



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“El papel de la NADPH oxidasa (Nox5) durante la capacitación en espermatozoides de humano”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Mariana Beatriz Olivares Urbano

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Salas Vidal
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Darío Krapf
Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, UNR

Cuernavaca, Morelos, mayo 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Consorcio de Fisiología del Espermatozoide, del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Mor.), bajo la dirección de la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz.

FINANCIAMIENTO

Para la realización de este proyecto de maestría se contó con la Beca de la Coordinación General de Estudios de Posgrado (CGEP) y con el apoyo del donativo DGAPA-PAPIIT IN207122.

Agradecimientos Profesionales

- * A mi tutora, la Dra. Claudia Treviño por todo su apoyo, compromiso, guía y confianza que ha depositado en mí durante este tiempo, es una jefa y tutora excepcional, me siento muy agradecida por pertenecer a su grupo.
- * A los líderes académicos del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide: el Dr. Alberto Darszon y el Dr. Takuya Nishigaki, e investigadores asociados: la Dra. Carmen Beltrán, al Dr. Julio Chávez y al Dr. Ignacio López, por brindarme su asesoría, consejos y observaciones siempre para mejorar mi trabajo y mi formación, he aprendido muchísimo de cada uno de ustedes.
- * A los técnicos académicos la M. Paulina Torres, la M. Yoloxóchitl Sánchez, el Biol. José Luis de la Vega, el M. Andrés Saralegui, la Dra. Verónica Rojo y al Dr. Arturo Pimentel, por su disponibilidad y asesoría en el uso de equipos y técnicas utilizadas en este proyecto.
- * A todos los miembros del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide, por los comentarios y aportaciones realizados a mi proyecto, siempre me ayudaron a tener otra perspectiva del trabajo.
- * A Shirley E. Ainsworth Gore y Omar Arriaga encargados de la Unidad de Biblioteca de la UNAM; al M. Arturo Ocadiz Ramírez, al M. David Santiago Castañeda Carreón, al M. Juan Manuel Hurtado Ramírez y al Ing. Roberto Pablo Rodríguez Bahena, miembros de la Unidad de Cómputo del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por su eficiencia, disposición y siempre estar pendientes de las solicitudes que realizamos los estudiantes.
- * Al Dr. Darío Krapf y al Dr. Enrique Salas, miembros de mi comité tutorial por sus aportaciones, por estar pendientes del desarrollo del proyecto, así como de mi aprendizaje, las discusiones siempre fueron muy enriquecedoras.
- * A los miembros de mi comité revisor, el Dr. Luis Cárdenas, Dra. Lorraine Jaimes, Dra. Claudia Sánchez, Dr. Carlos Muñoz y Dr. Juan José Acevedo, por sus valiosas observaciones sobre el proyecto, así como su disposición para discutirlos.
- * Al Dr. Darío Krapf y a su grupo de investigación, por recibirme tan gentilmente en su laboratorio, por su disposición para ayudarme, discutir los resultados y siempre brindarme su apoyo durante mi estadía en Rosario.
- * Al Dr. Arturo Matamoros, que tuvo una gran contribución en mi proyecto y en mi formación, así como por su guía y disposición para discutir antecedentes y resultados, que fueron fundamentales en este trabajo.

- * Por último, al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por otorgarme apoyo económico para la realización de una estancia en el Laboratorio de Cascadas de Señalización, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Argentina.

Agradecimientos Personales

- * A Arturo mi pareja y mejor amigo, que siempre ha estado enseñándome y apoyándome en todo este tiempo. Me encanta el camino que hemos trazado juntos, en el que hemos crecido académica y personalmente, cada día que aprendemos algo nuevo nos emociona compartirlo con el otro. Te admiro mucho y eres una gran inspiración para mi desarrollo como científica.
- * A mi familia, que siempre ha apoyado mis decisiones y está pendiente de mi desarrollo profesional. A mis padres a los que admiro muchísimo y siempre me han enseñado a trabajar duro por lo que quiero, a esforzarme y siempre dar lo mejor de mí. A mis hermanos, que han crecido personal y profesionalmente, me siento orgullosa de ustedes.
- * A mi tutora Claudia Treviño, una mujer admirable y una gran científica, que ha impulsado mi desarrollo personal y académico, siempre apoyando mis intereses. Agradezco infinitamente su apoyo como tutora y como amiga, le tengo muchísimo aprecio.
- * A mis amigos Hiram, Emmi, Erika y Dany por pasar momentos increíbles a su lado, siempre apoyándonos entre sí, los quiero mucho amigos.
- * A mis amigos rosarinos, Ani, Cintu, Fran, Tomy, Mica, Iña, Ida, Flor, Agus, Cande, Ernest, Caro, por ser tan increíbles conmigo y hacer mi estancia en Rosario inolvidable. A pesar de que convivimos poco tiempo, los considero grandes amigos, los quiero mucho y espero que más adelante pueda visitarlos nuevamente.
- * A los miembros que conforman el Mexican Bioimaging Workshops, entre ellos al Dr. Adán Guerrero y su grupo, por brindarme la oportunidad de ser parte de esta comunidad tan grande y con personas dispuestas a compartir el conocimiento, que llevan a crear lazos nacionales e internacionales.

Índice de Contenido

Abreviaturas	7
Resumen	9
Introducción	10
<i>El Espermatozoide de Humano</i>	10
<i>La Capacitación</i>	11
<i>Especies reactivas de oxígeno durante la Capacitación</i>	12
<i>Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidasa 5 (Nox5)</i>	12
<i>Interacción de Nox5 con otras proteínas en el espermatozoide</i>	15
<i>Posible participación de Nox5 en procesos asociados a la capacitación</i>	16
Hipótesis	18
Objetivo General	19
Objetivos Particulares	19
Metodología	19
<i>Obtención de muestras.</i>	19
<i>Medio de Cultivo HTF (Human Tubal Fluid).</i>	19
<i>Medio de Cultivo TYH (Toyoda- Yokoyama- Hosi)</i>	19
<i>Preparación de muestras de espermatozoides de humano.</i>	20
<i>Obtención de muestras de espermatozoides de ratón cepa C57BL/6</i>	20
<i>Western Blot</i>	20
<i>Inmunofluorescencia de células en suspensión</i>	21
<i>Inmunofluorescencia de células adheridas</i>	22
<i>Adquisición de imágenes por microscopía confocal</i>	22
<i>Adquisición de datos por citometría de flujo acoplada a imágenes</i>	23
<i>Análisis de datos obtenidos por citometría de flujo con imágenes</i>	23
<i>Medición de O₂ por citometría de flujo acoplada a imágenes</i>	24
<i>Medición de la movilidad por medio del sistema Open CASA (Analizador de Esperma Asistido por Computadora)</i>	24

<i>Evaluación del Ca^{2+} y exocitosis acrosomal por medio de imágenes individuales de espermatozoides</i>	25
<i>Análisis Estadístico</i>	26
Resultados	26
<i>Detección de Nox5 por medio de Western Blot</i>	26
<i>Detección de Duox 1 en espermatozoides de humano</i>	29
<i>Localización de Nox5 en el espermatozoide de humano por medio de inmunofluorescencia</i>	30
<i>Control negativo de Nox5 en espermatozoides de ratón</i>	36
<i>Evaluación de O_2^- en espermatozoides de humano por medio de la citometría de flujo acoplada a imágenes</i>	36
<i>Medición de la movilidad bajo el efecto de la inhibición de Nox5 en condiciones NC y CAP</i>	39
<i>Evaluación del Ca^{2+} y de la exocitosis acrosomal en presencia de inhibidores de Nox</i>	40
Discusión	44
<i>Nox5 y Duox1 están presentes en el espermatozoide de humano</i>	44
<i>La producción O_2^- debido a Nox5, depende del Ca^{2+} intracelular</i>	46
<i>Nox5 no participa en la movilidad espermática</i>	47
<i>Nox5 podría estar participando en la regulación del estado capacitado</i>	47
Conclusiones	48
Perspectivas	48
Figuras Suplementarias	49
Información Complementaria	54
<i>Soluciones para Western Blot</i>	54
Referencias	55
Índice de Figuras	
Figura 1. Esquema de la morfología del espermatozoide humano.	11
Figura 2. Topología de los segmentos transmembranales, intracelulares y motivos funcionales de la enzima NADPH oxidasa 5.	14
Figura 3. Modelo propuesto de la vía de señalización de Nox5 en el espermatozoide humano.	18
Figura 4. Detección de Nox5 por medio de Western Blot en espermatozoides humanos.	28

Figura 5. Detección de Duox1 por medio de Western Blot en espermatozoides humanos.	30
Figura 6. Localización de Nox5 con el anticuerpo N-terminal y C-terminal en condiciones NC y CAP por microscopía confocal.	32
Figura 7. Localización de Nox5 con el anticuerpo N-terminal y C-terminal en condiciones NC y CAP por citometría de flujo acoplada a imágenes.	34
Figura 8. Medición de O₂⁻ por medio de la citometría de flujo acoplada a imágenes en espermatozoides humanos bajo distintos estímulos.	38
Figura 9. Evaluación de la movilidad de espermatozoides en presencia de inhibidores de Nox.	40
Figura 10. Registros de Ca²⁺ en imágenes de células individuales en presencia de GKT.	42
Figura 11. Determinación de la exocitosis acrosomal en imágenes de células individuales en presencia de inhibidores de las Nox.	43

Figuras Suplementarias **49**

Figura S1. Modelo de la proteína Nox5 con sus dominios y secciones de reconocimiento de los anticuerpos.	49
Figura S2. Controles con anticuerpos secundarios y con espermatozoides de ratón.	50
Figura S3. Alineamiento de secuencias de Duox1/2 y la secuencia del anticuerpo Nox5 C-terminal.	51
Figura S4. Controles de inmunofluorescencia con anticuerpos secundarios.	52
Figura S5. Inmunofluorescencia contra Nox5 en espermatozoides de ratón.	53

Abreviaturas

A23187	Ionóforo de Calcio
ADN	Ácido desoxirribonucleótido
ALH	Amplitud lateral de la cabeza
ARNm	Ácido ribonucleótido mensajero
BSA	Albúmina sérica de bovino
CAP	Medio Capacitante
CASA	Analizador de esperma asistido por computadora
CCCP	Carbonil cianuro-m-clorofenilhidrazona
CO ₂	Dióxido de carbono
Ca ²⁺	Ión de Calcio
CaM	Calmodulina
Cat	Enzima Catalasa

Ch	Canal de Fluorescencia
DHE	Dihidroetidio
DMSO	Dimetil disulfóxido
DPI	Difenilenyodonio, inhibidor general de las NADPH oxidasas
Duox1	Dual oxidasa 1
e ⁻	Electrón
FAD	Flavín Adenin Dinucleótido
GKT	Pirazolo-piridindiona, inhibidor de Nox1 y 4
H ⁺	Catión Hidrógeno o Protón
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCO ₃ ⁻	Anión Bicarbonato
HTF	Medio oviductal humano
Hv1	Canal de protones activado por voltaje
LIN	Linearidad
NADP ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato reducido
NC	Medio No Capacitante
Nox5	Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato Oxidasa 5
O ₂ ⁻	Anión Superóxido
PBR	Sitio polibásico
PBS	Bufer de fosfato salino
PI	Ioduro de propidio
PKA	Proteína Cinasa A
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Pg	Progesterona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
sAC	Adelinil ciclasa soluble
T.A.	Temperatura ambiente
TBS	Bufer tris salino
Thim	Thimerosal
TYH	Medio oviductal para espermatozoides de ratón
VCL	Velocidad curvilínea
X	Xantina, sustrato de XO
XO	Enzima Xantina oxidasa

Resumen

El espermatozoide humano culmina con su maduración, dentro del tracto reproductor femenino, en donde experimenta una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos, que le permiten adquirir la habilidad para fecundar. Al conjunto de estos procesos se le conoce como Capacitación.

Durante la capacitación se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), que podrían ser necesarios para que ocurra la capacitación. Anteriormente, se demostró que en el espermatozoide humano existe una oxidasa de NADPH (Nox) que genera O_2^- (un tipo de ROS) y cuya función depende de Ca^{2+} (un catión fundamental para el funcionamiento de este tipo celular). Mediante técnicas inmunológicas se encontró a la Nox5 como posible candidata, aunque se desconoce el rol de esta durante la capacitación. En este trabajo se encontró que además de Nox5, en el espermatozoide humano también se expresa la Dual-Oxidase 1 (Duox1) otra enzima sensible a Ca^{2+} perteneciente a la familia de las Nox. Para elucidar el papel de Nox5/Duox1 en la capacitación, los espermatozoides se incubaron en presencia de inhibidores farmacológicos de estas enzimas (DPI y GKT136901), se reafirmó la observación de que existe un aumento de O_2^- tras un aumento del Ca^{2+} intracelular producido por el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina, el cual fue parcialmente bloqueado por el DPI y el GKT. De igual manera, se observó un aumento de O_2^- tras la estimulación con progesterona (Pg, hormona femenina que activa indirectamente al canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide CatSper), el cual se redujo en presencia de los inhibidores de Nox5/Duox1.

Se realizó un análisis de la movilidad espermática asistido por computadora mediante el cual se encontró que la inhibición de Nox5/Duox1 no afectó ni a la movilidad total ni previno el desarrollo de la movilidad hiperactivada.

Por otro lado, se realizaron experimentos de medición de Ca^{2+} intracelular en espermatozoides individuales, en donde se encontró que el tratamiento con DPI y GKT potencia el efecto de la Pg. Por último, se evaluó el efecto de estos inhibidores en la exocitosis acrosomal inducida por la Pg. Se encontró que únicamente en condiciones capacitantes, la inhibición de estas enzimas impedía que se lleve a cabo la exocitosis acrosomal.

En conjunto, estos resultados sugieren que la producción de O_2^- por la Nox5/Duox1 tiene un participación en algunos procesos asociados a la capacitación y aparentemente es necesaria para que ocurra la exocitosis acrosomal inducida por Pg.

Introducción

La fecundación es el evento más importante para la preservación de las especies en organismos de reproducción sexual. Este proceso tan complejo, ocurre dentro del tracto genital femenino, en el cual, los espermatozoides viajan a través de éste para llegar a la zona del ámpula donde se encuentra el ovocito para ser fecundado. Por medio de una serie de mecanismos físicos, celulares y moleculares, estas células haploides se fusionan para dar origen a un individuo genéticamente diferente ¹.

Este acontecimiento es muy interesante, ya que es el único evento que ocurre de forma natural, en el que una célula (el espermatozoide) tiene que salir del organismo de origen, para llevar a cabo su función dentro de otro organismo de la misma especie.

El Espermatozoide Humano

Es una célula altamente especializada, compartimentalizada y diferenciada, que mide aproximadamente 60 μm y se compone principalmente de dos regiones, la cabeza y el flagelo. En la cabeza se localiza el núcleo, donde el material genético se encuentra altamente compactado por las protaminas, también cuenta con una estructura membranosa denominada acrosoma, que recubre el núcleo en la parte anterior de la cabeza, debajo de la membrana plasmática. El acrosoma se deriva del aparato de Golgi y consta de una matriz envuelta en un sistema contiguo de dos membranas, la membrana acrosomal externa y la membrana acrosomal interna. Dentro del flagelo se localiza el axonema, el cual se compone de 9 pares de microtúbulos formando un anillo alrededor de dos microtúbulos centrales. El flagelo a su vez se divide en la pieza media, que contiene las mitocondrias, la pieza principal y la pieza final ^{2,3} (Figura 1). En la base de la cabeza, donde inicia el flagelo se encuentra una zona denominada cuello.

La espermatogénesis tiene lugar en los testículos y comienza con la señalización mediada por hormonas en los túbulos seminíferos, donde las espermatogonias (células no diferenciadas y diploides) por medio de una serie de divisiones, duplicación del material genético y de procesos de diferenciación, dan lugar a espermatozoides, aún sin capacidad fecundante ³. Posteriormente, los espermatozoides migran hacia el epidídimo, donde continúan su maduración y se almacenan hasta la eyaculación ^{3,4}.

Incluso después de la eyaculación, los espermatozoides son incapaces de fecundar al óvulo, ya que necesitan terminar su maduración dentro del tracto genital femenino y adquirir esa capacidad para ser competentes para fecundar al óvulo ^{4,5}.

