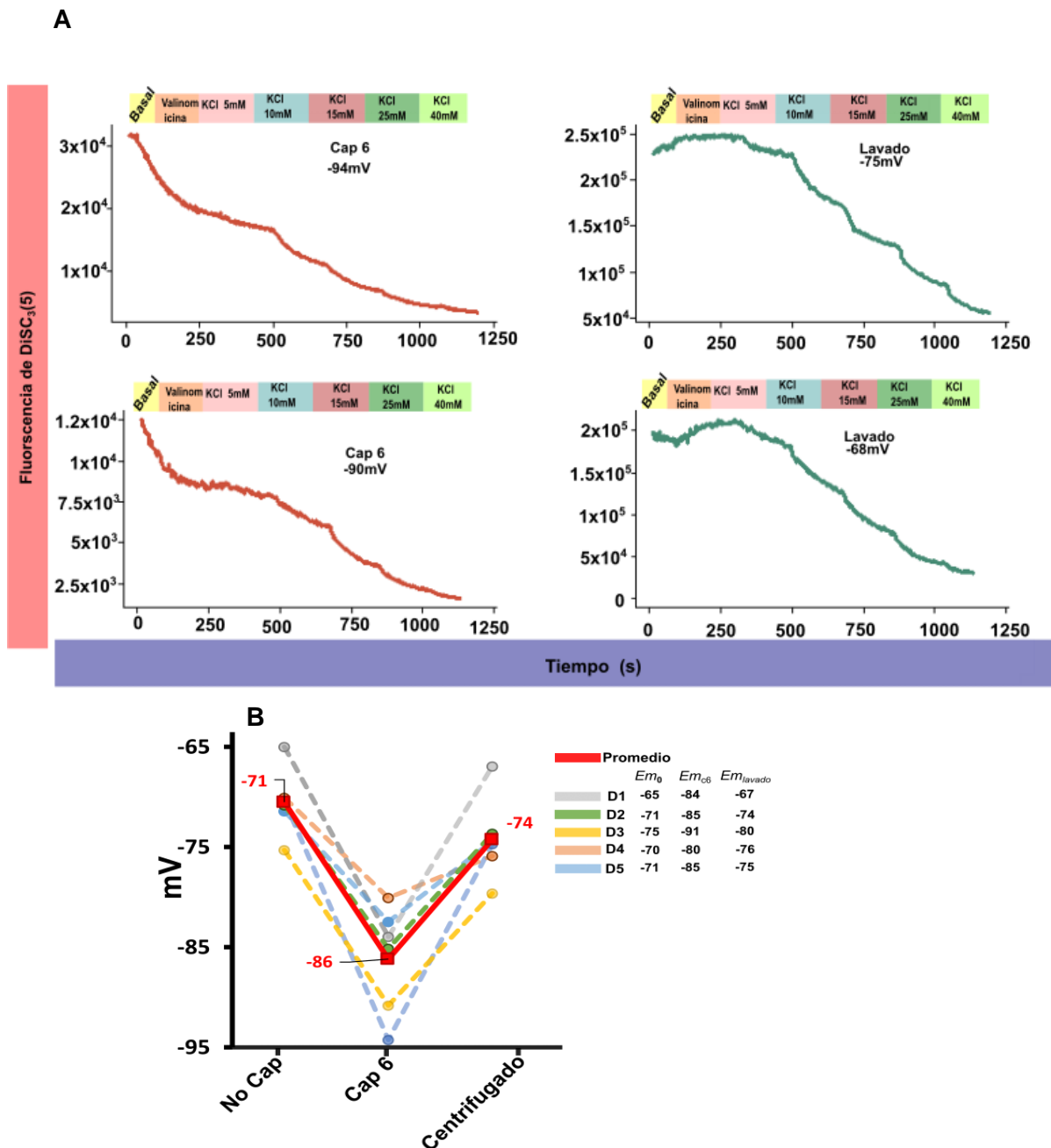


Figura 10. La ASB suprime el efecto de la ionomicina. A) Trazos representativos de fluorescencia que muestra el efecto supresor de la ASB sobre la ionomicina (trazo sin lavar). Al realizar un lavado por centrifugación el efecto de la ionomicina se recupera. Se muestra un control donde primero se adiciona ionomicina. **B)** Esquema de la ionomicina y su atrapamiento por ASB, debido a sus características químicas.

3. EFECTO DE LA CENTRIFUGACIÓN EN EL ESPERMATOZOIDE

Como parte de un ajuste metodológico en la determinación de la respuesta Pg de espermatozoides de humano (Ver Resultados punto 2), se tuvo que agregar un paso de centrifugación para remover la ASB del medio. Con el fin de mantener una metodología equivalente, se agregó el mismo paso de centrifugación en la determinación del Em. Sin embargo, observamos que la centrifugación tiene un efecto “repolarizador” (Figura 11A y

B) sobre el potencial de membrana, incluso regresando a valores no capacitantes. Además, al observar la fluorescencia emitida por Fluo3 durante la determinación del E_m , saltos transitorios en la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 11C, trazos rojos), esto, como resultado de los pulsos despolarizante producidos por KCl. Sin embargo, contrario a eso, en espermatozoides que ya experimentaron 6 horas de capacitación, estos incrementos están suprimidos por completo (Figura 11C), lo cual sugiere que estos eventos son dependientes de hiperpolarización, más que de la actividad de PKA o de un pH_i alcalino, por el momento no hemos logrado entender este efecto de la centrifugación.



C

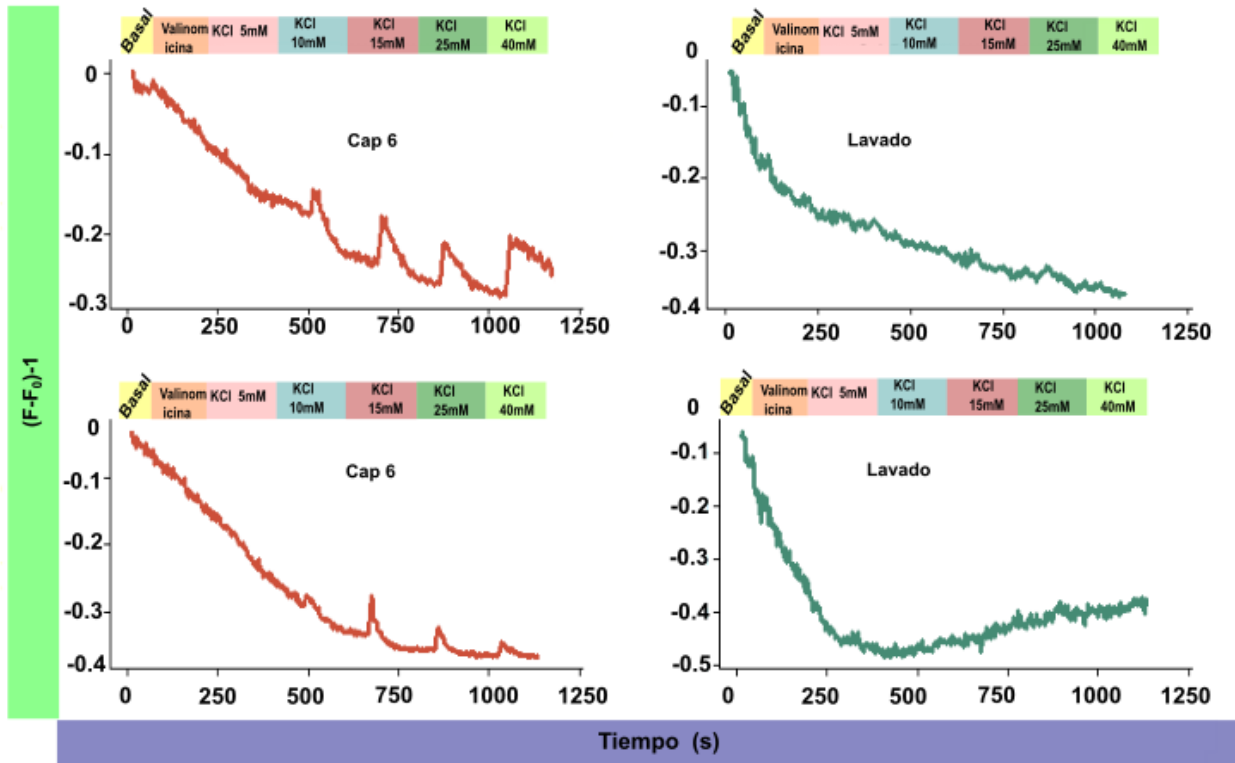
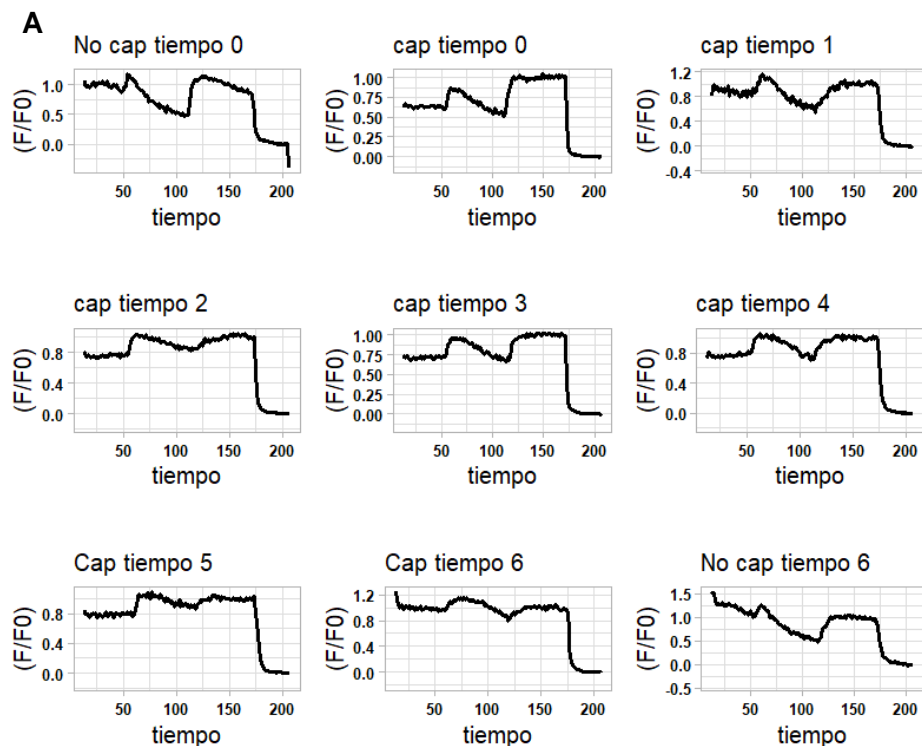


Figura 11. La centrifugación repolariza la membrana plasmática de los espermatozoides. A) Trazos representativos de determinación del E_m en espermatozoides capacitados 6 hrs. centrifugados y no centrifugados con sus valores de potencial de membrana respectivamente. **B)** Efecto “repolarizador” de la centrifugación sobre el potencial de membrana de espermatozoides de 6 donadores distintos. **C)** Efecto de la centrifugación sobre los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ dependientes de pulsos despolarizantes. (n=7)

4. EL INCREMENTO DE $[Ca^{2+}]_i$ INDUCIDO POR Pg ES MAYOR A MEDIDA QUE LA CAPACITACIÓN AVANZA

Como ya se mencionó, la Pg tiene la capacidad de activar al canal Catsper (de forma indirecta) y provocar un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Lishko P. *et. al.*, 2011), dicho evento es necesario para desarrollar procesos fisiológicos importantes durante la fecundación, como la hiperactivación de la movilidad y la RA entre otros (Darszon *et. al.*, 2011). Como parte del objetivo 1, se realizó una cinética de la respuesta a Pg. Para esto se midió la $[Ca^{2+}]_i$ provocado por la Pg cada hora durante 6 horas de capacitación (Figura 12A). En la figura 12B, se muestra un trazo representativo de la respuesta a Pg, donde se indican parámetros cinéticos como el área bajo la curva y las pendientes del aumento y de la recuperación de la respuesta, así como el pico máximo alcanzado en cada tiempo de capacitación. En la figura 12C se muestra un promedio

de la respuesta a Pg, donde se calcula el Δ de fluorescencia (diferencia del basal con el pico de fluorescencia), y se obtuvo un valor máximo de respuesta a las 2 horas de capacitación, seguida de una disminución significativa. Un comportamiento similar se observa en la figura 12A, si se analiza solo el pico de la respuesta. Al medir el área bajo la curva (figura 12D), que nos da información de la respuesta global del estímulo sobre el espermatozoide y es una medida indirecta de cuanto Ca^{2+} está entrando a la célula, también tiene su punto máximo a las 2 horas de capacitación. Este resultado confirma que la respuesta tiene su punto máximo en ese tiempo de capacitación sufriendo una vez una caída en la magnitud de respuesta de los espermatozoides a la Pg, posiblemente debido al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal producto de que la capacitación (Figura 4B). Por otro lado, también es importante medir la rapidez de la respuesta a Pg, esto se obtiene al calcular el valor de la pendiente generada desde el inicio del estímulo hasta su punto máximo y posterior a eso, la rapidez en la que las células se recuperan del estímulo calculando la misma pendiente desde el punto máximo hasta el punto donde la población alcanza de nuevo el punto de fluorescencia estable (ver Figura 12B). En la figura 12E vemos que el cambio más importante es entre los espermatozoides incubados en medio NC y aquellos incubados en medio CAP, ya que esta última condición no parece tener un efecto incrementar el tiempo de capacitación, es decir, al comparar las condiciones CAP 0-6 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, (Figura.12E). La cinética de recuperación se repite de forma inversa, como se observa en la figura 12D que nos muestra la rapidez con la que se recuperan los espermatozoides del estímulo de Pg. La recuperación más rápida es la de los NC al tiempo 0 y 6, tornándose más lenta al estar capacitados, lo cual se caracteriza por una pendiente menos inclinada.



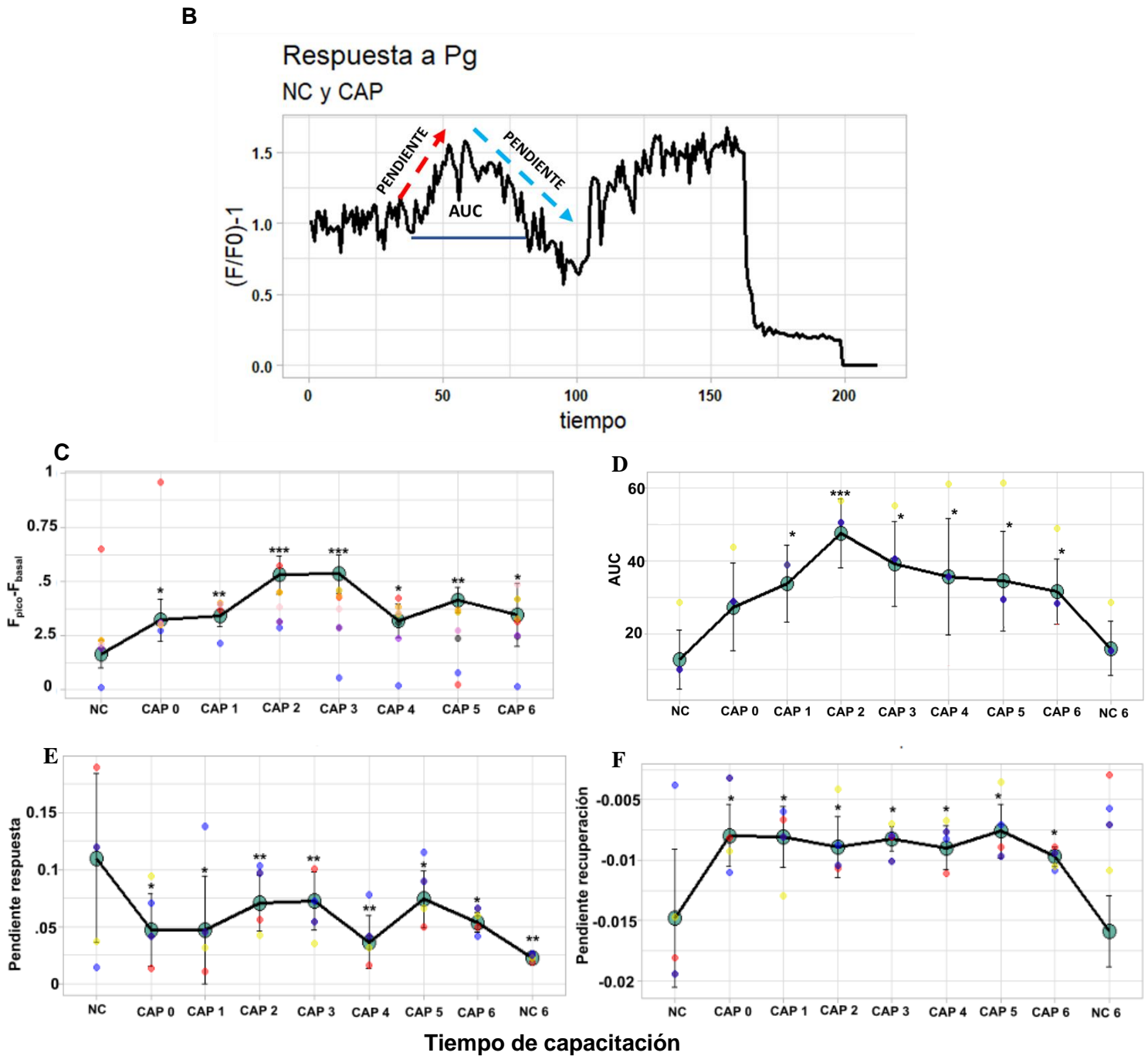


Figura 12. El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Pg es mayor a medida que avanza la capacitación

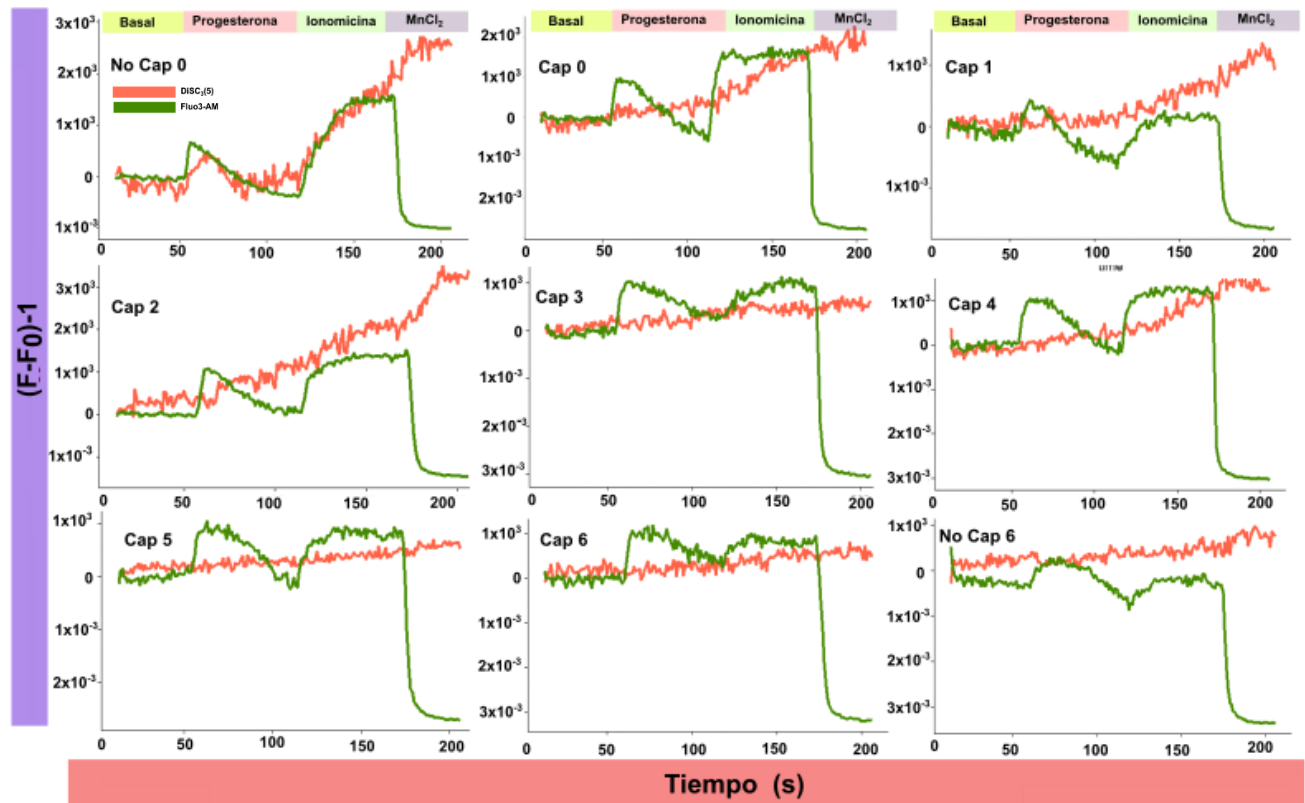
A) Trazos representativos de mediciones secuenciales de $[Ca^{2+}]_i$ de espermatozoides de humano en condiciones capacitantes (0- 6 Hrs). Se normaliza la fluorescencia $(F-F_{min})/(F_{max}-F_{min})$ para facilitar la comparación en la respuesta a Pg . **B)** Parámetros cinéticos de la respuesta a Pg durante la capacitación como área bajo la curva, magnitud de la respuesta y pendientes de inicio y recuperación de la respuesta a