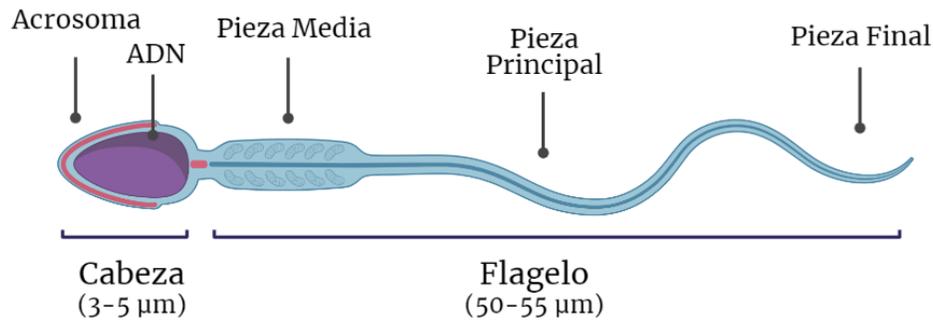


Figura 1. Esquema de la morfología del espermatozoide humano. Se muestran las regiones de la cabeza y el flagelo (pieza media, pieza principal y pieza final), que componen esta célula. Creado con BioRender.com

La Capacitación

Durante su tránsito por el tracto genital femenino, los espermatozoides al terminar su maduración adquieren la capacidad fecundante. Para ello los espermatozoides desarrollan un conjunto de cambios bioquímicos y fisiológicos que se conocen colectivamente como capacitación ^{5,6}.

Entre estos cambios podemos destacar aumentos en la concentración de Ca^{2+}_i y del pH intracelular ^{3,7,8}, una hiperpolarización del potencial eléctrico de la membrana plasmática ^{9,10}, la fosforilación en residuos de tirosinas ¹¹, un aumento en la fluidez y la remoción del colesterol de la membrana plasmática ^{12,13}. También se observa la activación de vías de señalización que modulan la adenilato ciclasa soluble (sAC)-PKA ^{3,14,15}, entre otros. Además, durante la capacitación los espermatozoides adquieren un cambio en el patrón de batido flagelar, caracterizado por ser asimétrico y de gran amplitud, al que se le conoce como hiperactivación ¹⁶⁻¹⁸. Este tipo de movilidad les permite a las células desplazarse por el tracto genital femenino, desprenderse del reservorio de espermatozoides en el istmo del oviducto y vencer el flujo oviductal, así como lograr la penetración de la zona pelúcida, que es una capa glucoprotéica que recubre al ovocito ^{18,19}. Otro proceso esencial durante la capacitación es la exocitosis acrosomal, un evento irreversible en el que se liberan enzimas hidrolíticas (como la acrosina y hialuronidasa) y se expone la membrana acrosomal interna, en la que se encuentran fusógenos y proteínas de reconocimiento específicas ^{19,20}. Al igual que la hiperactivación, la exocitosis acrosomal es indispensable para que ocurra la fusión del espermatozoide con el ovocito, y la fecundación ^{5,6,21}.

Especies reactivas de oxígeno durante la Capacitación

Algunos autores han propuesto que la capacitación es un evento oxidativo, en el que hay una producción controlada de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otros ²²⁻²⁴. Se sabe que *in vitro*, la generación controlada de O_2^- y H_2O_2 favorece algunos procesos asociados a la capacitación, como la activación de la Adenilato ciclasa soluble (sAC) que se sabe que activa a la proteína cinasa A dependiente de AMP cíclico (PKA). La PKA a su vez permite la fosforilación en residuos de tirosinas ²⁵⁻²⁷, la hiperactivación, la exocitosis acrosomal, entre otros ^{23,24,28,29}. En el espermatozoide las fuentes de ROS provienen de la mitocondria, las lipoxigenasas y las oxidasas, entre otras ^{22,30,31}. En general, los niveles de ROS en las células se mantienen en niveles fisiológicos, por medio de sistemas antioxidantes, en los que participan enzimas como la superóxido dismutasa (SOD, que cataliza la reacción del O_2^- a H_2O_2), la catalasa que convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 , la glutatión peroxidasa, la tioredoxina y las peroxiredoxinas, así como moléculas antioxidantes tales como la vitamina C y E ²².

No obstante, en condiciones donde la producción de ROS está desregulada (estrés oxidativo) desencadenando daños en la membrana plasmática (peroxidación lipídica), el ADN y en la actividad mitocondrial, además, se reduce la movilidad y la tasa de fecundación, estas alteraciones pueden resultar en infertilidad ^{27,30,32}.

Desde hace ya varios años se ha propuesto que, en el espermatozoide de humano existe una oxidasa en la membrana plasmática, que se encarga de generar ROS y que podría ser similar a las oxidasas Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) en su forma reducida, identificadas inicialmente en neutrófilos ³³. Estas proteínas se encargan de producir el “estallido respiratorio” en neutrófilos, como mecanismo de defensa contra patógenos. Por otro lado, en células no fagocíticas como las células renales, fibroblastos, osteoclastos, foliculares tiroideas e incluso en células cancerosas, se ha reportado la generación de ROS ^{32,34-36}.

Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidasa 5 (Nox5)

Se sabe que las enzimas NADPH (Nicotidamina Adenina Dinucleótido Fosfato) oxidasas (Nox), son entidades generadoras de ROS en diferentes tipos celulares ^{32,37,38}. Pertenecen a una familia de proteínas transmembranales compuesta por siete miembros: Nox 1-5 y Duox 1-2 ^{32,37,39}.

Estas proteínas transmembranales transportan electrones a través de la membrana para reducir el oxígeno molecular (O_2), a anión superóxido (O_2^-). Acorde con esta función preservada, hay

dominios estructurales conservados que comparten todos los miembros de la familia Nox^{32,40}. El dominio COOH terminal (C-terminal) localizado en el interior celular, contiene sitios de unión al NADPH y a FAD. Contiene 6 segmentos transmembranales (I-VI), en los que se localizan 2 pares de histidinas que se unen al grupo hemo en los segmentos III y V (en el caso de Duox, éstos se encuentran en los segmentos IV y VI). En el dominio NH₃ terminal (N-terminal) existen algunas variaciones, ya que solo Nox5 y las Duox1-2 poseen dominios de unión a Ca²⁺ y asimismo las Duox poseen un dominio peroxidasa (de ahí su función dual)^{32,41,42}. Por otro lado, el resto de las Nox (Nox1-4) requieren de subunidades accesorias para su activación y regulación³².

Musset y colaboradores en el 2012, demostraron que Nox5 se expresa y funciona en el espermatozoide de humano, sin embargo, la aproximación experimental empleada no permite concluir inequívocamente la localización a nivel subcelular de Nox5. Además, en este trabajo solo se exploró la presencia de Nox1, Nox2 y Nox4, no encontrándose la expresión de estas isoformas^{35,43} y no se exploró la posible presencia de las Duox.

Estructuralmente, Nox5 en la región N-terminal posee dos motivos estructurales conocidos como "manos EF" (de unión a Ca²⁺) y en la región C-terminal contiene los sitios con actividad oxidasa (de unión para FAD y NADPH), un sitio de unión a calmodulina (CaM), así como múltiples sitios de fosforilación (Figura 2)^{39,44-46}. De la proteína Nox5 se han descrito seis variantes, de las cuales α , β , γ , δ y ζ se distinguen por la presencia de un dominio de "manos EF" en el extremo N-terminal y la variante ϵ , la cual carece de esta región de unión a Ca²⁺, por lo que su estructura es más pequeña, parecida a los otros miembros Nox 1-4^{32,35,37}. La masa molecular estimada para Nox5 es de aproximadamente 86 kDa, que es consistente con los resultados de Western Blot reportados para esta proteína, además se sugiere que no presenta glucosilaciones^{43,47}.

La expresión del ARNm de Nox5 se detectó en testículos, bazo, páncreas, nodos linfáticos, músculo liso vascular, médula ósea, placenta, ovarios, útero, estómago y en algunos tejidos fetales, además, se detectó específicamente en la etapa del paquiteno en los espermatoцитos de humano^{32,35,37}.

De manera interesante, Nox5 no requiere de proteínas accesorias para su activación y si bien esta proteína se ha localizado en algunos mamíferos, está ausente en roedores (pseudogen)³². La presencia de Nox5 se ha descrito en espermatozoides de otros mamíferos, como en el de caballo, perro y cordero^{48,49}. Recientemente, se demostró que Nox5 se expresa y es funcional en el espermatozoide de cordero. En ese estudio muestran que Nox5 tiene distintos patrones de localización en el espermatozoide, presentándose principalmente en la zonas apical y acrosomal

en la cabeza, en condiciones no capacitantes (NC). Después de inducir la capacitación *in vitro*, observan una redistribución de la localización de Nox5, la cual se concentra mayormente en la región post acrosomal de la célula ⁴⁹. Por otro lado, los estudios hechos en espermatozoides de caballo también muestran que Nox5 se localiza en la región del acrosoma, post acrosomal y en la zona ecuatorial de la cabeza ⁴⁹, pero ambos estudios no detectan a la proteína en la pieza principal del espermatozoide.

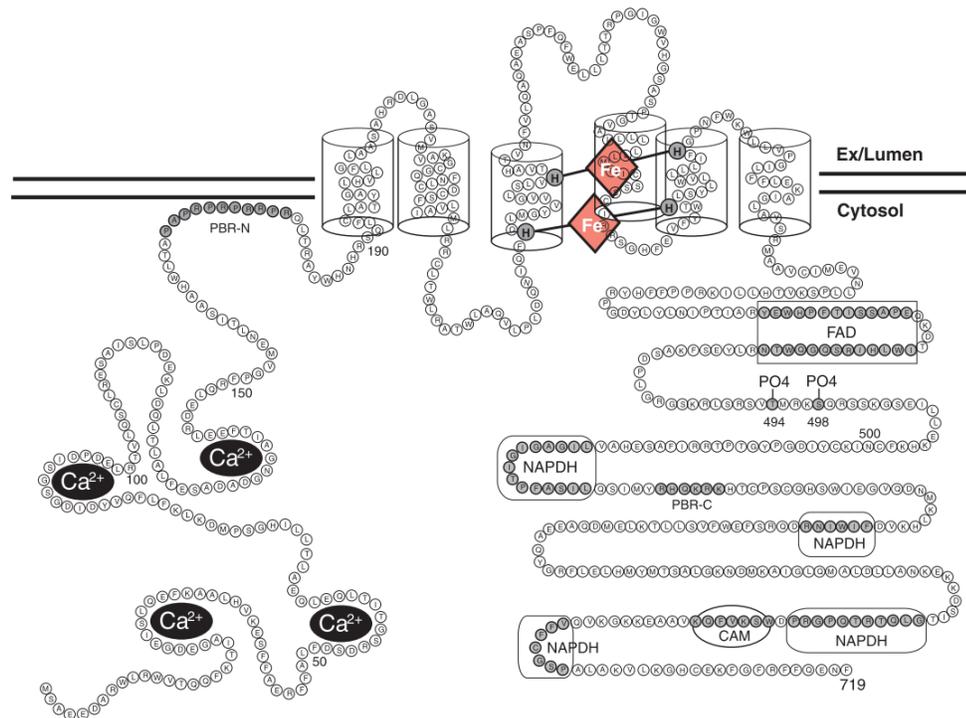


Figura 2. Topología de los segmentos transmembranales, intracelulares y motivos funcionales de la enzima NADPH oxidasa 5. En la región N-terminal se encuentran dos pares de “manos EF” con unión a Ca^{2+} , seguido de un dominio polibásico (PBR-N) del lado intracelular. En la parte central se encuentran los seis segmentos transmembranales, de los cuales los segmentos III y V contienen un grupo hemo unido a histidinas de cada segmento. En la región C-terminal se encuentran los sitios de unión a FAD, NADPH, un sitio de unión a calmodulina (CaM), un sitio polibásico (PBR-C) y sitios de fosforilación en la serina 498 y la treonina 494. Modificado de Fulton D. 2009 ⁴⁴.

La función de las Nox es oxidar la molécula de NADPH en NADP^+ , generando H^+ y 2e^- . Así mismo, tienen la capacidad de transferir estos dos e^- al espacio extracelular. Los cuales reaccionan con el O_2 , formando así O_2^- . Este último, puede dismutar espontáneamente o por acción de la SOD para producir H_2O_2 ^{43,45}. Así la generación de ROS en el espermatozoide humano se ha propuesto que es dependiente de Nox5 de forma preponderante ^{37,43}.

Interacción de Nox5 con otras proteínas en el espermatozoide

La evidencia obtenida especialmente en fagocitos indica que la oxidación del NADPH podría generar un aumento en las ROS y en la concentración intracelular de H^+ , provocando una acidificación del pH citoplásmico, que podría incluso ser letal ⁵⁰. No obstante, se sabe que esta acidificación se amortigua por la actividad del canal de H^+ , conocido como “canal de protones activado por voltaje” Hv1 ⁵⁰. La dependencia al voltaje de este canal cambia en función de la diferencia de pH entre el lado extracelular e intracelular de la membrana plasmática, es decir, de su gradiente electroquímico. Cuando el gradiente aumenta (acidificación intracelular), el canal Hv1 extruye H^+ hacia el exterior celular. Se demostró que este canal se expresa en espermatozoides humanos específicamente en la región de la pieza principal ^{8,51-53}. Cuando se inhibe la actividad de este canal no se produce el aumento del pH intracelular del flagelo, cambio asociado a capacitación y tampoco se desarrolla la movilidad hiperactivada ⁸. De manera interesante se reportó que Nox5 co-inmunoprecipita con Hv1 en espermatozoides de humano y que al inhibir este canal se ve afectada la producción de O_2^- ⁴³. Dichos resultados sugieren que en el espermatozoide Nox5 y Hv1 se encuentran relacionados funcional y espacialmente ⁴³. Se propone que el aumento en la concentración intracelular de H^+ , producto de la oxidación del NADPH por Nox5, genera una acidificación intracelular que fomenta la constante activación de Hv1, permitiendo así un control del pH intracelular ^{52,53}.

Por otro lado, se sabe que el canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide, CatSper (indispensable para la fecundación), también se localiza en la región del flagelo ^{54,55}. La actividad de este canal es esencial para que se lleve a cabo la hiperactivación y probablemente la exocitosis acrosomal ³. De manera relevante, se sabe que en el espermatozoide de humano la actividad de este canal aumenta por alcalinización intracelular o por la progesterona (Pg, hormona esteroidea que es secretada por las células del cúmulus que rodean al ovocito) que es considerada como un activador fisiológico ^{51,52,56,57}. Mediante ensayos de microscopía de superresolución se determinó que ambos canales, Hv1 y CatSper, coinciden espacialmente. Estas evidencias sugieren fuertemente que existe una interacción funcional entre ambos canales ⁵¹.

Si bien, hasta ahora se ha demostrado que la enzima Nox5 se expresa y es funcional en el espermatozoide humano, se desconoce de qué forma está involucrada en las vías de señalización que conllevan a la capacitación y si existe alguna relación funcional con los canales CatSper y Hv1 mencionados anteriormente.

Posible participación de Nox5 en procesos asociados a la capacitación

Como se mencionó anteriormente, los espermatozoides generan ROS, aunque la entidad generadora de éstas, durante el proceso de la capacitación aún no es clara. Durante años se planteó que la producción de ROS asociada a la capacitación ocurre en la membrana plasmática, debido a que al incubar a los espermatozoides con enzimas como SOD y/o catalasa, que funcionan como sistemas antioxidantes, se impiden eventos asociados a la capacitación^{28,58,59}. Para fortalecer esta propuesta, se demostró que al utilizar desacoplantes de la cadena de transporte de electrones, como la antimicina A, rotenona y el carbonil cianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP, por sus siglas en inglés), no se ve afectada la generación de ROS dependiente de NADPH, sugiriendo que las ROS provenientes de la mitocondria no participan en la generación del O_2^- requerido durante la capacitación⁶⁰.