Pg. **C)** Promedio de la respuesta a Pg, donde se calcula el Δ de fluorescencia (diferencia del basal con el pico de fluorescencia). **D)** Cálculo del área bajo la curva, representado en la figura A. **E)** Pendiente de la respuesta a Pg después del estímulo. **F)** Pendiente de recuperación de la respuesta a Pg después del estímulo. Los puntos azules grandes y las líneas continuas indican el promedio \pm SEM, y los pequeños corresponden al valor de cada experimento independiente. Los datos se compararon por medio de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis considerando el tiempo de capacitación como un factor. Se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn como análisis post hoc. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, contra condiciones NC.(n:15)

5. LA Pg INDUCE UNA HIPERPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

Durante la determinación de la respuesta a $[Ca^{2+}]_i$ por el estímulo de Pg en espermatozoides capacitados y no capacitados, se adquirió simultáneamente la fluorescencia emitida por la sonda potenciométrica DiSC₃(5) (Figura 13 A). Estas mediciones nos revelaron que la Pg produce una hiperpolarización de la membrana en espermatozoides capacitados y no capacitados. En la figura 13A se muestran trazos representativos de cinéticas de respuesta a Pg tomadas cada hora, durante 6 hrs de capacitación. En la figura 13 B correspondiente a los controles que incluyen la adición de solo Pg o solo Ionomicina, se observa que ambos provocan el aumento en la fluorescencia emitida por DiSC₃(5). Esta hiperpolarización a medida que avanza la capacitación se hace más intensa llegando a unirse con el estímulo de la ionomicina que también es capaz de desencadenar una hiperpolarización. La entidad molecular responsable de esta hiperpolarización podrían ser los canales Slo (3/1) ya que dichos canales, presentan un dominio de unión a Ca^{2+} , que podría activarlos con estos estímulos. Es interesante que este incremento de la fluorescencia de DiSC₃(5) se induce también por la adición de $MnCl_2$, pero la razón nos es desconocida aún. Estos cambios en la polaridad de la membrana provocados por estos estímulos son producto de una respuesta netamente celular, ya que empleamos una metodología que solo registra cambios que ocurren dentro de la célula. Sin embargo, para comprobarlo experimentalmente, realizamos el mismo procedimiento de registro empleando fluorimetría que nos permite registrar cambios en el medio sin tener células y así comprobar que no se tratan de artefactos de registro provocados por la interacción de DiSC₃(5) con la Pg y ionomicina. Como se observa en la figura 12C, incluso usando un exceso de DiSC₃(5) no hay ningún cambio en la fluorescencia de este.

A



C

B

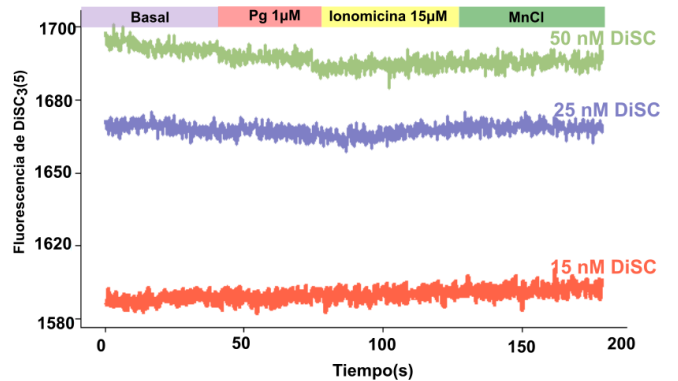
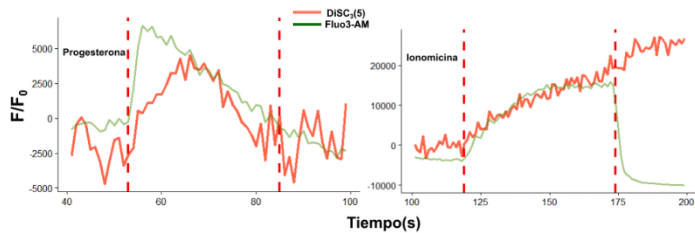


Figura 13. El aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Pg provoca una hiperpolarización de la membrana plasmática. **A)** Trazos representativos de la cinética de la respuesta a Pg en espermatozoides capacitados durante 6 horas. Se muestran trazos en condiciones NC (no capacitantes), Se grafica la fluorescencia de Fluo3 (verde) y de DiSC₃(5) (rojo). Los recuadros superiores representan la adición de Pg, ionomicina y MnCl₂ **B)** Controles de adición de Pg y ionomicina y su efecto sobre el potencial de membrana de espermatozoides capacitados. **C)** Registros de la respuesta a Pg usando fluorimetría en medio sin espermatozoides.

6. LA HIPERPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA ES MAYOR A MEDIDA QUE AVANZA LA CAPACITACIÓN.

Como ya se mencionó anteriormente, se sabe que, durante la capacitación, entre otros eventos, ocurre una hiperpolarización de la membrana plasmática (Muñoz-Garay *et. al.*, 2001). Esto lo corroboramos dado que determinamos en promedio un potencial al inicio de la capacitación de -60mV y un potencial de -85mV al final de 6 horas de capacitación (Figura 14 A y B). Estos valores son consistentes con lo que reportaron Matamoros-Volante y colaboradores y Baro y colaboradores. Además, observamos (como lo esperamos) que la hiperpolarización de la membrana plasmática es producto de la capacitación, ya que aquellas células en condiciones no capacitantes no mostraron un cambio significativo, cuando se incubaron por 4 horas en condiciones que no promueven la capacitación (Figura 14C).

Las condiciones capacitantes promueven una hiperpolarización de la membrana plasmática, la cual es mayor a medida que avanza la capacitación. Cabe resaltar que, aunque esa es la tendencia general, el comportamiento entre individuos es variable (Figura 14B) un ejemplo son los valores iniciales de E_m (No capacitante) que pueden ir desde -50 mV hasta -70 mV, además, que los cambios a medida que avanza la capacitación no siempre son en gran magnitud (o hacia lo negativo), es decir entre un tiempo y otro puede ocurrir un cambio no mayor a 1mV o un gran salto de -10mV, o simplemente no cambiar hasta el siguiente tiempo (Figura 14B) .

En promedio el E_m tiende hacia valores más negativos a medida que la capacitación sucede, esto hasta llegar a su punto máximo a las 3 hrs de capacitación con un valor promedio de -85mV, valor que después de las 3 hrs se mantiene sin cambios significativos (Figura 14B).

Al comparar los resultados de potencial y la respuesta a P_g en un solo gráfico de doble eje, se observa cierta relación entre el valor de E_m y la magnitud de la respuesta a P_g , siendo mayor a medida que el E_m se torna más negativo (Figuras 14D). En las últimas horas de capacitación donde el E_m ya no cambia, tampoco cambia el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por P_g .



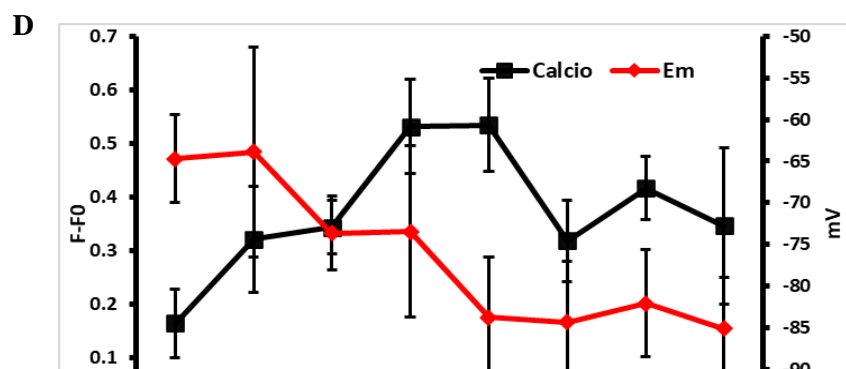
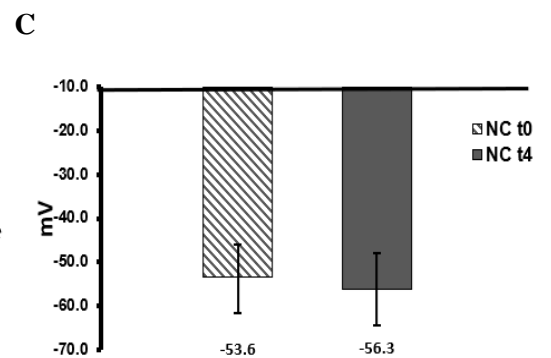
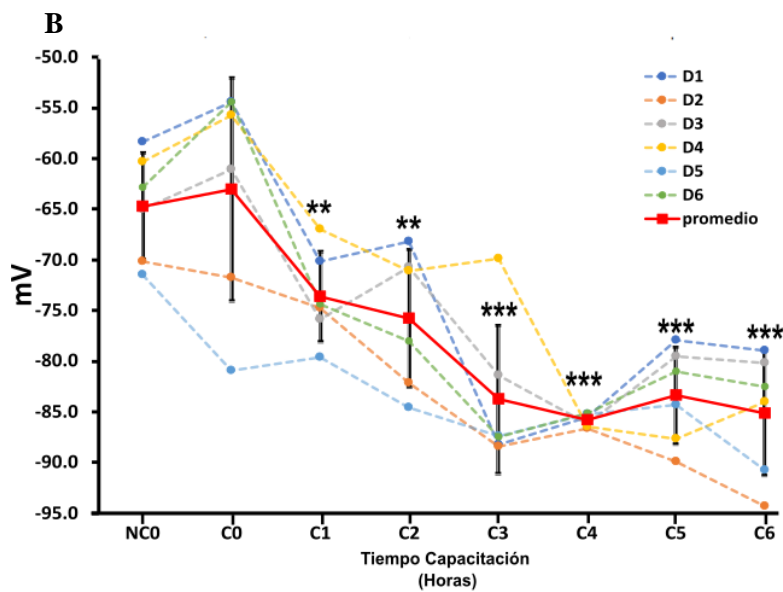
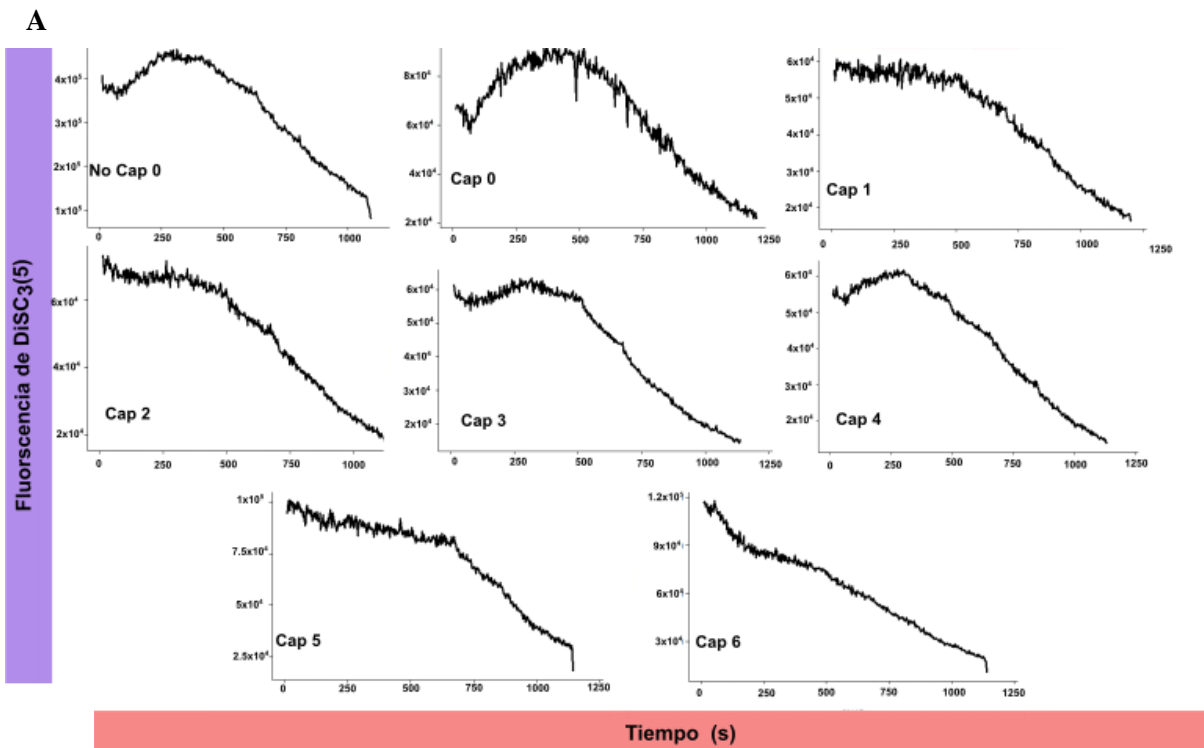
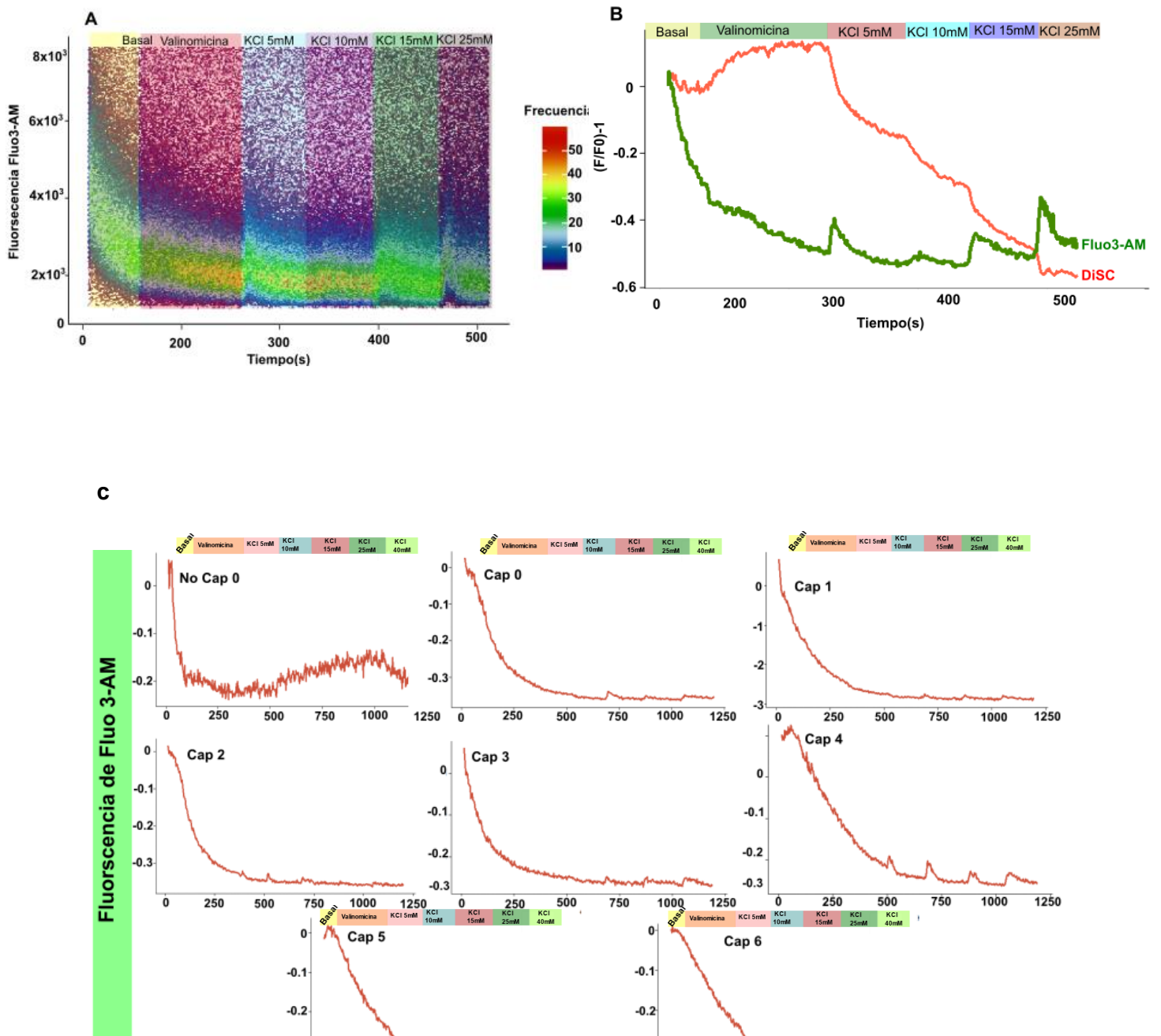


Figura 14. La hiperpolarización del Em es mayor a medida que la capacitación ocurre. A) Trazos representativos de la cinética de potencial de membrana durante 6 horas de capacitación. **B)** Valores de potencial de membrana durante 6 horas de capacitación, en líneas punteadas se muestra la cinética de cada donador individual y la línea roja el promedio general de 11 individuos diferentes. **C)** Valores de potencial de membrana al tiempo inicial y final de las condiciones no capacitantes. **D)** Gráficos de doble eje con valores de potencial de membrana basal y respuesta a Pg a distintos tiempos de capacitación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n:14). Líneas continuas rojas y negras indican el promedio \pm SEM. Los datos se compararon usando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis considerando el tiempo de capacitación como un factor. Se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn como análisis post hoc. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

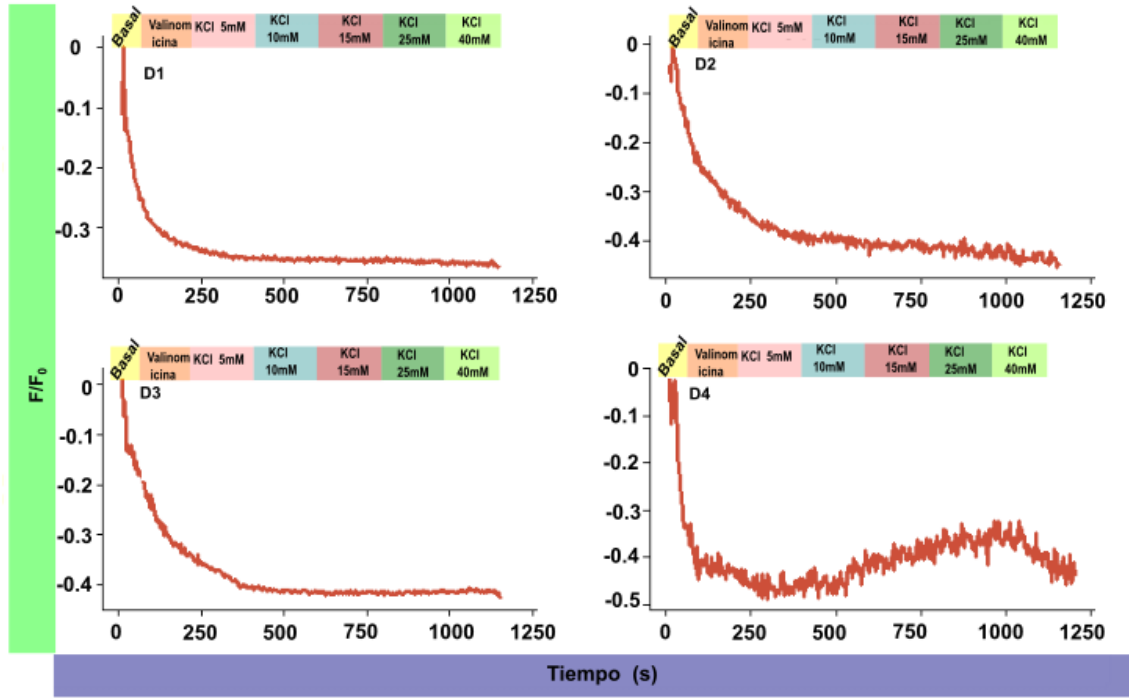
7. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE POTENCIAL DE MEMBRANA Y MONITOREO DE LA $[Ca^{2+}]_i$ EN ESPERMATOZOIDES DE HUMANO