En el año 1993, De Lamirande y Gagnon investigaron la participación del O_2^- en el movimiento hiperactivado y en la exocitosis acrosomal y determinaron que al incubar a los espermatozoides en condiciones oxidantes en presencia de la xantina (X), las enzimas xantina oxidasa (XO) y catalasa (X+XO+cat), que se sabe que generan un aumento en la concentración de O_2^- y H_2O_2 , se ve favorecido un incremento tanto en el movimiento hiperactivado, como en la exocitosis acrosomal. Así mismo, al tener ese sistema oxidante X+XO y además la presencia de SOD, estos parámetros se reducen significativamente^{28,58}. Otro grupo de investigación demostró que al utilizar un ionóforo de Ca^{2+} como el A23187, que se sabe favorece la entrada de Ca^{2+} , por lo que al incrementar este catión en el interior celular se desencadena la exocitosis acrosomal que, en presencia de la SOD, la exocitosis acrosomal se reduce significativamente⁶¹. Al incubar las células al mismo tiempo con el A23187 y la SOD, el ionóforo no incrementa la exocitosis acrosomal, lo que sugiere que el O_2^- es importante para que ocurra la exocitosis acrosomal⁶¹. Por otro lado, se demostró en espermatozoides de caballo que tanto la estimulación con el A23187, así como un ambiente oxidativo (X+ XO+ cat) incrementa la producción de O_2^- sin embargo, cuando está presente la SOD ya no ocurre el incremento de O_2^- . Debido a la evidencia antes mencionada, los datos apuntan a que el Ca^{2+} incrementa el O_2^- y este anión, es el responsable de favorecer tanto el movimiento hiperactivado como la exocitosis acrosomal. En ese sentido se propuso a la oxidasa Nox5 que genera O_2^- , como la entidad involucrada en los eventos asociados a la capacitación espermática, en particular porque es una oxidasa sensible a Ca^{2+} , y este ión es fundamental en la regulación de la hiperactivación y de la exocitosis acrosomal.

Para probar esta hipótesis, se utilizaron fármacos que se sabe que afectan la actividad de las oxidasas, como lo es el cloruro de difenilenedonio (DPI, por sus siglas en inglés) que es un inhibidor general de las oxidasas^{32,60,62} y el GKT136901 (GKT) que, si bien se ha utilizado en otros tipos celulares contra Nox1/4, recientemente se probó para Nox5^{48,63}.

La evidencia obtenida de espermatozoides de carnero sugiere que el GKT no disminuye la producción de O_2^- , no afecta la movilidad espermática, ni la exocitosis acrosomal de espermatozoides capacitados⁴⁸. Sin embargo, en espermatozoides de caballo se observó que el DPI sí afecta la producción de O_2^- , pero no tiene efecto sobre la movilidad espermática²⁷.

Por otro lado, en espermatozoides humanos se demostró que la producción de O_2^- incrementa al aumentar el Ca^{2+} y en condiciones donde se le restringe Ca^{2+} a la célula, la producción de O_2^- disminuye drásticamente⁴³. Si bien con la evidencia mencionada se esclarecieron algunas interrogantes, continúan presentes otras en torno al papel de Nox5 en el espermatozoide humano. Por esta razón nos interesa dilucidar la participación de esta proteína durante los procesos asociados a la capacitación, así como la posible interacción con otras proteínas como CatSper y Hv1, que en conjunto podrían estar implicadas en un ciclo cooperativo que le permiten a la célula prepararse para la fecundación (dada su localización, activación y modulación de estas proteínas). No obstante, los antecedentes aún están vigentes las siguientes preguntas: ¿La inhibición de Nox5 tendrá algún efecto sobre la hiperactivación?, ¿Cómo es la relación entre el Ca^{2+} y el O_2^- en presencia de un inductor fisiológico de la exocitosis acrosomal como la Pg?, ¿La inhibición de Nox5 tendrá un efecto sobre la exocitosis acrosomal? ¿Se encuentra presente alguna de las Duox que son sensibles a Ca^{2+} en el espermatozoide humano?

Por todo lo anterior y basados tanto en los modelos que han sugerido la relación de estas tres proteínas, Nox5, Hv1 y CatSper^{52,64}, así como en la posible participación de Nox5 en estos parámetros esenciales para la fecundación, proponemos la siguiente vía de señalización. Durante la capacitación, tras un estímulo (por ejemplo, de Pg o aumento de pH) hay una entrada de Ca^{2+} a la célula a través de CatSper, en el que este Ca^{2+} se une al dominio de “manos EF” de la enzima Nox5 y/o Duox, lo que promovería la oxidación del NADPH generando $NADP^+$, así como H^+ y $2e^-$. Estos e^- serían trasladados al espacio extracelular, donde son captados por el O_2 formando O_2^- , que podría utilizarse para generar otras ROS y participar en eventos asociados a la capacitación. Por otro lado, la diferencia en el gradiente electroquímico del H^+ generado en el lado citosólico, estimularía la apertura del canal Hv1⁵² alcalinizando el medio intracelular. Este ambiente alcalino propiciaría la activación del canal CatSper permitiendo nuevamente la entrada de Ca^{2+} al interior

celular, estableciéndose un mecanismo de retroalimentación positivo que podría controlar la hiperactivación y la exocitosis acrosomal (Figura 3).

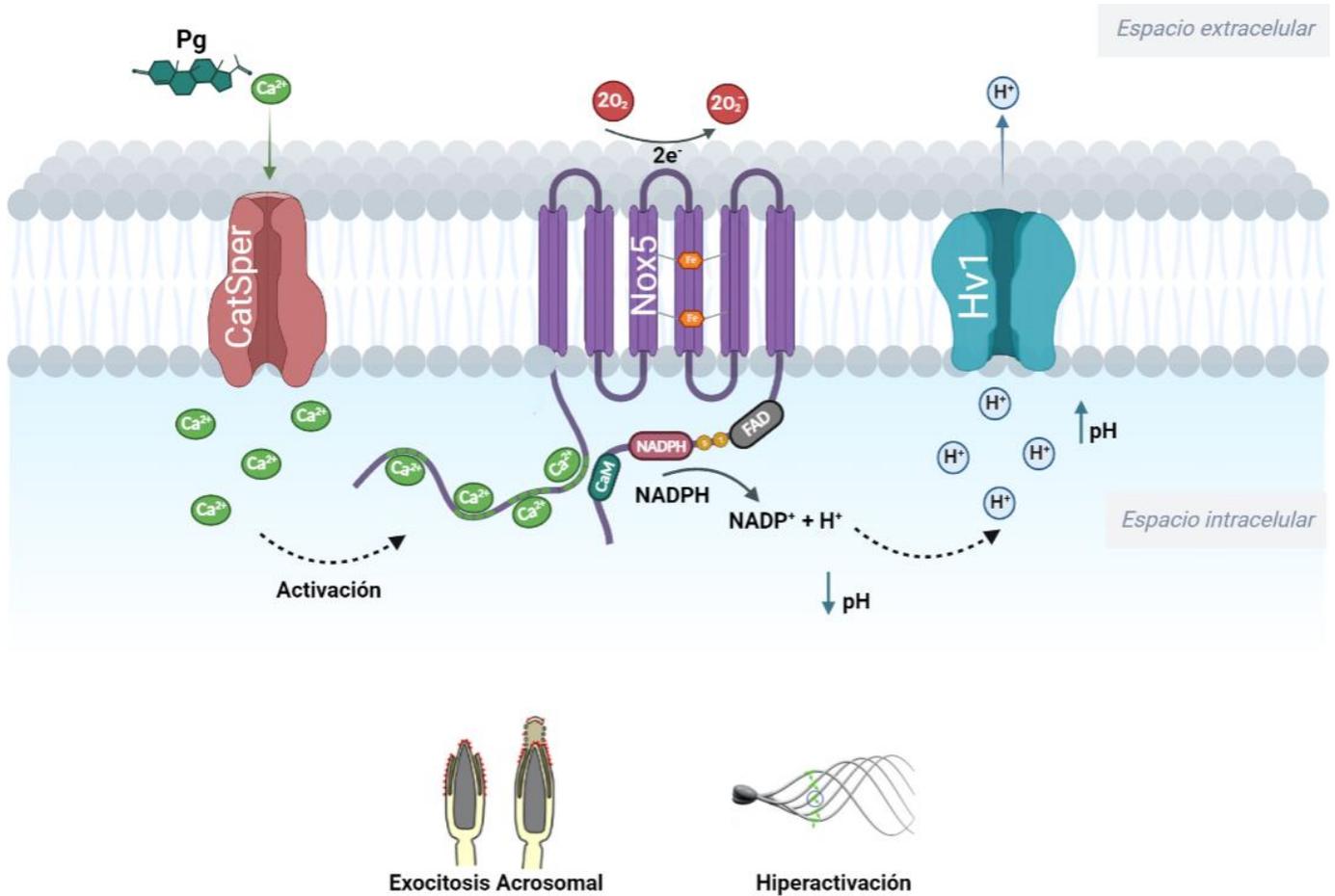


Figura 3. Modelo propuesto de la vía de señalización de Nox5 en el espermatozoide humano. Participación de las proteínas Nox5, CatSper y Hv1 en los cambios a nivel celular. Las flechas punteadas indican los procesos que actualmente se desconocen y que, se propone que participa la actividad de Nox5 de forma directa e indirecta. Imagen de “exocitosis acrosomal” tomada de Satouh, et al., 2012 ⁶⁵ y de “Hiperactivación” tomada de Álvarez, et al., 2014 ⁶⁶. Creado con Biorender.com

Hipótesis

Durante la capacitación, el incremento en la concentración de Ca^{2+} debida a la activación de CatSper mediada por Pg , activa a Nox5 que por medio de los productos de la actividad de esta oxidasa (O_2^- y H^+), tienen un efecto sobre la hiperactivación y la exocitosis acrosomal. La proteína Nox5 se encuentra localizada en la región de la pieza principal, en el flagelo de los espermatozoides de humano y esta ubicación le permite relacionarse con la activación y funcionalidad de dos proteínas esenciales para el espermatozoide, como lo son los canales CatSper y Hv1.

Objetivo General

Evaluar la participación de Nox5 en procesos asociados a la capacitación en espermatozoides de humano.

Objetivos Particulares

1. Confirmar la presencia y localización subcelular de Nox5 en el espermatozoide humano.
2. Evaluar el efecto de la inhibición de Nox5 en parámetros asociados a la capacitación.
 - 2.1. Medir ROS (O_2^-) durante la capacitación.
 - 2.2. Determinar el efecto de la inhibición de Nox5 sobre la exocitosis acrosomal.
 - 2.3. Examinar el efecto de la inhibición de Nox5 sobre la hiperactivación.

Metodología

Obtención de muestras.

Las muestras de semen se obtuvieron de pacientes voluntarios, con abstinencia sexual de al menos 72 horas y que cumplieron con los parámetros seminales establecidos por la OMS ⁶⁷.

Medio de Cultivo HTF (Human Tubal Fluid).

El medio de cultivo no capacitante (NC), contiene los siguientes reactivos (en mM): KCl 4.68, KH_2PO_4 0.37, NaCl 90, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, Glucosa 2.78, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.8, Piruvato de sodio 0.33, Lactato Na^+ 21.39 y Hepes 23.8. Para el medio capacitante (CAP) se complementó el medio NC con: Albúmina sérica bovina (BSA) 5 mg/ml y con $NaHCO_3$ 2 mg/ml. Ambos medios se ajustan a pH 7.4 antes de usarse ⁸.

Medio de Cultivo TYH (Toyoda- Yokoyama- Hosi)

El medio de cultivo NC contiene los siguientes reactivos (en mM): NaCl 119.4, KCl 4.7, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.8, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2, Piruvato de sodio 0.5, Glucosa 2.5, Hepes 20. Para el medio CAP se adicionó al medio NC con: Albúmina sérica bovina (BSA) 5 mg/ml y con $NaHCO_3$ 2 mg/ml. Ambos medios se ajustan a pH 7.4 antes de usarse ⁶⁸.

Preparación de muestras de espermatozoides humanos.

Las muestras se colectaron en un frasco estéril y posteriormente, se mantuvieron en incubación alrededor de 30-60 minutos a 37 °C con una atmósfera del 5 % de CO₂, promoviendo la licuefacción de la muestra. Una vez que la muestra licuó, se dividió en tubos de ensayo, agregando 400 µl de semen y 1 ml de medio HTF NC o CAP por goteo a cada tubo y éstos se colocaron en una gradilla con una inclinación de aproximadamente 45 °. Los tubos se mantuvieron en incubación por 60 min a 37 °C y a una atmósfera al 5 % de CO₂. Posteriormente, se colectó la fracción de la muestra que se encuentra en la fase superior del tubo por medio de la técnica de nado ascendente o “*swim up*”, que corresponde a los espermatozoides móviles de cada tubo. La cantidad espermática se estimó con una cámara de conteo Mackler® y se ajustó la densidad de espermatozoides a 10x10⁶ células por mililitro, manteniendo a los espermatozoides en las condiciones experimentales correspondientes para cada prueba. Para las muestras capacitadas, los espermatozoides se mantuvieron en medio CAP en incubación por 6 horas a 37 °C y a una atmósfera al 5 % de CO₂. Modificado de Mata-Martínez E., *et al.*, 2013 ⁶⁹.

Obtención de muestras de espermatozoides de ratón cepa C57BL/6

Como control negativo en la expresión que Nox5, se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los espermatozoides de la cauda epididimal. Los espermatozoides se incubaron aproximadamente por 30 minutos en medio TYH modificado NC o CAP, a 37 °C con una atmósfera del 5 % de CO₂. Los espermatozoides motiles fueron recolectados por la técnica de “*swim out*” y se mantuvieron en el medio correspondiente para cada experimento. La cantidad de espermatozoides obtenida se estimó con una cámara de conteo Mackler® y se ajustó la densidad de espermatozoides a 10x10⁶ células por mililitro. Para las muestras capacitadas, los espermatozoides se mantuvieron en medio CAP en incubación por 1 hora a 37 °C y a una atmósfera al 5 % de CO₂ ⁶⁸.

Western Blot

Posterior al *swim up* en medio NC o CAP, las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, para retirar el medio de incubación y dejar solo la pastilla celular que contiene las células (~50 µl). En cada condición de cada tratamiento, se ajustó una densidad de 10x10⁶ espermatozoides, para las muestras de espermatozoides de ratón se tuvieron a una densidad de 2x10⁶. A las muestras se les agregó 1 ml de TBS 1X para lavar el medio de incubación. Posteriormente los tubos se

centrifugaron a 10,481 g por 3 minutos a temperatura ambiente (T.A), se retiró el sobrenadante y nuevamente se agregó 1 ml de TBS 1X para lavar las células. Posteriormente, las células se centrifugaron a 12,044 g por 2 minutos a T.A. y se descartó el sobrenadante, dejando la pastilla celular (aproximadamente 20 μ l) para cada muestra. Finalmente se agregó la cantidad necesaria de solución de carga 5X (SB 5X) para tener una concentración final de 1X en cada condición. Estas muestras se agitaron a velocidad máxima durante 15 segundos tres veces, para favorecer la ruptura de las células.

Posteriormente, se calentaron las muestras a una temperatura de 100 °C durante 5 minutos y se centrifugaron a 12,044 g por 5 minutos a T.A. Se recuperó el sobrenadante que contiene a las proteínas de membrana y se agregó β -mercaptoetanol [14.7 M] a cada muestra a una concentración final de 1 %. Las muestras se calentaron a 100 °C durante 3 minutos y en seguida se procedió al cargado en el gel de acrilamida. Las muestras se analizaron por la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*SDS-PAGE*, por sus siglas en inglés) al 10 %, aproximadamente a 35 miliAmperes/ -200 volts.

Posteriormente se realizó la transferencia húmeda del gel a una membrana de PVDF en el *TransBlot* (Bio-Rad®) a 250 miliAmperes en hielo durante 1.5 horas con buffer de transferencia 1X.

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con 3 % de BSA/TBS-T 0.1 % durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación y a continuación se incubó con los anticuerpos primarios Nox5 N-terminal (*Santa Cruz Biotechnology*, Catálogo A-3 sc-518114), Nox5 C-terminal (*Aviva systems*, Catálogo OAEB01075), β -Tubulina (*Santa Cruz Biotechnology*, Catálogo OARD00031) y Duox1 (*Santa Cruz Biotechnology*, Catálogo H-9 sc-393096), disueltos en 1 % BSA/TBS-T 0.1 %, toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS/T 0.1 % a T.A. y la membrana se incubó durante 1.5 horas con los anticuerpos secundarios disueltos en 1 % de leche/TBS-T 0.1 % a T.A. Finalmente, se realizaron tres lavados con TBS/T 0.1 % de 5 minutos cada uno y se reveló la membrana con un conjunto de reactivos para Quimioluminiscencia en una relación 1ml:6 μ l. Protocolo modificado de Ritagliati C., *et al.*, 2018⁷⁰. Ver soluciones en Información complementaria.

Inmunofluorescencia de células en suspensión

Después del *swim up*, las células se incubaron en medio NC o durante 6 horas en medio CAP. Posteriormente, se centrifugaron por 5 minutos a 300 g (o rcf), para retirar el medio de incubación

y dejar solo la pastilla celular (~50 μ l). Los espermatozoides se fijaron con paraformaldehído al 2 % en PBS (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente (1 ml por cada 10×10^6 células) y posteriormente se centrifugaron a 3000 g por 5 minutos y resuspendieron en PBS (lavado) durante 5 minutos (las siguientes centrifugaciones se realizaron a 3000 g durante 5 minutos). Nuevamente las células se centrifugaron (lavado) y se permeabilizaron con 0.01 % Tritón/PBS por 15 minutos, se centrifugaron y resuspendieron en PBS. El bloqueo se realizó con 6 % BSA/PBS durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Una vez terminado el bloqueo, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario.

Los espermatozoides se incubaron con los anticuerpos primarios Nox5 N-terminal y Nox5 C-terminal en 3 %BSA/PBS/Tween 0.1 % toda la noche a 4 °C. Se realizó un lavado con 0.1 % Tween/PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios asno-anti cabra Alexa Fluor 488 (*Thermo Scientific*, Catálogo A-11055) y cabra-anti ratón Alexa Fluor 488 (*Thermo Scientific*, Catálogo A-10680), diluido en 0.01 % Tween/PBS 1:500, durante 60 minutos a T.A. Por último, las células se centrifugaron y se realizó un lavado con Tween 0.01 %/PBS, dejando un volumen final de la pastilla celular de 50 μ l. Se agregó yoduro de propidio (PI) a una concentración final de 1.5 μ M y finalmente se analizaron las muestras en el citómetro de flujo acoplado a un sistema de adquisición de imágenes fluorescentes, llamado Amnis® ImageStream® X Mark II. Modificado de Matamoros-Volante A. *et al.*, 2018⁸. Ver soluciones en Información complementaria.

Inmunofluorescencia de células adheridas

Se realizó el mismo protocolo que la inmunofluorescencia en suspensión hasta el paso del lavado con Tween 0.01 %/PBS. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos y se resuspendieron en 500 μ l de PBS, se agregó PI a una concentración final de 1.5 μ M durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos y la pastilla celular se resuspendió en un volumen final de 500 μ l de PBS. Se tomaron 20 μ l de cada muestra y se colocaron en un portaobjetos de adhesión, se retiró el líquido y se dejó secar. A cada muestra se le agregó 1 μ l de medio de montaje Citifluor AF1 Antifadent Mountant Solutions, al portaobjetos se le colocó un cubreobjetos y se sellaron los extremos con barniz. El portaobjetos se mantuvo cubierto de la luz para evitar fotoblanqueo. Las células se analizaron en el microscopio Confocal Invertido Olympus IX81.

Adquisición de imágenes por microscopía confocal

Las imágenes de la inmunofluorescencia de células adheridas se adquirieron con el microscopio Confocal Olympus FV-100 Invertido-IX81 con los láseres de 488 y 543 nm, a una potencia de 2.8 % y 6.0 %, respectivamente. Para observar las imágenes se utilizó el objetivo de 60X con una apertura numérica de 1.3. La adquisición de cada corte en el eje z (stack) fue de aproximadamente 200 nm, y se estableció una amplificación digital de 5.0, tanto para las imágenes de campo claro, como para las imágenes de fluorescencia del anticuerpo y del PI. Los datos se analizaron con el software Fiji.

Adquisición de datos por citometría de flujo acoplada a imágenes

Se empleó el citómetro de flujo acoplado a imágenes Amnis[®] ImageStream[®] X Mark II (AMNIS). Para la adquisición de las imágenes se utilizó un objetivo de 60x para las muestras de espermatozoides de humano y 40x para los espermatozoides de ratón. Los láseres ocupados y detectores espectrales fueron, el 405 nm para excitar al fluoróforo Sytox Blue (fluoróforo de viabilidad) en *Ch07* (435-505 nm), el 488 nm para excitar los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 anti ratón y anti cabra en *Ch02* (480-560 nm), Dihidroetidio (DHE) indicador de O₂⁻ y a la sonda de viabilidad PI en *Ch04* (592-642 nm). La potencia de los láseres se ajustó en cada experimento para reducir la autofluorescencia de las células no teñidas en un rango de 50-200 mW. Durante la adquisición se seleccionaron diferentes parámetros para excluir todo lo que no corresponde a células con base a las dimensiones de espermatozoides, para ello se fijaron valores de *Área* y la razón de espectro (*Aspect Ratio*) de entre 50-200 μm^2 y ≤ 0.4 , respectivamente, que corresponden a la morfología espermática, además se estableció un umbral para el gradiente cuadrático medio > 60 para excluir eventos fuera de foco. Se adquirieron alrededor de 10,000 eventos por condición ⁷¹.

Debido a que las células se teñieron con más de una sonda fluorescente, se utilizaron controles de células teñidas con cada fluoróforo de manera individual, para crear matrices de compensación que permitieron eliminar la invasión de fluorescencia entre los canales. También se incluyeron controles de células sin fluoróforos y sin anticuerpos (tanto primarios como secundarios) para descartar la autofluorescencia de las células.

Análisis de datos obtenidos por citometría de flujo con imágenes

Los datos obtenidos por citometría de flujo acoplada a imágenes se analizaron con el software IDEAS 6.2, siguiendo una selección celular por saturación, enfoque y segmentación, como lo describen Matamoros y colaboradores en el 2018. Una vez seleccionados los espermatozoides, se hizo una discriminación celular por viabilidad, separando las células positivas para Sytox Blue o PI (según sea el caso) y seleccionando exclusivamente las células vivas y positivas para las sondas de interés (anticuerpos y DHE). Posteriormente, se graficó la intensidad de fluorescencia de cada condición y tratamiento, y se obtuvieron los histogramas de distribución de la fluorescencia de las poblaciones.

Medición de O_2^- por citometría de flujo acoplada a imágenes

Para hacer las mediciones se efectuaron las siguientes condiciones: los espermatozoides se incubaron en medio CAP en presencia o ausencia de inhibidores de las Nox, como el DPI que se conoce como un inhibidor general de las oxidasas^{60,62,72} a una concentración de 10 μ M y el GKT136901 (2-(2-chlorophenyl)-4-methyl-5-(2-pyridinylmethyl)-1H-pyrazolo[4,3-c]pyridine-3,6(2H,5H)-dione), que se había descrito como un inhibidor de las Nox4 a una concentración de 10 μ M^{62,63}, pero recientemente se utilizó para inhibir a Nox5 en espermatozoides de carnero⁷¹ a una concentración de 10 μ M. A estos se les agregó DHE [4 μ M] como indicador de O_2^- durante 15 minutos, a 37 °C, 5 % CO_2 y protegidos de la exposición a la luz.

Posteriormente se les agregó un estímulo de ionomicina [10 μ M] como un control de respuesta de las células y que nos permitiera obtener una mayor respuesta al incrementarse la concentración de Ca^{2+i} . También se empleó H_2O_2 [4 mM] como un control que nos permitiera obtener una mayor respuesta de O_2^- , Pg [3 μ M] como inductor fisiológico que de manera indirecta permite la entrada de Ca^{2+} a través del canal CatSper y con DMSO <0.05 % como vehículo.

Medición de la movilidad por medio del sistema Open CASA (Analizador de Esperma Asistido por Computadora)

Después del *swim up*, las células se incubaron en medio NC y posteriormente se incubaron durante 10 minutos en presencia del vehículo DMSO (control), DPI [1/10 μ M], GKT136901 [1/10 μ M] y con Thimerosal [5 μ M], este último es un control de activación de la movilidad hiperactivada. Para la condición CAP, los inhibidores estuvieron presentes durante todo el tiempo de capacitación. Se colocaron 10 μ l de células a una densidad celular de 10×10^6 , en una cámara

Sperm Track de 10 μm de profundidad. La movilidad se monitoreó usando un objetivo 10X de contraste de fase y se analizaron aproximadamente 500 células por condición. Se grabaron videos de 3 segundos de duración y se analizaron con el sistema de Open CASA ⁷³, bajo los siguientes parámetros, 0.8 μm por píxel y 60 cuadros por segundo.

Para la movilidad hiperactivada se tomaron los siguientes valores de VCL= +/- 150 μm , LIN< 50 % y ALH= +/- 3.5 ^{67,74}.

Evaluación del Ca^{2+} y exocitosis acrosomal por medio de imágenes individuales de espermatozoides

Evaluación del Ca^{2+} : Las células se incubaron en medio NC y se tiñeron con Fluo3-AM a una concentración final de 4 μM durante 30 minutos a una atmósfera del 5 % de CO_2 y protegidas de la luz. Posteriormente se centrifugaron a 300 g por 5 minutos y se resuspendieron en medio NC o CAP (durante 6 horas). Las células se adhirieron a una cámara de registro con poli-L-lisina y se agregó medio NC o con HCO_3^- (para la condición CAP). Para cada condición experimental, se realizaron adiciones de progesterona [3 μM] a los 60 segundos del inicio del registro, ionomicina [10 μM] después de 300 segundos, y MnCl_2 [5 mM] posterior a los 380 segundos. En experimentos control el DMSO se empleó en la misma proporción y tiempos que los inhibidores (DPI- / GKT-). Estas adiciones se prepararon en medio NC o con HCO_3^- [2 mg/ml] para la condición CAP.

Evaluación de la exocitosis acrosomal: Las células se incubaron en medio NC y se tiñeron con Fluo3-AM a una concentración final de 4 μM durante 30 minutos a una atmósfera del 5 % de CO_2 y protegidas de la luz. Posteriormente se centrifugaron a 300 g por 5 minutos y se resuspendieron en medio NC o CAP (durante 6 horas). Las células se adhirieron a una cámara de registro con poli-L-lisina y se agregó medio NC o con HCO_3^- (para la condición CAP), a esta preparación se agregó el colorante FM 4-64 a una concentración final de 5 μM para teñir la membrana del espermatozoide. Se realizaron adiciones de progesterona [3 μM], ionomicina [10 μM], GKT136901 [10 μM], DPI [10 μM], MnCl_2 [5mM] y en experimentos control, el vehículo (DMSO) en la misma proporción y tiempos que los inhibidores (DPI- / GKT-). Estas adiciones se prepararon en medio NC o con HCO_3^- [2 mg/ml] para la condición CAP, en presencia del colorante FM 4-64. La señal de fluorescencia se capturó con un microscopio Olympus iX71, un objetivo de inmersión 60X con una apertura numérica de 0.9 y una cámara EMCCD (*Andor Technology*) con el software *Andor iQ*. Las imágenes de fluorescencia se capturaron a 1 imagen por segundo, con pulsos de luz de excitación de 2 milisegundos. Las muestras teñidas se excitaron con un led azul de 460 nm, el

divisor de imágenes contiene un filtro de excitación HQ 480/40X, un espejo dicróico Q505lp, un filtro de emisión HQ 535/50M. Durante los registros las células se mantuvieron a 37 °C con un controlador de temperatura acoplado a la platina. Modificado de Chávez, J. *et al.*, 2018 ⁷⁵ y Sánchez C. *et al.*, 2014 ⁷⁶.

Análisis Estadístico

Para los ensayos de movilidad espermática, posterior a la prueba de normalidad, se realizó una prueba de Wilcoxon seguida de un análisis *pos hoc* para determinar si existen diferencias entre la condición control (NC-CAP) comparada con los tratamientos (Thim, DPI y GKT), con una diferencia significativa de $p \leq 0.05$.

En los registros de células individuales, se aplicó una prueba de Shapiro, se determinó que las distribuciones fueron no paramétricas y posteriormente se aplicó una prueba de Wilcoxon, con significancia estadística de $p \leq 0.05$.

Para los registros de exocitosis acrosomal, se aplicó una prueba de Shapiro, se determinó que las distribuciones fueron no paramétricas, posteriormente se aplicó una prueba de Wilcoxon y finalmente una prueba de Kruskal Wallis, con significancia estadística de $p \leq 0.05$.

Resultados

Detección de Nox5 por medio de Western Blot

Se empleó la técnica de *Western blot* para determinar la presencia de una proteína con el peso molecular esperado para la β -NOX5 (~82 kDa), que es la que se ha descrito que se encuentra en el testículo de humano ^{35,37,43,77}, para fortalecer la conclusión de que los anticuerpos utilizados sí detectan a nuestra proteína de interés.

Los anticuerpos primarios que usamos en este trabajo fueron Nox5 N-terminal monoclonal hecho en ratón que reconoce la secuencia “QFKTIAGEDGEISLQEFKAAL” (31-54 aa), Nox5 C-terminal policlonal hecho en cabra que reconoce la secuencia “EWHPFTESSAPEQKD” (488-503 aa) y β -Tubulina monoclonal hecho en ratón, este último se usó como control de carga para esta técnica. Se estableció la concentración óptima de los anticuerpos contra Nox5, [0.2 μ g/ml] para el N-terminal, [0.5 μ g/ml] para el C-terminal y [0.01 mg/ml] para β -Tubulina, y se usó la densidad de 10×10^6 /ml espermatozoides de humano y 2×10^6 /ml espermatozoides de ratón, para cada condición en todos los tratamientos.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la detección de Nox5 con los dos anticuerpos. En la Figura 4 el panel izquierdo, corresponde a la membrana revelada contra el anticuerpo monoclonal N-terminal, que reconoce una sección del primer par de “manos EF” sensibles a Ca^{2+} (Figura S1), donde se observan dos bandas, una de ellas corresponde a un peso molecular entre los 75 y 100 kDa. Se calcula tiene un peso molecular alrededor de los 80-90 kDa (Figura 4, flecha verde) que se sugiere corresponde con el peso para la variante β -Nox5 en ambas condiciones NC y CAP, aunque la condición CAP es mucho más intensa que en la condición NC. La segunda banda observada se encuentra entre los 50 y 75 kDa, que a pesar de que las otras variantes de Nox5 (α , δ , ζ) contienen la misma secuencia que reconoce este anticuerpo, ninguna corresponde el peso molecular de la banda (Figura 4, flecha anaranjada). Esta banda podría deberse a una inespecificidad del anticuerpo primario.

El panel derecho de la Figura 4, corresponde a la membrana revelada contra el anticuerpo policlonal C-terminal, que reconoce una parte de la región de unión a FAD (Figura S1), donde se observa un patrón de bandas de distinto peso molecular. Entre ellas se encuentra una banda de peso molecular similar a la detectada con el anticuerpo N-terminal, que se encuentra entre 80-90 kDa (Figura 4, flecha verde). Ambos anticuerpos reconocen diferentes regiones de la proteína de interés y ambos detectaron una proteína de peso molecular similar en ambas condiciones NC y CAP. Se calculó la distancia de migración relativa (*Rf*) para cada una de las bandas de las membranas para ambos anticuerpos, dando como resultado un valor aproximado de 85 kDa (datos no mostrados) para la banda indicada con una flecha verde. Estos datos demuestran que los dos anticuerpos reconocen una proteína de un peso molecular aproximado de 85 kDa, que se aproxima al de Nox5 (reportado como 82 kDa). Como se mencionó anteriormente, se encontraron otras bandas de diferentes pesos moleculares, que podrían corresponder a detecciones inespecíficas del anticuerpo primario.

En la parte inferior de ambas membranas, se encuentra la imagen de la misma membrana revelada contra tubulina y se observa una banda de peso molecular aproximado de 50 kDa, que corresponde a lo reportado por el fabricante para esta proteína, fungiendo como control de carga. Se realizaron controles solo con los anticuerpos secundarios anti ratón [1:10,000] y anti cabra [1:10,000] con espermatozoides de humanos en condiciones NC y CAP, para descartar inespecificidades por parte de los anticuerpos secundarios y no se detectó ninguna señal (Figura S2). Por otro lado, como se mencionó anteriormente, se sabe que los roedores carecen del gen para Nox5, por lo que se usaron espermatozoides de ratón como control negativo, en condiciones

NC y CAP y no se detectó ninguna señal. Los controles con anticuerpos secundarios y con espermatozoides de ratón también se revelaron contra tubulina (Figura S2).