En un trabajo anterior de nuestro grupo, se determinó que era posible calcular el valor de potencial de membrana y al mismo tiempo monitorear el comportamiento del Ca^{2+} en el interior de la célula empleando una doble tinción con la sonda fluorescente DiSC₃(5) y el colorante fluorescente Fluo3. Siguiendo la misma metodología realizamos mediciones simultáneas a distintos tiempos de capacitación y de este modo estudiar la relación entre los dos parámetros. La adición de valinomicina, que provoca una hiperpolarización de la membrana plasmática, lo cual resultó en un descenso de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados 3 horas (Figura 15 A y B), la cual en la mayoría de los casos no se recupera. Después añadir la valinomicina, se realizaron pulsos despolarizantes, con la adición de KCl, lo cual provoca en el espermatozoide, incrementos transitorios en la $[Ca^{2+}]_i$, mediados probablemente a través del complejo Catsper. En la Figura 15C se muestran trazos representativos de la fluorescencia de Fluo3 durante la determinación del *Em*. Se puede apreciar que la magnitud de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ provocados por la adición de KCl son mayores a medida que avanza la capacitación e inexistentes en la condición no capacitante (al menos a las concentraciones de KCl utilizadas) (Figuras 14D). Este comportamiento sugiere que los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ tras una depolarización son dependientes de la capacitación y por tanto del valor de *Em*. Se puede especular que, por la acción del bicarbonato, un activador de la adenilil ciclasa soluble (sAC), se elevan los niveles de AMPc, que a su vez activan a PKA (Chen *et al.*, 2000; Visconti, 2009), enzima

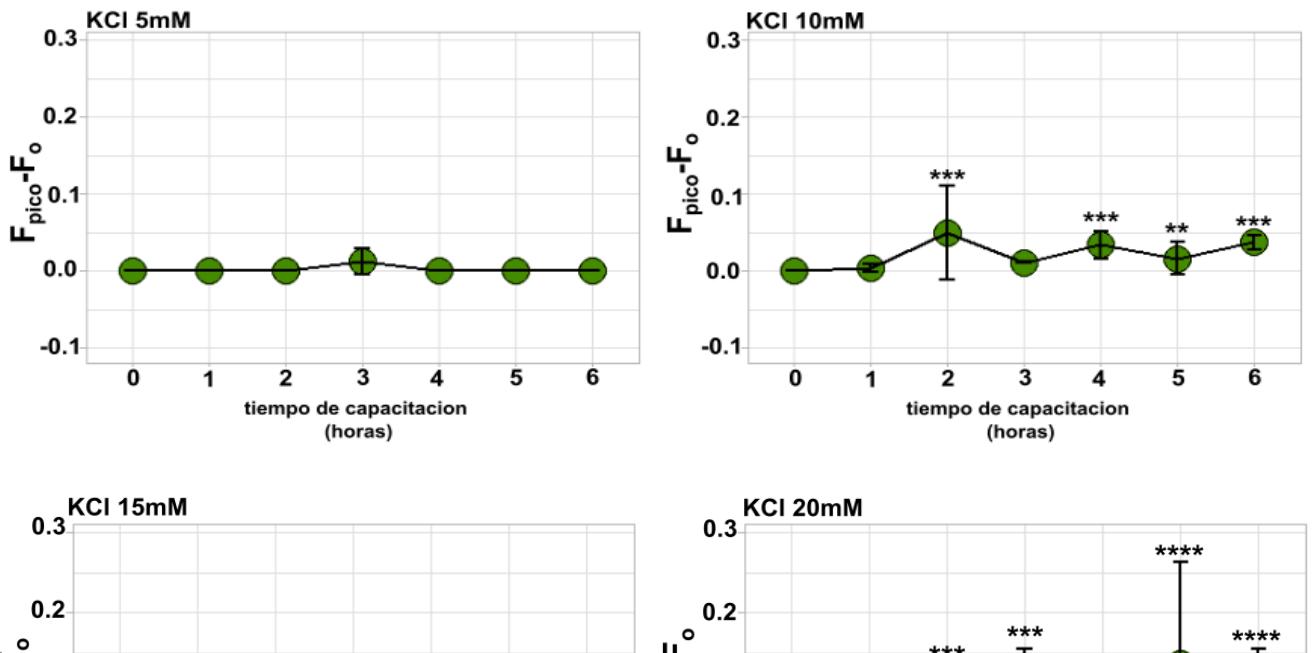
que modula la actividad de Catsper (Orta *et. al.*, 2018) (entre otras proteínas). Además, el bicarbonato al participar en el aumento de pH*i* podría sensibilizar a Catsper para responder estos pulsos despolarizantes. Lo cual explicaría que, en condiciones no capacitantes, no se presenten estos saltos (Figura 15D). Siguiendo este razonamiento esperaríamos obtener saltos de Ca^{2+} mayores a medida que la capacitación avanza tal como vemos en la Figuras 15E, donde solo basta con comparar el tiempo de capacitación 0 con el 6 y donde la magnitud del salto es al menos el doble, con excepción de la concentración más baja, donde no hubo este incremento. También se observó que la magnitud del incremento obedece un comportamiento tipo dosis-respuesta, donde a mayores concentraciones de KCl el salto es de mayor magnitud, que también es mayor a medida que ocurre la capacitación.



D



E



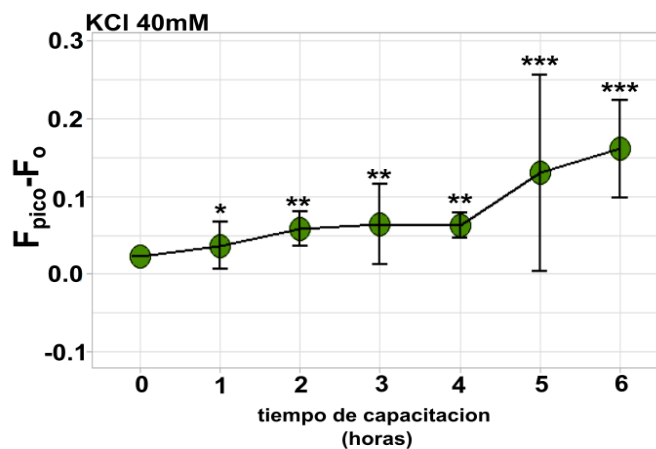


Figura 15. Análisis Multiparamétrico de la determinación del Em y dinámica $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de humano. **A)** Gráfico representativo de 3 dimensiones que representa la intensidad de fluorescencia en el eje X, el tiempo en el eje Y y la escala de colores indica la frecuencia de eventos, valores obtenidos por citometría de flujo empleando el colorante Fluo3 en espermatozoides de humano con sus respectivas adiciones en la parte superior del gráfico **B)** Trazos suavizados de la fluorescencia obtenida por Fluo3 y DiSC3(5), superpuestos para apreciar la concurrencia de los cambios de fluorescencia **C)** Cinética del comportamiento de la $[Ca^{2+}]_i$ a los pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes de la Valinomicina y KCl respectivamente, realizados durante la determinación del Em, normalizados a 0 con fines comparativos. **D)** Trazos representativos del comportamiento de la $[Ca^{2+}]_i$ obtenida de espermatozoides en condiciones no capacitantes. **E)** Valores del Pico de Fluorescencia alcanzados después de cada adición de KCl (mM: 5, 10, 15, 25 y 40), que se obtuvieron restando la fluorescencia antes de la adición: $F_{pico} - F_o$ (antes de adición). Los puntos grandes con líneas continuas indican el promedio \pm SEM. Los datos se compararon por medio de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis considerando el tiempo de capacitación como un factor. Se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn como análisis post hoc. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ contra condiciones NC.

8. LA INHIBICIÓN DE CATSPER PROVOCA UN EFECTO RETARDANTE SOBRE LA HIPERPOLARIZACIÓN DEPENDIENTE DE CAPACITACIÓN

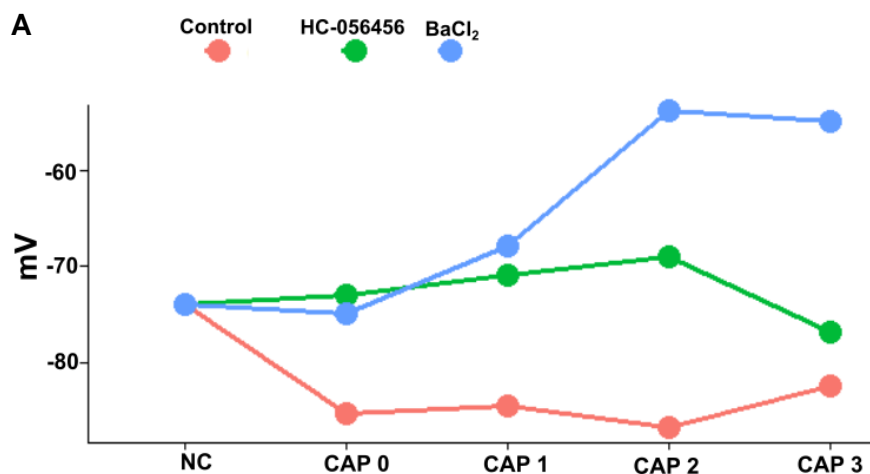
Una vez conocido el comportamiento de la $[Ca^{2+}]_i$ y del *Em*, empleamos una estrategia cuyo enfoque sea dilucidar las entidades moleculares que participan en estos procesos y así determinar cómo se relacionan el cambio en la respuesta a Pg con el potencial de membrana, para eso, decidimos utilizar inhibidores de diferentes entidades moleculares, y tratar de

responder dos preguntas globales: 1.-¿Está Catsper involucrado en la hiperpolarización? y 2.- ¿Las entidades moleculares que están involucradas en la hiperpolarización participan en la respuesta a Pg?.

Para resolver la primera pregunta empleamos un inhibidor de Catsper llamado HC-056456 a una concentración de 10µM (Orta *et. al.*, 2018), el cual se incubó durante todo el tiempo de capacitación y se monitoreó el estado del potencial de membrana durante 3 horas (que es el tiempo al cual la hiperpolarización alcanza su punto máximo). Por otro lado, se realizaron mediciones de la respuesta a Pg durante estos mismos tiempos para confirmar el efecto inhibitorio de Catsper y como control positivo de la inhibición de la hiperpolarización dependiente de capacitación empleamos Bario que es un potente inhibidor general de canales de K⁺ (López-González *et. al.* 2014), este control también nos ayudará más adelante a responder la segunda pregunta planteada en esta sección.

De forma interesante, al inhibir al canal Catsper se observó un cambio en el comportamiento del potencial de membrana durante la capacitación (figuras 16 A,B). Al compararlo con el control, notamos que los espermatozoides tratados con el inhibidor HC-056456, no logran alcanzar el máximo de hiperpolarización que se obtiene en condiciones control. Incluso se aprecia un efecto inhibitorio más potente al avanzar el tiempo de exposición a HC-056456, Este resultado confirma la relación entre la dinámica del Ca²⁺ y la hiperpolarización de la membrana plasmática, recordemos que los principales canales responsables de la hiperpolarización son los canales Slo (Slo3/Slo1) (Gutman *et. al.* 2005, López-González *et. al.*,2014 Chávez *et. al.*, 2019), estos canales se modulan por cambios en el Em, pHi y Ca²⁺, siendo Slo1 de acuerdo a la literatura, el más sensible al Ca²⁺ (Schreiber *et al.*, 1998).