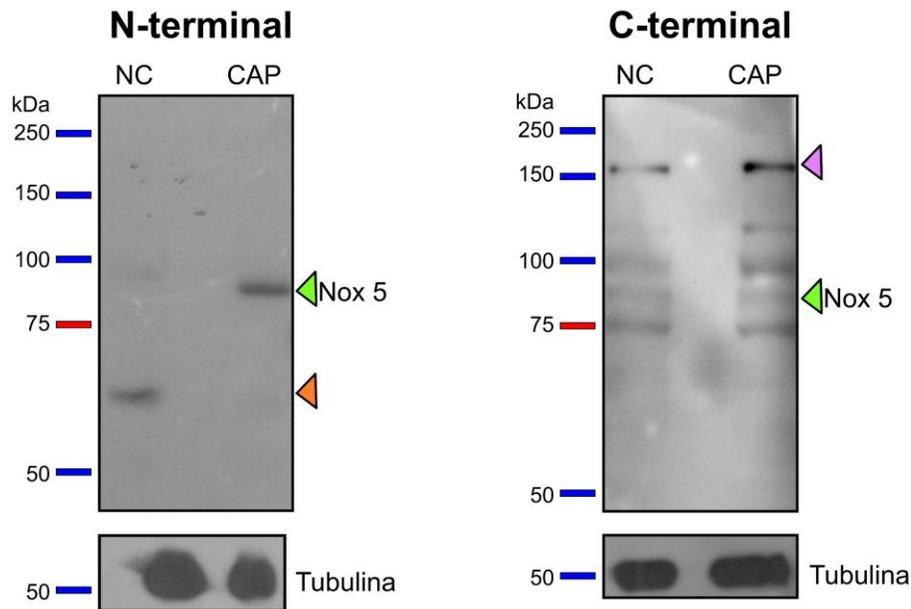


Figura 4. Detección de Nox5 por medio de Western Blot en espermatozoides humanos.

Panel Izquierdo. Membrana revelada para el anticuerpo N terminal, se detecta una banda de un peso molecular aproximado de 85 kDa marcada con una flecha verde que corresponde a Nox5 y es más intensa en la condición CAP. La banda de menor peso molecular probablemente se deba a inespecificidad (flecha anaranjada). **Panel Derecho.** Membrana revelada para el anticuerpo C terminal, donde también se detecta una banda de un peso molecular aproximado de 85 kDa marcada con una flecha verde, que corresponde a Nox5. Asimismo, se detectaron bandas de diferente peso molecular, que podrían deberse a inespecificidades por parte del anticuerpo primario. La banda de 150 kDa podría corresponder a otra proteína, como Duox1, marcada con la flecha lila. En ambas condiciones NC y CAP se observa el mismo patrón de bandas. Parte inferior de la figura, se observan los controles con tubulina con un peso molecular de 50 kDa. n=3.

Al revelar las membranas contra el anticuerpo de Nox5 C-terminal, en todos los casos se detectó una banda de mayor peso molecular ~150 kDa, tanto en la condición NC como CAP y que fue la primera banda en aparecer (Figura 4, flecha lila). Al hacer la búsqueda de algún miembro de la familia de las Nox que pudiera tener ese peso molecular, se encontró que la Dual oxidasa 1 (Duox1) tiene un peso molecular de 150 kDa y de manera interesante, también posee un dominio de “manos EF” (Q9NRD9, *Pubmed*). Así mismo, otro miembro de las Nox que posee las “manos EF” es la Dual oxidasa 2 (Duox2), aunque esta proteína tiene un peso molecular de 175 kDa (Q9NRD8, *Pubmed*). Estas proteínas se caracterizan principalmente por expresarse en la glándula tiroideas debido a su actividad peroxidasa para la síntesis de hormonas tiroideas, y en mucosas, actuando como agentes antimicrobianos (actividad dual) ^{32,39,42,78}.

Se realizó un alineamiento de secuencias de las Duox1/2 con la secuencia de reconocimiento del anticuerpo Nox5 C-terminal y se encontró que las tres secuencias son muy similares, aunque

encontramos algunas sustituciones en los aminoácidos que reconoce. Estas sustituciones son conservadas, es decir, aminoácidos con características similares (mismo grupo) por lo que no se descarta la idea de que este anticuerpo reconozca también a la Duox (Figura S3).

La secuencia de Duox1 se encontró en el proteoma del espermatozoide de humano ⁷⁹, pero hasta ahora no hay estudios por *western blot* que demuestren su expresión y de acuerdo con datos obtenidos de The Human Protein Atlas, hay expresión proteica en testículo y epidídimo (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000137857-DUOX1>).

Detección de Duox 1 en espermatozoides humanos

Debido a la evidencia anterior, nos dimos a la tarea de detectar a Duox1, por lo que adquirimos un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la siguiente secuencia de aminoácidos “LVVFMKGSPEEKSRMLMFRMYDFDGNLISKDEFIRMLRSFIEISNNCLSKAQLAEVVESMFRES G” (611-675 aa) y nuevamente se utilizó el anticuerpo β -Tubulina como control de carga. Se estableció que la concentración ideal de anticuerpo primario fue de 0.2 μ g/ml.

En la Figura 5 se observa que tanto en condiciones NC como CAP en espermatozoides de humano hay una banda de peso molecular de 150 kDa con la misma intensidad en ambas condiciones, sugiriendo fuertemente que se debe al reconocimiento de Duox1. En la parte inferior de la Figura 5 se observa el revelado contra tubulina.

El control con anticuerpo secundario es el mismo que para el anticuerpo Nox5 N-terminal, anti ratón [1:10,000]. Al igual que con los anticuerpos para Nox5, se carece de péptido competidor para este anticuerpo, pero se podrían incluir tejidos o tipos celulares de expresión endógena (control positivo) para esta proteína y otros que no lo expresen (control negativo). De forma alternativa, se puede enviar a secuenciar esta banda y comprobar por proteómica la presencia de Duox en espermatozoide humano, resultado que sería novedoso e interesante para continuar con su estudio.

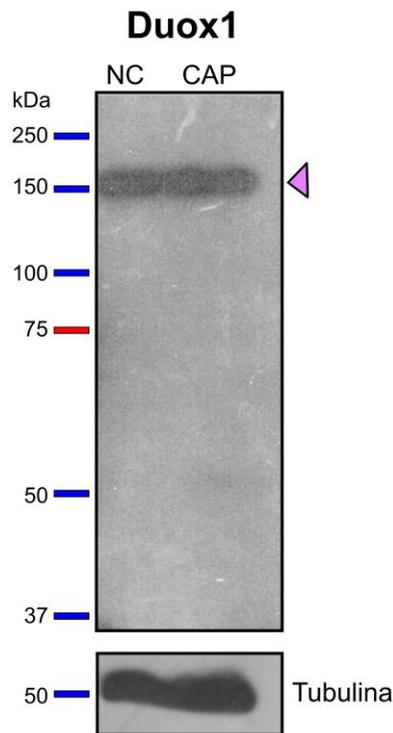


Figura 5. Detección de Duox1 por medio de Western Blot en espermatozoides humanos. Se muestra la membrana revelada para el anticuerpo Duox1 y se detecta una única banda de un peso molecular aproximado de 150 kDa marcada con una flecha lila en condiciones NC y CAP. Parte inferior de la figura, se observa el control con tubulina con un peso molecular de 50 kDa. n=3.

Localización de Nox5 en el espermatozoide humano por medio de inmunofluorescencia

Uno de los objetivos de este trabajo fue localizar a nivel subcelular a Nox5 en el espermatozoide de humano, debido a que la única evidencia que se encuentra en la literatura es inconclusa ⁴³; para ello se emplearon dos anticuerpos primarios con los que se realizó la detección por inmunofluorescencia en células en suspensión y adheridas en laminilla.

En la Figura 6 se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal de espermatozoides de humano con los anticuerpos Nox5 N-terminal (Figura 6A) y Nox5 C-terminal (Figura 6B), en condiciones NC y CAP. En el panel izquierdo de la figura se muestra el campo claro, en el panel central las imágenes de fluorescencia con el anticuerpo primario (Nox5) y en el panel derecho la sobreposición de imágenes de fluorescencia tanto del anticuerpo primario, como la tinción con yoduro de propidio (Nox5/PI), este último colorante para visualizar de forma más detallada la localización del anticuerpo en la cabeza del espermatozoide. En la Figura 6A se observa la señal del anticuerpo en la zona ecuatorial de la cabeza (aunque la señal parece ser más intensa en dos puntos focalizados en extremos opuestos), en la base de la cabeza, cuello y pieza principal del

espermatozoide. La localización en la pieza principal presenta un patrón punteado a lo largo del flagelo, así mismo no se encontraron diferencias en la localización de la proteína, tanto en condiciones NC como CAP. Por otro lado, no se detectó señal en la pieza media del espermatozoide.

La señal del anticuerpo Nox5 C-terminal (Figura 6B) se observa en la zona ecuatorial de la cabeza y de forma envolvente alrededor de la cabeza. En contraste con la localización del otro anticuerpo, éste se observa con una mayor intensidad en la pieza media del espermatozoide y con el mismo patrón punteado en la pieza principal. Debido a que sugerimos que el anticuerpo para Nox5 C-terminal podría estar reconociendo también a Duox1, quizá la señal que observamos en la cabeza y pieza media esté mezclada entre las dos proteínas. La señal detectada en la pieza principal del flagelo es consistente entre los dos anticuerpos y que refuerza la hipótesis propuesta en este trabajo.

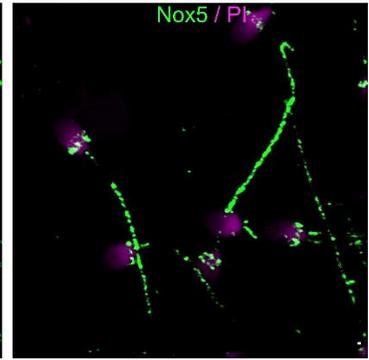
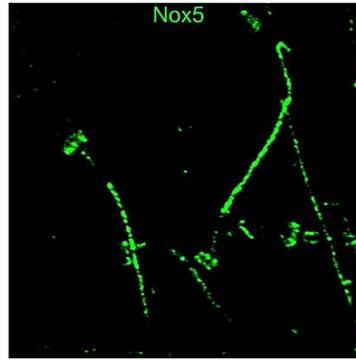
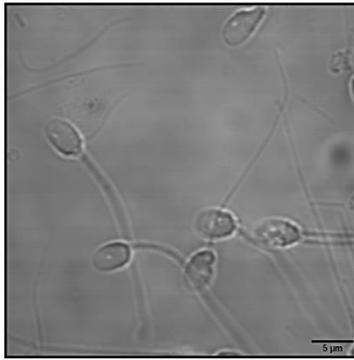
La observación de la señal del anticuerpo primario que es más intensa en dos puntos focalizados en los extremos de la cabeza del espermatozoide y el patrón punteado del flagelo, son muy interesantes y se vuelven relevantes, ya que no se han reportado en la literatura. A pesar de que la microscopía confocal nos da un límite de resolución aproximada de 200 nm, se requiere un análisis más profundo de la localización y distribución de Nox5 en el espermatozoide humano, con herramientas como la superresolución ⁸⁰.

Se realizaron controles solo con los anticuerpos secundarios anti ratón [1: 500] y anti cabra [1: 500] con espermatozoides de humanos en condiciones NC y CAP, para descartar inespecificidades por parte de los anticuerpos secundarios y no se detectó ninguna señal fluorescente (Figura S4).

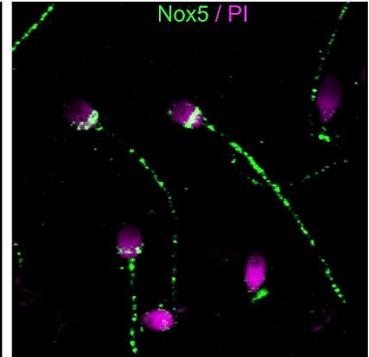
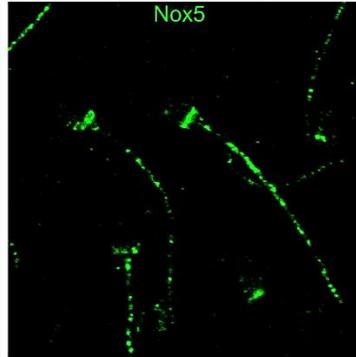
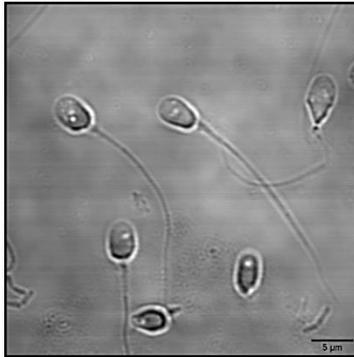
A

Nox 5 N-terminal

NC

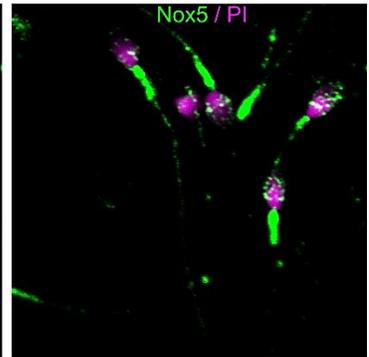
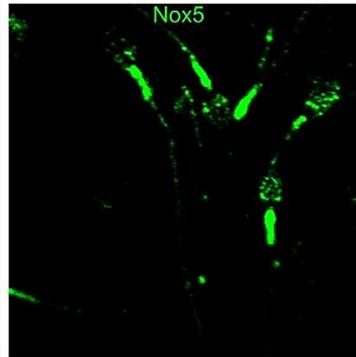
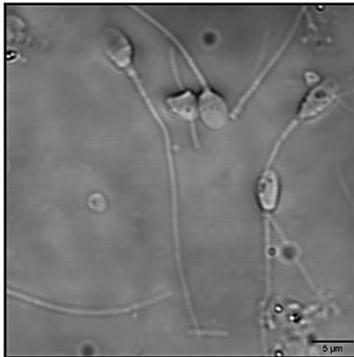