Además, un experimento realizado en medio al que no se le adiciona Ca²⁺, muestra un efecto repolarizante al rebasar las 2 horas de capacitación, aunque se sabe que en la ausencia de Ca²⁺.



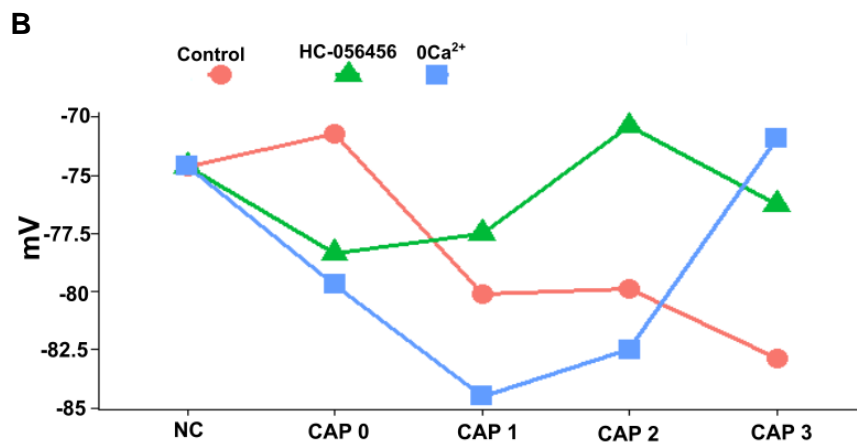


Figura 16. La hiperpolarización dependiente de capacitación requiere de la participación de Catsper. A) Cambio del potencial de membrana durante 3 hrs de capacitación empleando HC-056456(10 μ M), BaCl₂ (1mM) y control. **B)** Cambio de potencial de membrana empleando HC como en A y medio 0Ca²⁺(n:2).

Con respecto a la pregunta 2, no se apreció algún cambio en la respuesta a Pg con Ba²⁺, Slotoxina o clofilium, bloqueadores de canales que impiden la hiperpolarización (Figura 16A y 18). Cabe resaltar que el incremento [Ca²⁺]_i inducido por Pg no mostró una mayor magnitud durante las 3 hrs de incubación con Ba²⁺, algo que sí observamos en el control (Figura 17), si no que mantuvo una respuesta sostenida, sin cambios durante las 3 hrs. Se sabe que el Ba²⁺ es uno de los inhibidores (hasta ahora utilizados en este trabajo) más efectivos de la hiperpolarización dependiente de la capacitación (López-González *et. al.*, 2014) (Figura 16). Y considerando que Catsper está regulado positivamente a potenciales más despolarizantes, el efecto inhibitor del Ba²⁺ sobre el Em podría mantener a Catsper con la misma magnitud de respuesta durante las 3 horas, a pesar de encontrarse en un medio que promueve la capacitación (Figura 17, comparar línea control con línea BaCl₂).

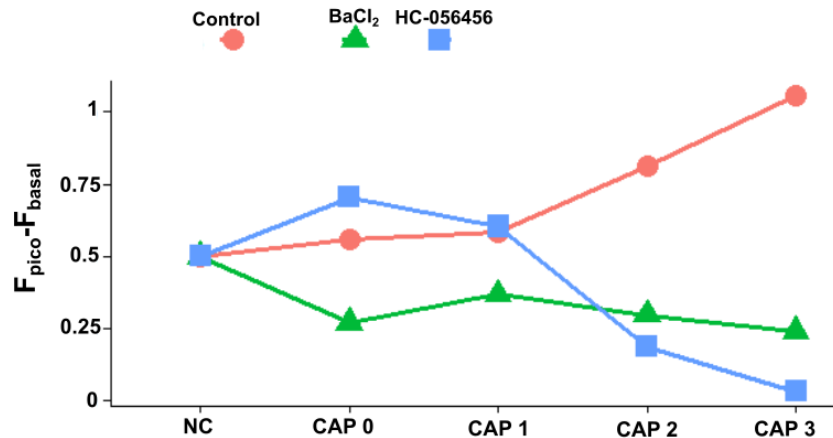


Figura 17.- La hiperpolarización dependiente de capacitación influye en la activación de Catsper por Pg. Efecto de BaCl₂ (1 mM) inhibidor general de canales de K⁺ (Verde), de HC-056450 (10μM) inhibidor Catsper (Azul) y control sin tratamiento (rosa) sobre la respuesta a Pg durante 3 hrs. de capacitación (n:2).

9. ¿ES EL CANAL SLO3 EL PRINCIPAL RESPONSABLE DE LA HIPERPOLARIZACIÓN EN ESPERMATOZOIDES DE HUMANO?

Otra pregunta importante que es tema de discusión hoy en día es definir en espermatozoide humano, cuál de los dos canales Slo, Slo1 o Slo3 es el principal responsable de la hiperpolarización asociada a la capacitación. Se sabe que los espermatozoides de ratones nulos en Slo3 (Slo3^{-/-}), son incapaces de nadar progresivamente, de hiperpolarizarse, de experimentar la reacción acrosomal y son infértiles (Santi *et al.*, 2010). Este fenotipo sugiere que Slo3 es el principal responsable de la hiperpolarización asociada a la capacitación en espermatozoides de ratón. Sin embargo, en el caso de espermatozoides de humano, aún se discute cuál es el principal responsable. Debido a que nosotros tenemos una cinética ya definida, decidimos construir una nueva cinética, pero con el objetivo de aportar información que ayude a resolver esta pregunta. Las cinéticas se realizaron durante 3 horas de capacitación (tiempo donde ocurren los cambios más significativos) empleando inhibidores farmacológicos de estos canales, la Slotoxina (Bloqueador de Slo 1) y Clofilium (Bloqueador de canales Slo3).

El resultado (aunque es preliminar) demuestra que el clofilium es un potente inhibidor de la hiperpolarización en espermatozoides de humano, demostrando incluso un efecto despolarizante al compararlo con el control. Por otro lado, la Slotoxina no tuvo ningún efecto sobre la hiperpolarización, se obtuvieron valores similares al control, aunque ya se conocía que la Slotoxina es menos eficiente que el clofilium en inhibir la hiperpolarización asociada a

capacitación (López-González *et. al.*, 2014). Este resultado preliminar (solo dos experimentos) sugiere que el principal responsable de la hiperpolarización asociada a capacitación podría ser Slo3. Por otro lado, existen otros inhibidores que planeamos explorar, con el objetivo de tener una inhibición específica de canales Slo 1 y Slo3, tales como IbTX y CbTx (Tang *et al.* 2010), esto con el fin de reforzar nuestros resultados.

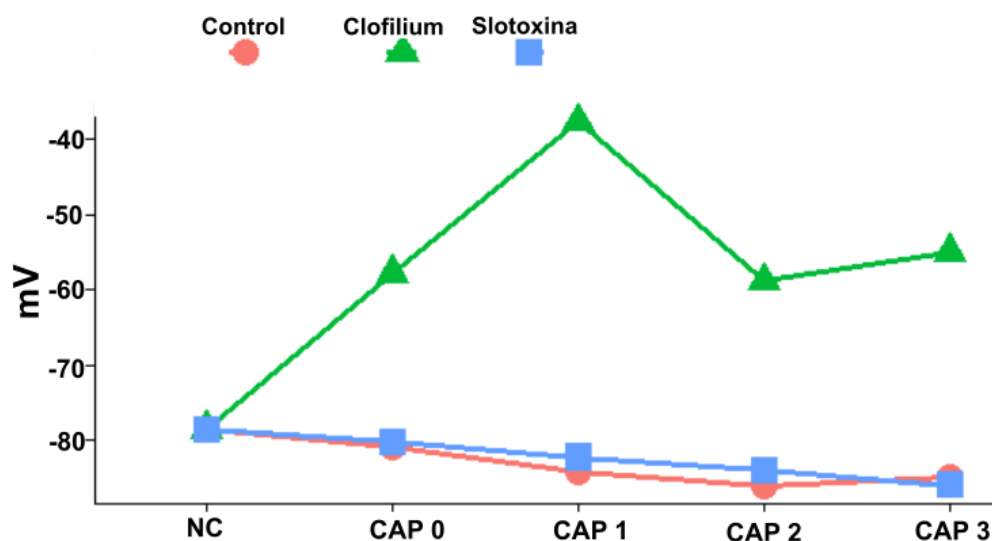


Figura 18.- El canal Slo3 es el principal responsable de la hiperpolarización dependiente de capacitación. Efecto de Clofilium (50 μ M) inhibidor de canales Slo3, Slotoxina(100nM) inhibidor de canales Slo1 y control sin tratamiento durante 3 hrs. de capacitación. (n:2)

IX. DISCUSIÓN

La capacitación es un proceso en el cual los espermatozoides adquieren su capacidad fecundante y ocurre dentro del tracto reproductor femenino, durante este proceso el espermatozoide sufrirá una serie de cambios fisiológicos dentro de los cuales están la hiperpolarización del *Em* y un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (De la Vega Beltrán *et. al.*, 2012) ambos eventos son de gran importancia para que el espermatozoide realice la RA y desarrolle una movilidad hiperactivada y de este modo lograr fecundar al ovocito, a pesar de jugar un papel importante durante el proceso de fecundación no se entiende del todo que la relación que podrían estar estos dos eventos.

El espermatozoide, como cualquier célula regula la concentración interna de iones por medio de transportadores y canales iónicos que, dependiendo el ambiente iónico o de algún estímulo (interno o externo) modificaran su permeabilidad, esto resultará en el influjo o eflujo de iones que participaran en cambios fisiológicos dentro del espermatozoides como los ocurridos durante la capacitación. En el caso del *Em* la célula tiene que balancear estos cambios en la permeabilidad iónica como resultado se produce un potencial de membrana en reposo (Stival *et. al.*, 2016) además, como ya mencionamos la célula a medida que la capacitación ocurre se hiperpolariza, es decir, este *Em* se torna más negativo, producto del cambio en el ambiente iónico y a los distintos estímulos durante la capacitación (Ej. Alcalinización pHi, incremento extracelular de la [Pg], etc.).

Por otro lado, ocurre un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Brukman *et. al.*, 2018) en el espermatozoide provocado principalmente por el canal Catsper un canal sensible a cambios en el *Em* y pHi, además es activado indirectamente por Pg. En el presente trabajo proponemos que existe una relación entre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ generado por Catsper y la hiperpolarización de la membrana plasmática, para eso determinamos el valor de *Em* absoluto, y el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Pg durante distintos tiempos de capacitación.

Si bien sabemos que la hiperpolarización es dependiente de capacitación por trabajos previos nosotros al realizarlo por citometría de flujo tenemos la certeza de que evaluamos células viables (empleando IP) y bien diferenciadas, por otro lado, a diferencia de técnicas como la espectrofluorometría donde medimos la fluorescencia del medio, por citometría se mide lo que pasa en cada célula. Con esto López-González y colaboradores en el 2014 encontraron que solo una subpoblación de células logra hiperpolarizarse. Con esto, construimos una cinética del comportamiento del *Em* determinándolo cada hora durante 6 horas de capacitación. Los resultados obtenidos indican que los espermatozoides de humano experimentan una hiperpolarización durante la capacitación, esto en concordancia con los resultados ya conocidos (Muñoz-Garay *et. al.*, 2001, Baro *et. al.*, 2020). Observamos que las condiciones capacitantes promueven la hiperpolarización de la membrana plasmática obedeciendo un comportamiento tiempo dependiente, ya que desde el tiempo inicial (0 horas) las células experimentan una hiperpolarización que se incrementa hasta llegar a su máximo valor a las 3 hrs de capacitación, seguida de una fase estacionaria, la cual se mantiene durante el resto de la incubación (Figura 13A y B) teniendo un valor inicial promedio de -60mV hasta su máximo de -85mV. Estos valores son consistentes con los obtenidos por nuestro grupo (Matamoros-

Volante *et. al.*, 2020) y otros (Puga-Molina *et. al.*, 2020) que terminaron E_m en espermatozoides de humano a un tiempo de capacitación por citometría de flujo, pero difieren a los obtenidos por Baro y colaboradores en el 2020 durante 5 hrs de capacitación empleando Fluorometría obteniendo un valor promedio de -28mV al inicio de la capacitación y -38mV al final, por lo que factores como la mortalidad celular, el hecho de que solo un porcentaje de células logra capacitarse, entre otras, desestiman el valor de E_m final.

Confirmamos que la hiperpolarización observada es producto de la capacitación, ya que aquellas células en condiciones no capacitantes no mostraron un cambio significativo, cuando se incubaron por 4 horas en condiciones que no promueven la capacitación (Figura 13C). Cabe resaltar un punto muy importante y es la heterogeneidad de los valores, ya que a pesar de que todos siguen la misma tendencia a hiperpolarizarse lo hacen siguiendo un patrón distinto, reflejando la importancia de los análisis en población ya que un grupo de células no refleja el compartimentito real de toda la población. Existen dos vías principales que contribuyen en la hiperpolarización de espermatozoide 1) el aumento de la corriente K_{sper} que es provocada por canales de K^+ Slo1/Slo3 (Mannowetz *et. al.*, 2013) que provoca una extrusión de iones K^+ , y 2) La disminución de la $[Na^+]_i$. Por parte del Na^+ sabemos que al inhibir (por ejemplo) con amilorida al canal ENaC se produce una hiperpolarización (Kong *et a.*,2009), aunque la participación del Na^+ podría tener un papel más importante en el establecimiento del E_m antes de capacitación debido a que la potencial de equilibrio del Na^+ es alrededor de -55 mV, es decir que la célula al alcanzar ese valor de E_m ya no podrá movilizar Na^+ , y la célula alcanza valores de alrededor de -85mV donde no tendría un aporte significativo. Por otro lado, el potencial de equilibrio del K^+ es de alrededor de -89mV lo cual lo coloca como el principal ion responsable de la hiperpolarización y a su vez a los canales Slo1/Slo3, además Chávez y colaboradores en el 2013 encontraron que la permeabilidad de K^+ (P_k) incrementa unas 5 veces durante la capacitación, reafirmando su posición como el principal responsable de la hiperpolarización dependiente de capacitación.

Como ya mencionamos las principales entidades moleculares responsables de la hiperpolarización en los espermatozoides de humano son los canales Slo3 y Slo1 (López-González *et. a.*, 2014), en el presente trabajo empleamos inhibidores farmacológicos de estos canales, la slotoxina (inhibidor de Slo1) y el clofilium (inhibidor de Slo3) durante 3 hrs. De capacitación ya que ese tiempo observamos que alcanza su valor máximo (Figura13). Se encontró que el canal Slo3 es el principal responsable de la hiperpolarización en espermatozoides de humano, ya que este provoca una potente inhibición durante las 3 horas de capacitación (Figura 18) respecto al control y la Slotoxina prácticamente no tuvo un efecto

significativo, con esto Slo3 podría ser el principal canal responsable de la capacitación, en espermatozoides de humano, al igual que en ratón donde se demostró que espermatozoides de ratones nulos a Slo3 son incapaces experimentar la RA, de nadar progresivamente y no logran hiperpolarizarse (Santi *et. al.*, 2010), aunque no se descarta la participación de otros canales de K⁺ en este proceso, ya que en el espermatozoide presenta una amplia variedad que están regulados por distintos mecanismos, ya que al inhibir con un bloqueador general de canales de K⁺ el BaCl₂, también se presenta una inhibición de ~40% durante las 3 horas de capacitación (Figura 16A).

Como ya se mencionó, la Pg tiene la capacidad de activar al canal Catsper (de forma indirecta) y provocar un incremento en la [Ca²⁺]_i (Lishko P. *et. al.*, 2011), dicho evento es necesario para desarrollar procesos fisiológicos importantes durante la fecundación, como la hiperactivación de la movilidad y la RA entre otros (Darszon *et. al.*, 2011). Al igual que con el Em realizamos una cinética de la respuesta a Pg durante 6 horas de capacitación (Figura 11A). Observamos que el incremento máximo en la [Ca²⁺]_i por Pg lo obtenemos a las 2 horas de capacitación (Figura 11C), seguida de una disminución significativa. Al analizar otros parámetros cinéticos como el área bajo la curva tenemos un comportamiento similar. posiblemente debido al incremento de la [Ca²⁺]_i basal producto del proceso de capacitación (Brukman *et. al.*, 2020; Figura 4B). Al medir la rapidez de la respuesta al inicio (Figura 11B) vemos que el cambio más importante es entre los espermatozoides incubados en medio NC y aquellos incubados en medio CAP, ya que esta última condición no parece tener un efecto tiempo-dependiente. Por otro lado, la rapidez de recuperación, como se observa en la figura 11D que la recuperación más rápida es la de los NC al tiempo 0 y 6, tornándose más lenta al estar capacitados, lo cual se caracteriza por una pendiente menos inclinada. Estos resultados sugieren que Catsper tiene una velocidad de apertura más rápida y se mantiene abierto por más tiempo en condiciones capacitantes. Un punto importante a resaltar en la determinación del incremento de [Ca²⁺]_i inducido por Pg que a diferencia de la determinación del Em realizamos una centrifugación con fin de lavar la albumina presente en el medio CAP que suprime el efecto de la ionomicina (Figura 10A) sin embargo esta centrifugación esta acompañada de un efectos secundarios, como la “repolarización” de la célula a valores no capacitantes (Figura 11), si bien este valor se “reestablece” el comportamiento cinético anteriormente mencionado no se altera. Sugiriendo que la célula ya experimento los cambios generados por la hiperpolarización a ese tiempo de capacitación.

Durante la determinación de la respuesta a [Ca²⁺]_i por el estímulo de Pg y la determinación

del E_m se adquirió simultáneamente la fluorescencia emitida por la sonda potenciométrica DiSC₃(5) y Fluo3 (Figura 12 B). Estas mediciones nos revelaron lo relacionados que podrían estar estos parámetros ya que la Pg produce una hiperpolarización de la membrana en espermatozoides capacitados y no capacitados, además, la ionomicina que también incrementa la $[Ca]_i$ desencadena una hiperpolarización más intensa. Este incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ podría estar activando a los canales Slo (3/1) ya que dichos canales presentan un dominio de unión a Ca^{2+} y así provocar la hiperpolarización por la salida de K^+ (Geng T. *et. al.*, 2017) dicha hiperpolarización se hace menos evidente a medida que la capacitación ocurre debido al incremento $[Ca^{2+}]_i$ basal durante capacitación, efecto que se observa también en la respuesta a Pg si observamos la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 11C).

Es interesante que este incremento de la fluorescencia de DiSC₃(5) se induce también por la adición de $MnCl_2$, pero la razón nos es desconocida aún, aunque podemos descartar que sea un artefacto de adición ya que empleando espectrofluorimetría no observamos ningún cambio en la fluorescencia del medio (Figura 12C). Por otro lado, durante la determinación del E_m provocan se indican una hiperpolarización con valinomicina seguida de pulsos despolarizantes provocadas por las adiciones de KCl, observamos que estas adiciones también provocan cambios en la $[Ca]_i$ algo que ya fue reportado (Ferreira *et. al.*, 2021) donde la hiperpolarización provoca una disminución de la concentración y los pulsos despolarizantes la incrementan de forma transitoria. (Figura 14 A y B). Se puede apreciar que la magnitud de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ provocados por la adición de KCl son mayores a medida que avanza la capacitación e inexistentes en la condición no capacitantes (al menos a las concentraciones de KCl utilizadas) (Figuras 14D). Esto sugiere que los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ provocados por depolarización son dependientes de la capacitación y por tanto del valor de E_m . Se puede especular que, por la acción del bicarbonato, un activador de la adenilil ciclasa soluble (sAC), se elevan los niveles de AMPc, que a su vez activan a PKA (Chen *et al.*, 2000; Visconti, 2009), enzima que modula la actividad de Catsper (Orta *et. al.*, 2018) (entre otras proteínas). Además, el bicarbonato al participar en el aumento de pHi, podría sensibilizar a Catsper para responder estos pulsos despolarizantes. Lo cual explicaría que, en condiciones no capacitantes, no se presenten estos saltos (Figura 14D). Siguiendo este razonamiento esperaríamos obtener saltos de Ca^{2+} mayores a medida que la capacitación avanza tal como vemos en la Figuras 14E.