CAP

**B**

Nox 5 C-terminal

NC



CAP

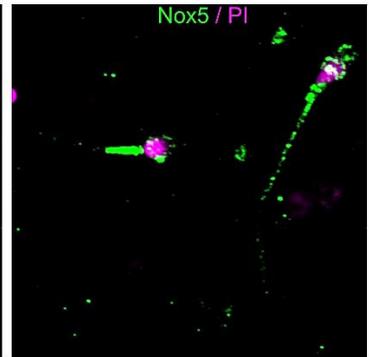
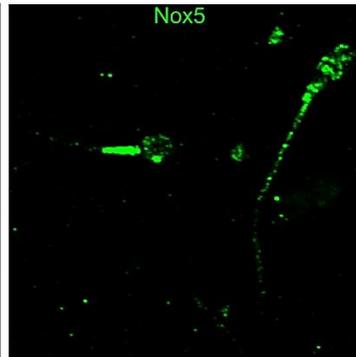
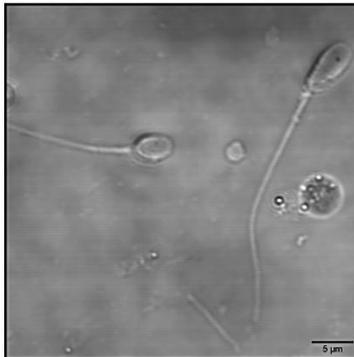
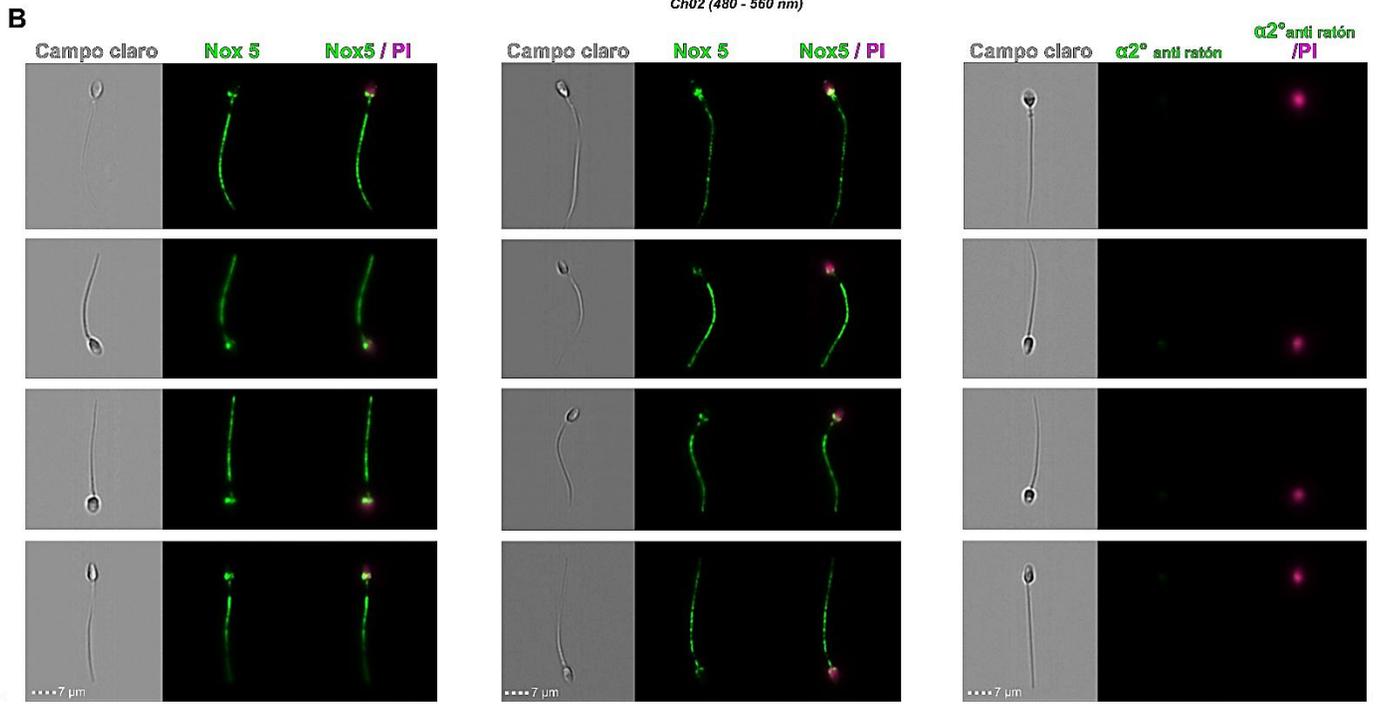
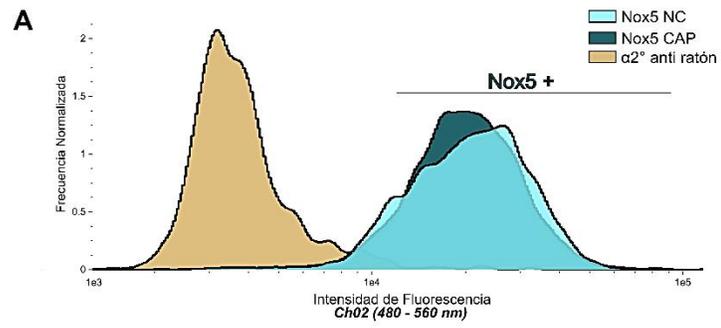


Figura 6. Localización de Nox5 con el anticuerpo N-terminal y C-terminal en condiciones NC y CAP por microscopía confocal. A-B. Imágenes representativas que muestran la localización del anticuerpo Nox5 N-terminal y C-terminal en condiciones NC y CAP, respectivamente. **Panel**

izquierdo. Campo claro. **Panel central.** Señal del anticuerpo primario. **Panel derecho.** Sobreposición de la imagen en fluorescencia de Nox5 (verde) y el núcleo de la célula teñido con PI (magenta). n= 4 donadores, ~40 células totales.

Para corroborar la señal observada de los anticuerpos en un número mayor de espermatozoides, estas se analizaron en el citómetro de flujo acoplado a imágenes, que nos permite evaluar miles de eventos por condición de cada tratamiento y con la ventaja de obtener la imagen de cada célula analizada, que de acuerdo al criterio de Rayleigh para el límite de resolución de un microscopio ($1.22 * (\lambda / \text{apertura numérica})$) dada por la apertura numérica del objetivo usado (0.9) y la longitud de onda (λ) de la sonda fluorescente, en este caso de 488 nm, se obtiene una resolución aproximada de 660 nm.

Se determinaron las siguientes concentraciones de anticuerpo primario como las óptimas para este conjunto experimental: 40 $\mu\text{g/ml}$ para Nox5 C-terminal, 0.4 $\mu\text{g/ml}$ para Nox5 N-terminal y 1:500 para los anticuerpos secundarios. Posteriormente, se graficó el promedio de la intensidad de fluorescencia para ambos anticuerpos. Estos datos se representaron en histogramas de densidad de fluorescencia (Figura 7), para evitar falsos positivos y descartar la posible interferencia de la fluorescencia de los anticuerpos secundarios ($\alpha 2^\circ$), se seleccionó una subpoblación positiva para Nox5 (Nox5+), desde el extremo donde ya no se detecta fluorescencia de los tratamientos con $\alpha 2^\circ$, hasta el valor máximo de fluorescencia del tratamiento con los anticuerpos para Nox. En la Figura 7, se muestran las imágenes representativas que corresponden a los histogramas de densidad de fluorescencia.



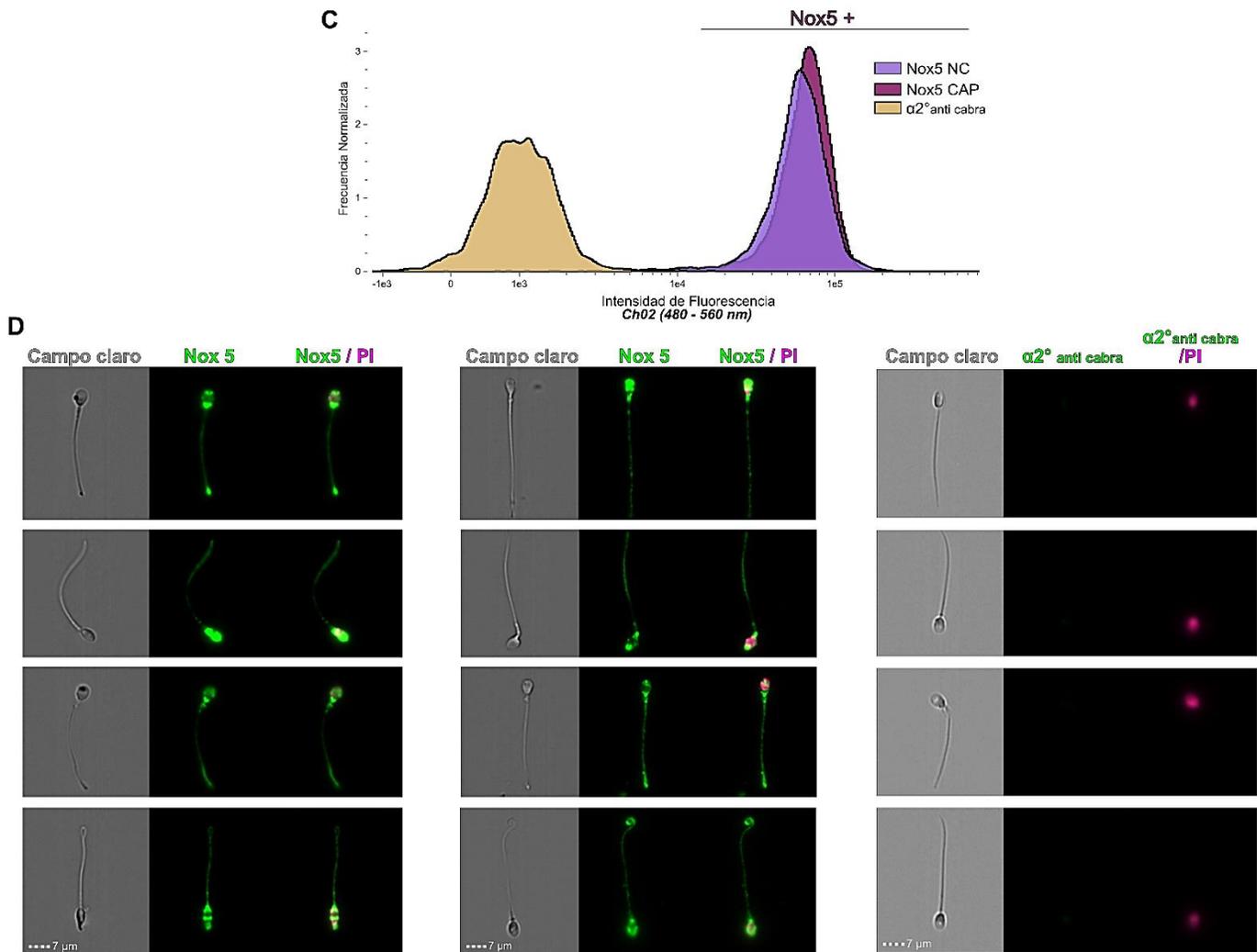


Figura. 7. Localización de Nox5 con el anticuerpo N-terminal y C-terminal en condiciones NC y CAP por citometría de flujo acoplada a imágenes. A. Distribución representativa de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo N-terminal y el $\alpha 2^{\circ}$ anti ratón (trazo café) en el Ch02, en condiciones NC (trazo azul claro) y CAP (trazo azul oscuro). **B.** Imágenes representativas que corresponden a los histogramas en A. **Panel Izquierdo**, condición NC; **Panel Central**, condición CAP; **Panel Derecho**, condición con $\alpha 2^{\circ}$ anti ratón. Se muestran los diferentes patrones de localización a nivel subcelular, como lo es en la zona ecuatorial de la cabeza, en la base de la cabeza, cuello y pieza principal (patrón punteado). **C.** Distribución representativa de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo C-terminal y el $\alpha 2^{\circ}$ anti cabra (trazo café) en el Ch02, en condiciones NC (trazo morado claro) y CAP (trazo morado oscuro). **D.** Imágenes representativas que corresponden a los histogramas en C. **Panel Izquierdo**, condición NC; **Panel Central**, condición CAP; **Panel Derecho**, condición con $\alpha 2^{\circ}$ anti cabra. Se muestran los diferentes patrones de localización a nivel subcelular, como lo es en la zona ecuatorial de la cabeza, en la base de la cabeza, cuello, pieza media y pieza principal (patrón punteado). Cada panel muestra el campo claro, el canal para el anticuerpo Nox5 y la sobre posición de la fluorescencia del anticuerpo Nox5 y de PI. Canal de fluorescencia= Ch. n= 5, ~1,500 células por condición.

Estos resultados, confirman los patrones observados en las imágenes de microscopía confocal (Figura 6), donde Nox5 no cambia su distribución a nivel subcelular entre un estado NC y CAP, aunque con las diferencias entre los anticuerpos primarios que ya se mencionaron anteriormente. La contribución de esta estrategia experimental es que nos permitió explorar la posible heterogeneidad de la expresión de la proteína en la población de espermatozoides. Los resultados mostrados en la distribución de las intensidades de las fluorescencias nos permiten afirmar que no hay heterogeneidad en la expresión de la proteína en la población y que entre NC y CAP tampoco existió un cambio en la detección de Nox5.

Control negativo de Nox5 en espermatozoides de ratón

Para comprobar que los anticuerpos utilizados reconocen Nox5, se utilizó como control negativo espermatozoides de ratón CAP. Se sabe que el gen de Nox5 no está presente en roedores (pseudogenizado), por lo tanto, no hay expresión de la proteína^{39,81}. Por esta razón, se espera encontrar falta de la señal fluorescente específica para esta proteína.

Para ello, los espermatozoides de ratón se procesaron en condiciones CAP (S5), y se incubaron con el anticuerpo Nox5 C- terminal, con α^2 anti cabra y sin anticuerpos (Sin α).

En la Figura S5A, se muestran los histogramas que corresponden a la intensidad de fluorescencia de las tres condiciones, mostrándose la ausencia de señal fluorescente, ya que todas las condiciones muestran una distribución de la fluorescencia a nivel de la condición Sin α . Las imágenes representativas que corresponden a cada histograma se muestran en la Figura S5B.

Evaluación de O_2^- en espermatozoides humanos por medio de la citometría de flujo acoplada a imágenes.

Como se mencionó en la introducción, Nox5 se activa por Ca^{2+} gracias a su motivo de “manos EF” que, entre otros aspectos, la hace diferente de otras Nox. Así su producción de O_2^- se incrementa cuando aumenta el Ca^{2+i} , por ejemplo, en presencia de ionomicina. Desafortunadamente la evidencia en la literatura carece de controles que permitan asegurar que el Ca^{2+} y el O_2^- estén relacionados⁴³.

Por lo que nos interesa saber ¿De qué forma están relacionados el Ca^{2+i} y la producción de O_2^- ? ¿Estos fenómenos están relacionados con la función de Nox5? Para ello implementamos una serie de experimentos, basándonos en una estrategia experimental reportada para medir O_2^- en espermatozoides de caballo⁸².

Estos experimentos se realizaron por citometría de flujo acoplada a imágenes, que nos permite medir los cambios de fluorescencia del O_2^- , bajo diferentes condiciones que estimulen tanto la entrada de Ca^{2+} , como la producción de O_2^- .

El DHE se ha utilizado en la citometría de flujo como indicador de O_2^- , ya que una vez que el DHE se oxida puede internalizarse en la célula. La oxidación del DHE en sistemas biológicos produce dos especies: el 2-hidroxietidio (2OH-Etidio) y Etidio en (mayor cantidad). Para la formación del 2OH-Etidio se requiere particularmente del O_2^- , lo que lo vuelve específico para la detección de O_2^- ⁸³. Tanto el 2OH-Etidio como el Etidio son compuestos afines al ADN y por ese motivo solo se observa la fluorescencia en las regiones que contienen ADN⁸⁴. Por esta razón las mediciones de fluorescencia de los productos de DHE solo se registraron en la cabeza del espermatozoide. La identificación tanto de 2OH-Etidio y Etidio solo se logra a través de la cromatografía líquida de alto rendimiento.

En la Figura 8 se muestra la distribución de fluorescencia de las distintas poblaciones de espermatozoides capacitados por 6 horas, sometidas a los distintos tratamientos con Pg, ionomicina y H_2O_2 , en presencia o ausencia de los inhibidores DPI y GKT. En condiciones basales ambos inhibidores reducen la fluorescencia de DHE, lo que indica que hay una reducción en la producción de O_2^- , comparado con la condición sin inhibidores (DPI -/ GKT -), en el que el DPI tiene un mayor efecto.

Se sabe que la Pg induce cambios fisiológicos en el espermatozoide de humano, cambia el patrón de batido flagelar, aumenta el Ca^{2+} i e induce la excitosis acrosomal, entre otros efectos, por lo que nos preguntamos si ¿Ocurrirá un cambio en la producción de O_2^- tras la adición de Pg?

En presencia de Pg se produce un incremento en la producción de O_2^- , que podría indicar que el Ca^{2+} que entra a través de CatSper y se está activando a la Nox5, esto sugiere una relación funcional entre estas dos proteínas y este efecto se ve abatido en presencia del inhibidor DPI (Figura 8 B, D panel inferior). Por otro lado, el GKT no tiene efecto inhibitorio sobre la producción de O_2^- en presencia de Pg.

Para el caso de la inducción por ionomicina, un intercambiador de Ca^{2+}/H^+ ⁸⁵ y que tiene un efecto de ionóforo de Ca^{2+} en las células, este provoca un incremento del Ca^{2+} i, que nos permite obtener una respuesta máxima de fluorescencia del Ca^{2+} . La presencia de ionomicina produce un incremento en la producción de O_2^- que se ve disminuida en presencia de los inhibidores, aunque en mayor medida con GKT. Por último, la última estrategia fue la adición de H_2O_2 la cual produjo

un incremento esperado en la producción de O_2^- que se redujo considerablemente con DPI, pero no así, con GKT.

Estos resultados prueban que la producción de O_2^- depende fuertemente del Ca^{2+} que ingresa a la célula y que podría ser a través de CatSper, debido a la respuesta obtenida en presencia de Pg.

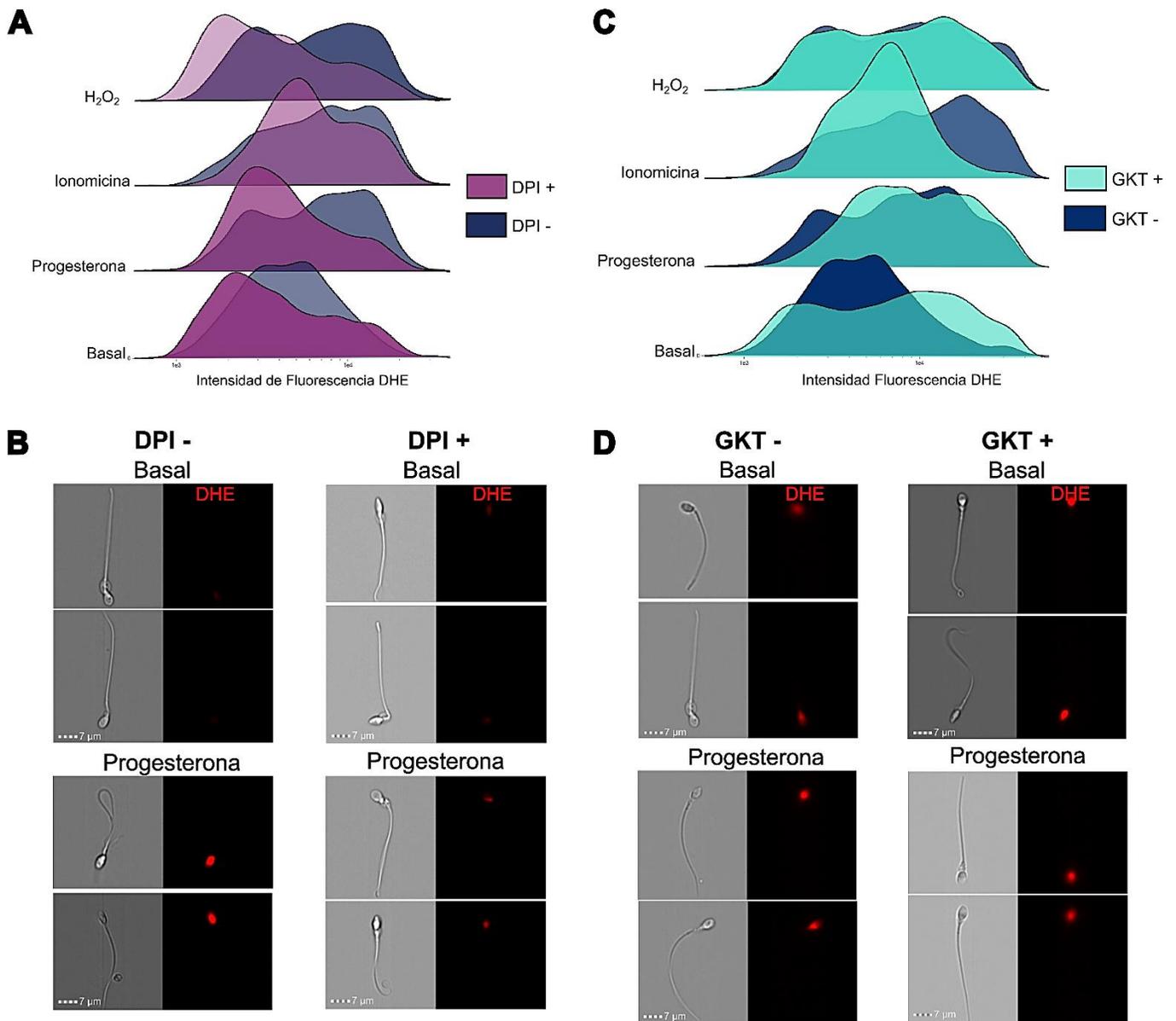


Figura 8. Medición de O_2^- por medio de la citometría de flujo acoplada a imágenes, en espermatozoides humanos bajo distintos estímulos. A-C. Histogramas que representan la distribución de la intensidad de fluorescencia de DHE de las poblaciones celulares tras distintos estímulos (Pg, ionomicina y H_2O_2), en ausencia (trazos azul marino) o presencia de los inhibidores de Nox, como DPI (trazos morados) y GKT (trazos azul claro). B-D. Imágenes representativas de condiciones Basales y con Pg, en presencia o ausencia de los inhibidores. Se muestra el campo claro y la imagen de fluorescencia de DHE. $n=3$, $\sim 1,500$ células por condición

Medición de la movilidad bajo el efecto de la inhibición de Nox5 en condiciones NC y CAP.

Desde hace ya varios años se demostró que la generación de O_2^- de los espermatozoides es necesaria para que ocurran ciertos fenómenos asociados a la capacitación, como lo son la movilidad hiperactivada y la exocitosis acrosomal ^{28,59}. Por lo que surge el interés de evaluar si Nox5 como entidad generadora de O_2^- , está participando en el proceso de hiperactivación en los espermatozoides de humano utilizando los inhibidores de Nox (DPI y GKT), para determinar si presentan algún efecto sobre la movilidad de los espermatozoides en condiciones NC y CAP.

Los resultados muestran que los inhibidores no tuvieron un efecto negativo ni sobre la movilidad total de las células, ni en los parámetros que se consideran para medir la movilidad hiperactivada como lo son la velocidad curvilínea (VCL), linealidad (LIN) y amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH) en espermatozoides NC (Figura 9). El thimerosal funciona como un activador de la hiperactivación, incrementando el Ca^{2+} y desencadenando un incremento en la movilidad hiperactivada. Sin embargo, en la condición CAP, el GKT [10 μ M] presenta valores similares a los que reportamos para el thimerosal (Thim), generándose un incremento en la VCL y la ALH, y un valor de la LIN disminuido, comparado con el control.

El thimerosal produjo el aumento esperado en la movilidad de los espermatozoides y este compuesto tiene un efecto activador que dura algunos segundos y culmina paralizando a las células.

Por otro lado, Ghanbari y colaboradores muestran que el DPI no tiene efecto sobre la movilidad de los espermatozoides de humano en condiciones control ⁸⁶ y Moreno-Irusta lo demuestra en espermatozoides de caballo ²⁷, por lo que consideramos que nuestros resultados apoyan lo reportado.

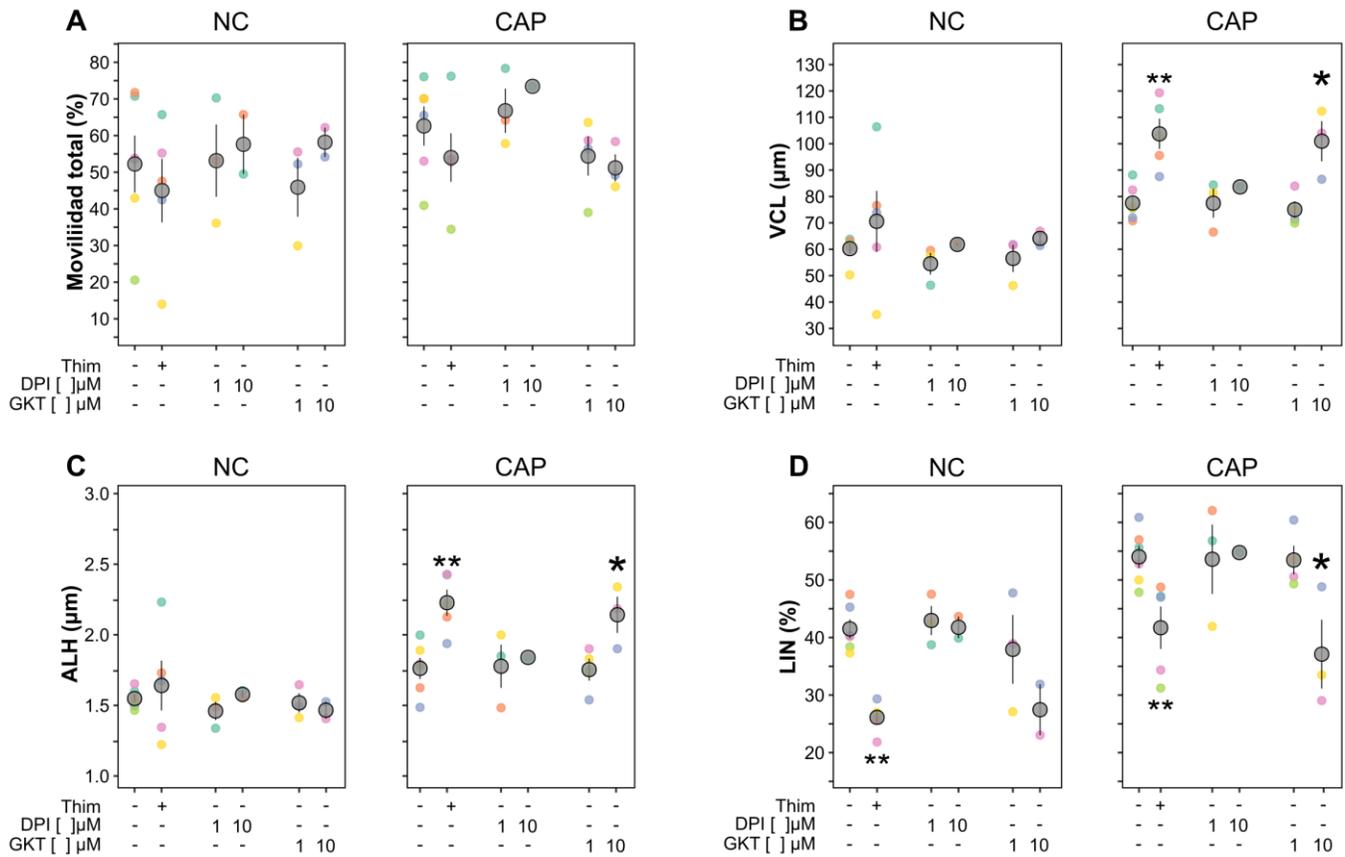


Figura 9. Evaluación de la movilidad de espermatozoides en presencia de inhibidores de Nox. En condiciones NC y CAP, se evaluó en **A.** el porcentaje de la Movilidad total, en **B.** la VCL, en **C.** la ALH y en **D.** la LIN., en presencia de DPI [1 y 10 μM], GKT [1 y 10 μM] y Thim [5 μM]. Los puntos de colores indican el promedio de cada donador y los puntos grises indican el promedio global para cada tratamiento. Velocidad curvilínea= VCL, Amplitud lateral de la cabeza= ALH, Linearidad= LIN y Thimerosal= Thim. n= 7, ~ 500 células por condición. Los asteriscos indican diferencias significativas comparados con la condición control (NC-CAP). $p \leq 0.05$

Evaluación del Ca^{2+} y de la exocitosis acrosomal en presencia de inhibidores de Nox.

La exocitosis acrosomal es un proceso indispensable en los espermatozoides para que ocurra la fecundación y algunos efectores principales en este proceso son la Pg y un aumento en el Ca^{2+} , por lo que podrían estar participando diferentes vías de señalización en su regulación^{68,87-89}. Además, se sabe que la Pg participa en la entrada de Ca^{2+} por uno de los canales más importantes y estudiados del espermatozoide, CatSper^{87,90}. Por otro lado, algunos autores han sugerido que hay una relación entre la Pg y la producción de O_2^- , ya que al realizar ensayos de exocitosis acrosomal en presencia de Pg (como agonista) y de la SOD, este evento disminuye⁹¹. Desde hace algunos años se ha propuesto que la entidad generadora de ROS en el espermatozoide

podría estar involucrada en el proceso de exocitosis acrosomal, ya que cuando las células están incubadas en un ambiente oxidante, por ejemplo, con xantina-xantina oxidasa, este proceso de exocitosis acrosomal aumenta ^{61,91,92}.

Una de las entidades generadoras de O_2^- en el espermatozoide humano es Nox5, por lo que surge la necesidad de saber si Nox5 está participando en la exocitosis acrosomal del espermatozoide humano. Por esta razón se propuso la medición de Ca^{2+} y exocitosis acrosomal de manera simultánea por medio de registros de imágenes de célula individual, en presencia o ausencia del inhibidor GKT, en condiciones NC y CAP.

En la Figura 10 se muestran trazos representativos de medición de Ca^{2+} bajo distintos estímulos, como la Pg (estímulo fisiológico), la ionomicina (valor máximo de fluorescencia) y $MnCl_2$ (valor mínimo de fluorescencia), que nos permitieron hacer normalizaciones y obtener las variables de respuesta (Figura 10B-D).

La fluorescencia basal entre la condición NC y CAP, con y sin inhibidor no tuvo cambios, lo que indica que el GKT por sí solo no afecta el Ca^{2+} .

Nuestros resultados muestran que en condiciones NC (Figura 10A) y en presencia del inhibidor GKT el valor del pico de la respuesta de Ca^{2+} inducido por Pg es mayor, que el incremento provocado por la ionomicina tanto en condiciones control (GKT-), como con el GKT (Figura 10B). De la misma manera, en condiciones CAP la inducción de Pg en presencia de GKT, también produce una respuesta mayor de Ca^{2+} , aunque no llega al nivel del efecto provocado de la ionomicina. Además, en esta condición el valor de la pendiente de subida en presencia del GKT aumenta al estar en contacto con la Pg, lo que indica que la velocidad de respuesta de las células es mayor que en el control. Así mismo, observamos que el valor del área bajo la curva de la respuesta de Ca^{2+} es mayor, lo que sugiere que los mecanismos de regulación del Ca^{2+} en la célula tienden a ser más lentos.

Estos resultados demuestran que la inhibición en la producción de O_2^- debido al GKT provoca cambios en el Ca^{2+} , pero sólo en respuesta a Pg y que los mecanismos que estabilizan estos cambios se ven afectados, ya que tienden a ser más lentos que en condiciones control.

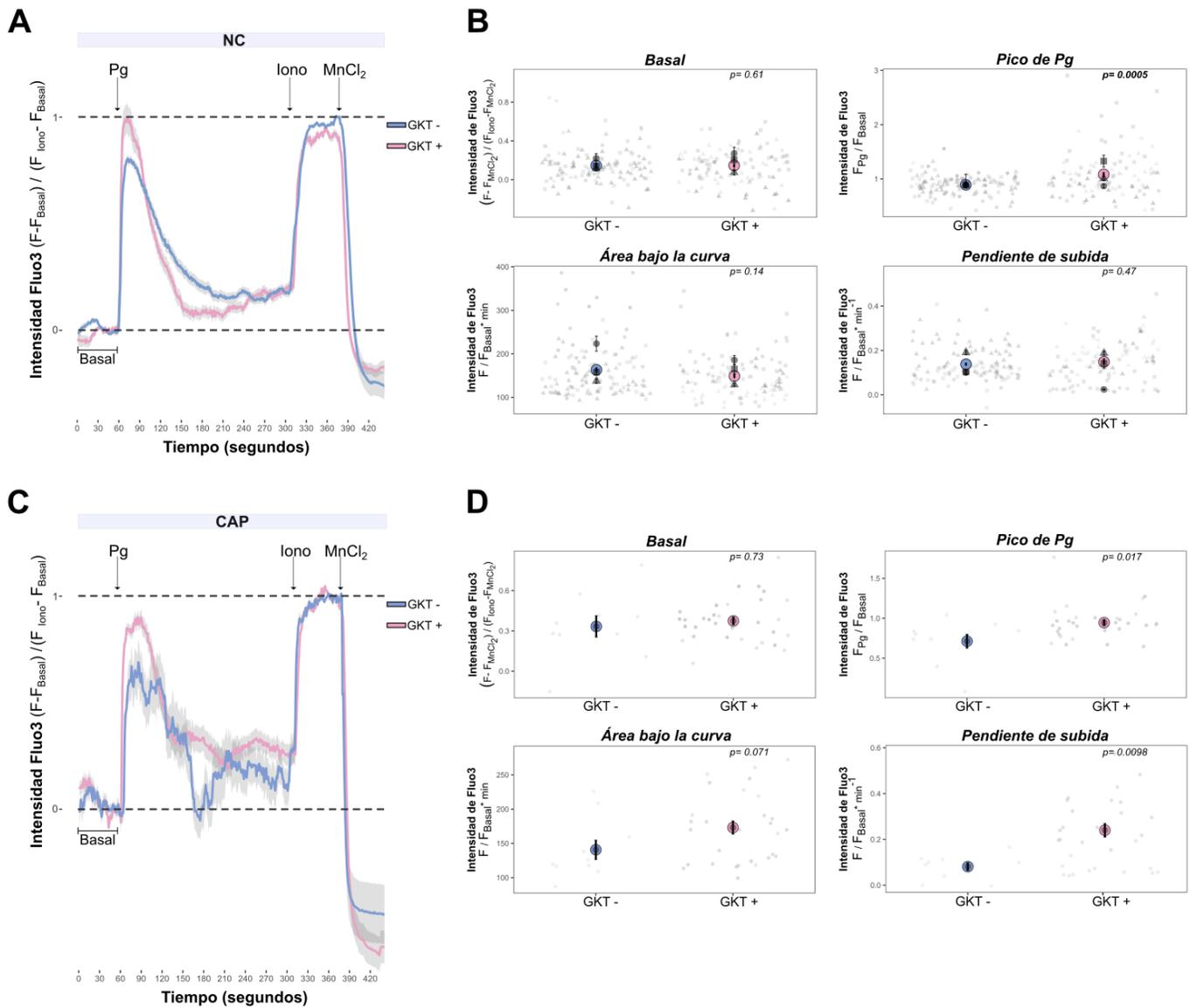


Figura 10. Registros de Ca^{2+} en imágenes de células individuales en presencia de GKT. Trazos representativos de Ca^{2+} en el tiempo en respuesta a Pg, ionomicina y $MnCl_2$, en condiciones NC **(A)** y CAP **(C)**. Parámetros asociados con la respuesta de Pg, como la fluorescencia Basal, el Pico de Pg, el Área bajo la curva y la Pendiente de subida, en condiciones NC **(B)** y CAP **(D)**. Los trazos azules corresponden al control o ausencia de GKT (GKT-) y los trazos en rosa corresponden al tratamiento con GKT (GKT+). Las flechas indican el momento de adición de los diferentes estímulos. Los registros tuvieron una duración de 7.5 min aproximadamente. La fluorescencia de Fluo3 se normalizó para cada parámetro y se indica en cada panel. Se realizó una prueba de Wilcoxon, $p \leq 0.05$. $n = 3$, ~200 células.