Experimentos empleando inhibidores de las entidades encargadas la hiperpolarización dependiente de capacitación (Slo3/Slo1) y de Catsper con el fin de determinar la participación de un parámetro sobre el otro a nivel molecular y temporal. Encontramos que el inhibidor de Catsper llamado HC-056456 (Orta *et. al.*, 2018), el cual se incubó durante 3hrs. de

capacitación impide el máximo de hiperpolarización que se obtiene en condiciones control (figuras 16 A,B). Incluso se aprecia un efecto tiempo-dependiente. Mostrando la relevancia de los cambios en la $[Ca^{2+}]$ y del canal Catsper sobre la hiperpolarización del Em, recordemos que los principales canales responsables de la hiperpolarización son los canales Slo (Slo3/Slo1) (Gutman *et. al.* 2005, López-González *et. al.*,2014 Chávez *et. al.*, 2019), y son modulados por cambios en el Em y pHi y Ca^{2+} , aunque esto muestra la importante participación que podría tener el Ca^{2+} en su regulación. Además, un experimento realizado en medio al que no se le adiciona Ca^{2+} , muestra un efecto repolarizante al rebasar las 2 horas de capacitación, aunque se sabe que en la ausencia de Ca^{2+} , el ion Na^{2+} aumenta su permeabilidad provocando una despolarización por otra vía, aunque Mannowetz y colaboradores en 2013 por medio de electrofisiología observaron que la corriente Ksper se disminuye significativamente, en medio sin Ca^{2+} . Aún existe debate sobre cual canal Slo1/Slo3 es más importante en generar esta corriente en el espermatozoide de humano, no obstante, basado en nuestros resultados proponemos al canal Slo3 como el mejor candidato, no obstante, se requieren más estudios para confirmarlo.

Los resultados obtenidos sugieren que existe un sistema de regulación entre la dinámica del Ca^{2+} intracelular y el Em durante capacitación, dirigida por el canal de Ca^{2+} Catsper y el canal de K^+ Slo3 respectivamente, dichos canales se encuentran funcionalmente próximos ya que se encuentran distribuidos a lo largo del flagelo (Mannowetz *et. al.*, 2013), que les permite establecer una regulación temporal durante la capacitación, además de ser sensibles a cambios en provocados por el otro como se ha mencionado anteriormente. Es necesario investigar más para conocer más a fondo la retroalimentación entre estos dos parámetros.

X. CONCLUSIONES

1. Existe un mecanismo de retroalimentación positiva entre el incremento en la concentración de calcio intracelular provocada principalmente por Catsper y la hiperpolarización dependiente de capacitación en espermatozoides de humano.
2. La hiperpolarización del potencial de membrana dependiente de capacitación esta regulada principalmente por el canal Slo3.

3. El aumento máximo del $[Ca^{2+}]_i$ intracelular estimulado por Pg, esta influenciado por la hiperpolarización dependiente de capacitación.
4. Los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ provocados por pulsos despolarizantes (KCl) **parecen** ser dependientes de capacitación
5. La centrifugación tiene un efecto despolarizante en espermatozoides capacitados, además de eliminar los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados

XI. PERSPECTIVAS

1. Emplear una batería de inhibidores de canales más extensa y así evaluar sus efectos en parámetros como $[Ca^{2+}]_i$, Em y pH (por ejemplo, IbTX y CbTx).
2. Realizar una cinética de pH durante capacitación y relacionarla con los cambios de Em y de $[Ca^{2+}]_i$.

XII. REFERENCIAS

Barratt C. L. R., Lars Björndahl, Christopher J De Jonge, Dolores J Lamb , Francisco Osorio Martini , Robert McLachlan , Robert D Oates , Sheryl van der Poel , Bianca St John Mark Sigman , Rebecca Sokol, Herman Tournaye , (2017). The diagnosis of male infertility: An analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. Hum. Reprod. Update 23, 660–680.

Baro Graf C, Ritagliati C, Torres-Monserrat V, Stival C, Carizza C, Buffone MG and Krapf D (2020) Membrane Potential Assessment by Fluorimetry as A Predictor Tool of Human Sperm Fertilizing Capacity. Front. Cell Dev. Biol. 7:383. doi: 10.3389/fcell.2019.00383.

C. Ritagliati, C. Baro, C. Stival, D. Krapf, (2018). Mechanisms of Development Regulation

mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mech. Dev.* 154, 33–43.

Brenker, C., Zhou, Y., Muller, A., Echeverry, F.A., Trotschel, C., Poetsch, A., Xia, X.M., Bonigk, W., Lingle, C.J., Kaupp, U.B., Strunker, T., (2014). The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3. *elife* x, 1–19.

Brown, S.G.; Publicover, S.J.; Mansell, S.A.; Lishko, P. V.; Williams, H.L.; Ramalingam, M.; Wilson, S.M.; Barratt, C.L.R.; Sutton, K.A.; Da Silva, S.M., (2016) Depolarization of sperm membrane potential is a common feature of men with subfertility and is associated with low fertilization rate at IVF. *Hum. Reprod.* 31, 1147–1157, doi:10.1093/humrep/dew056.

Brukman, N. G., Nuñez, S. Y., Puga Molina, L. del C., Buffone, M. G., Darszon, A., Cuasnicu, P. S. and Da Ros, V. G. (2019). Tyrosine phosphorylation signaling regulates Ca²⁺ entry by affecting intracellular pH during human sperm capacitation. *J. Cell. Physiol.* 234, 5276–5288.

Clapham D., (2013). Human sperm cells rely on an unusual type of potassium ion channel. *eLife* 2013;2:e01469.

Clapham D. y Hulse R. (2021). Sperm ion channel swims into sharper focus . *Nature*, Vol.595 654-655.

Chávez, J.C., Ferreira, J.J., Butler, A., De La Vega Beltrán, J.L., Treviño, C.L., Darszon, A., Salkoff, L., Santi, C.M., (2014) SLO3 K⁺ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *J. Biol. Chem.* 289, 32266–32275.

Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin, L. R., et al. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289, 625–628. doi: 10.1126/science.289.5479.625.

Darszon A., Nishigaki T., Beltran C., Trevino C. (2011), Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol. Rev.* **91**, 1305– 1355.

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. *J. Biol. Chem.* 287, 44384–44393.

D. Ren, *et al.* (2001)., A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603–609.

Ganong; Fisiología medica; 23^a Edición; Editorial Mc Graw Hill; 2010; Págs.: 397- 420.

Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W., Wang, X., 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 473–508.

Geng Y., Juan J. Ferreira, Victor Dzikunu, Alice Butler, Pascale Lybaert, Peng Yuan, Karl L. Magleby, Lawrence Salkoff, Celia M. Santi,(2017). A genetic variant of the sperm-specific SLO3 K⁺ channel has altered pH and Ca²⁺ sensitivities, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 292, Issue 21, Pages 8978-8987, ISSN 0021-9258.

Kao P.J., Li G. and Auston D., (2010). Practical Aspects of Measuring Intracellular Calcium Signals with Fluorescent Indicators. *Methods in Cell Biology*, Vol. 99, Chapter 5, p. 113-153.

Kelly, M.C.; Brown, S.G.; Costello, S.M.; Ramalingam, M.; Drew, E.; Publicover, S.J.; Barratt, C.L.R.; Da Silva, S.M. Single-cell analysis of [Ca²⁺] _i signalling in sub-fertile men: characteristics and relation to fertilization outcome. *Hum. Reprod.* 2018, 33, 1023–1033, doi:10.1093/humrep/dey096.

Kirichok, Y., Navarro, B., Clapham, D.E., 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* 439, 737–740.

Lin S., Ke M., Zhang Y., Yan., Wu J., 2021 Structure of mammalian sperm cation channel complex. *Nature*, Vol.595, 746-750.

Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Fedorenko, A., Kirichok, Y., 2010. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 140, 327–337.

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. *Mol. Hum. Reprod.* 20, 619–629.

Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Kirichok, Y., 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* 471, 387–392.

Mannowetz N. aidooSeung N. ChooJames S., Lishko P. (2013) Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa *eLife* 2:e01009.

Matamoros-Volante, A.; Castillo-Viveros, V.; Torres-Rodríguez, P.; Treviño, M.B.; Treviño, C.L. (2020) Time-Lapse Flow Cytometry: A Robust Tool to Assess Physiological Parameters Related to the Fertilizing Capability of Human Sperm. *Int. J. Mol. Sci.* , 22, 93.

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, jcs238816.

Mayorga, L.S., Tomes, C.N., Belmonte, S.A., 2007. Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* 286–292.

Miller, M.R., Mannowetz, N., Iavarone, A.T., Safavi, R., Gracheva, E.O., Smith, J.F., Hill, R.Z., Bautista, D.M., Kirichok, Y., Lishko, P.V., 2016. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science* 352, 555–559.

Moreno-Irusta, A., Kembro, J.M., Domínguez, E.M. et al. (2019). Sperm physiology varies

according to ultradian and infradian rhythms. *Sci Rep* 9, 5988.

Munoz-Garay C, De la Vega-Beltran JL, Delgado R, Labarca P, Felix R, Darszon A (2001) Inwardly Rectifying K⁺ Channels in Spermatogenic Cells: Functional Expression and Implication in Sperm Capacitation *Dev Biol* 234:261–274.

Nadine Mundt, Marc Spehr, Polina V Lishko (2018) TRPV4 is the temperature-sensitive ion channel of human sperm. *eLife* 2018;7:e35853.

Orta, G., de la Vega-Beltran, J. L., Martin-Hidalgo, D., Santi, C. M., Visconti, P. E., and Darszon, A. (2018). CatSper channels are regulated by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 293, 16830–16841. doi: 10.1074/jbc.RA117.001566.

Puga Molina LC, Gunderson S, Riley J, Lybaert P, Borrego-Alvarez A, Jungheim ES and Santi CM (2020) Membrane Potential Determined by Flow Cytometry Predicts Fertilizing Ability of Human Sperm. *Front. Cell Dev. Biol.* 7:387. doi: 10.3389/fcell.2019.00387.

Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA, Clapham DE. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jan 23;104(4):1219-23. doi: 10.1073/pnas.0610286104. Epub 2007 Jan 16. PMID: 17227845; PMCID: PMC1770895.

Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 9;100(25):14869-74.

Rahban, R., Nef, S., CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa, *Molecular and Cellular Endocrinology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110951>.

Santi, C.M., Martínez-López, P., de la Vega-Beltrán, J.L., Butler, A., Alisio, A., Darszon, A., Salkoff, L., 2010. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett.* 584, 1041–1046.

Suarez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 52: 455–462, 2008.

Suarez SS, Varosi SM, Dai X. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4660–4664, 1993.

Tang Q-Y, Zhang Z, Xia X-M, Lingle CJ. Block of mouse Slo1 and Slo3 K⁺ channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine. *Channels* 2010; 4:22–41.

Visconti, P. E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 667–668. doi: 10.1073/pnas.0811895106.

World Health Organization . WHO laboratory manual for the human semen . WHO Press 2010 FIFTH EDIT : 286.

Yang F, Gracia Gervasi M, Orta G, Tourzani DA, De la Vega-Beltrán JL, Ruthel G, Darszon A, Visconti PE, Wang PJ. C2CD6 regulates targeting and organization of the CatSper calcium channel complex in sperm flagella. *Development*. 2022 Jan 15;149(2):dev199988. doi: 10.1242/dev.199988. Epub 2022 Jan 14. PMID: 34919125.