Con respecto a la medición de la exocitosis acrosomal, se realizaron registros en células individuales, donde se obtuvieron valores de Ca^{2+} reportados por la fluorescencia de Fluo3 y de exocitosis acrosomal reportados por la fluorescencia de FM4-64. Las células se expusieron a

distintos estímulos, de Pg, ionomicina y MnCl₂ en el tiempo, con la ventaja de registrar los cambios de fluorescencia de ambos colorantes de manera simultánea.

En la Figura 11A se muestran los canales de fluorescencia para Fluo3, FM 4-64 y la sobreposición de estos, en los cuales se señalan con flechas sólidas las células que experimentaron exocitosis acrosomal y con flechas abiertas las células no reaccionadas. Además, en la Figura 11B panel izquierdo, se muestran los trazos representativos de una célula que tuvo un incremento en el Ca²⁺ tras el estímulo de Pg y en mayor magnitud con ionomicina, pero que no presenta cambios en la fluorescencia de FM4-64, que demuestra que no ocurrió la exocitosis acrosomal. Por otro lado, en la Figura 11B panel derecho, se observa un incremento de Ca²⁺ tras el estímulo de Pg, y que tras el segundo pico de Ca²⁺, ocurre la exocitosis acrosomal, denotada por el incremento en la fluorescencia de FM4-64. Finalmente, se realizó una cuantificación de la exocitosis acrosomal inducida por Pg en presencia o ausencia de los inhibidores.

En condiciones NC, la inducción de la exocitosis acrosomal con Pg aumentó en presencia de ambos inhibidores, siendo aproximadamente del 30 %, que podría tener relación con el resultado del incremento exacerbado de Ca²⁺ en respuesta a la Pg. En contraste en condiciones CAP, los inhibidores tienen un efecto que disminuye el porcentaje de células que experimentaron la exocitosis acrosomal.

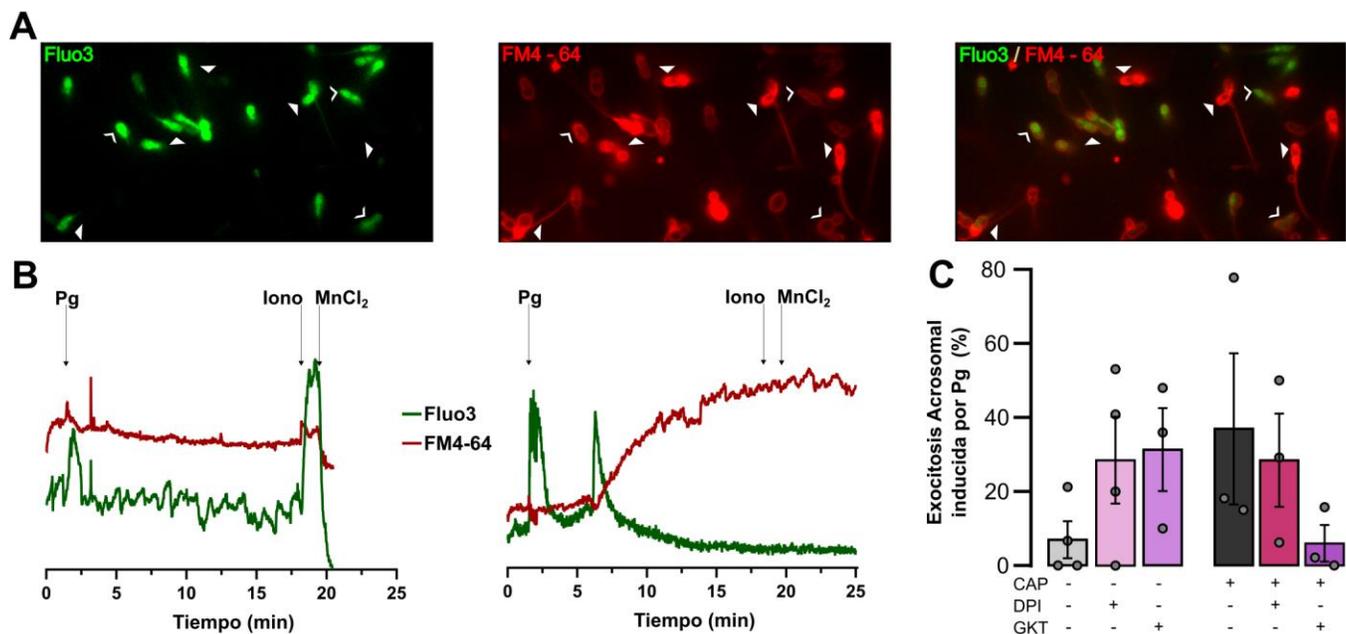


Figura 11. Determinación de la exocitosis acrosomal en imágenes de células individuales en presencia de inhibidores de las Nox. A. Panel Izquierdo- Imágenes de Ca²⁺ de células teñidas con Fluo3. **Panel Central-** Imágenes de exocitosis acrosomal teñidas con FM4-64. **Panel**

Derecho- Sobreposición de imágenes de fluorescencia de Fluo3 y FM4-64. Flecha abierta, marca las células no reaccionadas. Flecha sólida, indica las células que sufrieron exocitosis acrosomal. **B.** Trazos representativos de Ca^{2+} (verde) y exocitosis acrosomal (rojo) durante el tiempo de adquisición de las imágenes. Las adiciones de Pg, ionomicina y MnCl_2 , se indican en cada tiempo. **Panel Izquierdo-** Trazo de una célula que responde a ionomicina, produciendo un aumento de Ca^{2+} , sin excitar su acrosoma. **Panel Derecho-** Trazo de una célula que responde a Pg, produciendo un incremento en la respuesta de Ca^{2+} y que a su vez reacciona y se denota por un incremento en la fluorescencia de FM4-64. **C.** Cuantificación de la exocitosis acrosomal en respuesta al estímulo de Pg, bajo condiciones NC y CAP, y diferentes tratamientos, con (DPI+, GKT+) y sin inhibidores (DPI-, GKT-). La fluorescencia de Fluo3 y FM4-64 se normalizó para cada trazo. Se realizó una prueba de Kruskal Wallis, $p \leq 0.05$. $n = 3$, ~100 células.

Discusión

Nox5 y Duox1 están presentes en el espermatozoide humano

En este proyecto los anticuerpos primarios para Nox5 detectaron una proteína de un peso molecular aproximado de 85 kDa que sugiere la expresión de Nox5 en el espermatozoide de humano. La especificidad de este resultado se confirmó por la ausencia de expresión de esta proteína en el espermatozoide de ratón.

Uno de los problemas latentes en el uso de las técnicas de inmunocitoquímica, es que no siempre se tiene certeza sobre la especificidad de los anticuerpos ante la proteína de interés. Una de las estrategias empleadas para tener mayor confianza en los resultados obtenidos, es el uso de los denominados péptidos competidores, es decir, el péptido que se utilizó como epítipo para producir el anticuerpo. Debido a que comercialmente no se encuentran los péptidos competidores para los anticuerpos contra Nox5 y Duox1, este trabajo no cuenta con ese control, por lo que las alternativas que proponemos para validar la especificidad de los anticuerpos en un futuro sería incluir líneas celulares o tejidos de expresión endógena de nuestras proteínas, o expresar heterológicamente las proteínas (control positivo), así como usar tejidos o líneas celulares que no expresen las proteínas de interés (control negativo). Otra estrategia es, como se mencionó anteriormente, realizar secuenciación por espectroscopia de masas de nuestras bandas que dieron señal a nuestros anticuerpos.

Por otro lado, puesto que en su mayoría se encontraron reportes exclusivamente de análisis proteómicos sobre la presencia de Duox1 y no de Duox2 en el espermatozoide de humano ^{79,93}, que la Duox2 es de mayor peso molecular (175 kDa) y que en las repeticiones realizadas en este

trabajo por *western blot* siempre se encontró la banda de peso molecular de 150 kDa, nos centramos en localizar a Duox1.

Con los resultados mostrados se puede concluir que tanto Nox5 como Duox1 se expresan en espermatozoides de humano, siendo este el primer trabajo donde se localiza Duox1 por medio de *western blot* en lisado total de espermatozoides de humano y que su expresión no difiere entre un estado capacitado y no capacitado.

Por otra parte, la localización de Nox5 es consistente en la pieza principal del espermatozoide con ambos anticuerpos, y debido a las observaciones planteadas, nos gustaría determinar en un estudio posterior la localización con mayor detalle de Nox5, por lo que, como trabajo adicional se planea utilizar la microscopía de superresolución y aprovechar el desarrollo de nuevas herramientas, con las cuáles a partir de imágenes obtenidas con microscopía confocal, se puede tener una mayor resolución espacial de las proteínas de interés ⁹⁴. Además de obtener la información de la localización de Nox5 a nivel nanoscópico, nos gustaría determinar si ésta se encuentra en las vecindades de otras proteínas que son indispensables para el correcto funcionamiento del espermatozoide, como lo son CatSper y Hv1.

Nuestros resultados confirman la localización de Nox5 en el cuello y en la pieza principal del espermatozoide humano, que previamente reportó Musset y colaboradores ⁴³. Sin embargo, en el mismo trabajo también encontraron señal en el acrosoma, esta última observación no se detectó con los anticuerpos que se utilizaron para este trabajo. Por otro lado, algunos reportes en otros mamíferos también señalan la presencia de Nox5 en el espermatozoide. En el 2007 se reportó la presencia de Nox5 en la cabeza del espermatozoide de caballo, localizándose específicamente en la región del acrosoma y en la zona ecuatorial ⁴⁹. Miguel-Jiménez y colaboradores, caracterizaron a la Nox5 en espermatozoides de carnero, y detectaron diferentes patrones de localización en la cabeza y en la pieza media. Una observación importante e interesante es que, tanto en caballo como en carnero, no se reporta la presencia de Nox5 en la pieza principal del espermatozoide ^{48,49} a diferencia de lo observado en espermatozoides humanos.

De acuerdo con los resultados obtenidos por microscopía confocal y citometría de flujo con imágenes, se encontraron los mismos patrones de localización de Nox5 en el espermatozoide humano, y dado que los anticuerpos utilizados en este trabajo reconocen diferentes regiones de la proteína (región amino y carboxilo terminal), le proporcionan mayor certeza a nuestros resultados.

La producción O_2^- debido a Nox5 depende del Ca^{2+} i

Los espermatozoides son sensibles a los cambios en el medio que se encuentran, ya que su regulación depende de los cambios iónicos y el ambiente redox intracelular.

En el campo de la fisiología espermática hay una controversia sobre si las ROS favorecen o perjudican algunos procesos celulares en el espermatozoide. Por lo que, durante años se ha investigado el papel de estas ROS en procesos esenciales del espermatozoide. Evidencia anteriormente mencionada, propone que el O_2^- es una molécula que podría tener un efecto favorable sobre algunos procesos necesarios para llevar a cabo la fecundación ^{28,58,95}.

Abordando la idea de Nox5 como entidad generadora de O_2^- y su relación con los cambios en el Ca^{2+} i, nuestros hallazgos demuestran que existe una dependencia en la producción de O_2^- en función del Ca^{2+} , dado que tanto la Pg como la ionomicina inducen un aumento en el O_2^- . Nuestra propuesta es que el Ca^{2+} que entraría en principio a la célula, a través de CatSper, podría estar activando a Nox5 y se ve reflejado en el aumento de O_2^- , lo cual se abate en presencia de los inhibidores de Nox, en especial con DPI, que impide el flujo de electrones a través de la enzima, funcionando como un antioxidante ⁹⁶. Esto sugiere que es posible que exista una relación funcional entre CatSper y Nox5, aunque se requieren controles adicionales, así como explorar otras condiciones experimentales que nos permitan establecer si es una relación directa o indirecta.

Por otro lado, el GKT parece no tener un efecto de la misma magnitud que el DPI, y quizá se deba a que actúa como competidor por el sitio de unión del sustrato de la Nox¹⁰⁴, por lo que cabe la posibilidad de que se requiera a futuro determinar la IC_{50} (*inhibitor concentration*, por sus siglas en inglés) en nuestro sistema. Para complementar estos resultados, podrían añadirse algunos controles tanto para favorecer un ambiente oxidante con menadiona, X+XO o con superóxido de potasio (KO_2), así como eliminar el O_2^- con SOD y corroborar la producción de ROS con otras técnicas como la quimioluminiscencia o espectrofluorimetría de mezclado rápido, por ejemplo.

La actividad de Nox5 transloca e^- a través de la membrana plasmática y a su vez, como resultado de la oxidación del NADPH, se producen H^+ en el interior celular, que proponemos que pudieran ser extruidos por Hv1, lo que resultaría en una afectación tanto en el potencial de membrana, como en el pH intracelular. Por lo que, en un futuro, consideramos evaluar si Nox5 tiene un impacto en la alcalinización y la hiperpolarización asociados a la capacitación.

Otra perspectiva es poder hacer mediciones simultáneas de Ca^{2+} y O_2^- aprovechando la citometría de flujo con imágenes y la citometría de flujo de adquisición continua ⁹⁷, donde se pueden hacer adiciones y registrar los cambios de fluorescencia en el tiempo.

Nox5 no participa en la movilidad espermática.

La hiperactivación es un evento que se desarrolla durante la capacitación, que es esencial para que los espermatozoides puedan llegar al sitio de fecundación en el tracto genital femenino y algunos reportes hacen notar que el O_2^- tiene un papel que favorece esta movilidad, por lo que determinamos si Nox5 está involucrada en este evento.

Nuestros datos demuestran que los inhibidores de Nox no tuvieron un impacto negativo sobre la movilidad total y sobre la hiperactivación de los espermatozoides, a ninguna concentración [1 y 10 μ M], que sugiere que Nox5 no participa en la movilidad, negando una parte de la hipótesis planteada.

Un dato para considerar es que las grabaciones tienen una duración de 3 segundos, que es 6 veces mayor al tiempo reportado en la literatura, que es de 0.5 segundos. El razonamiento fue que, al tener mayor tiempo de grabación podríamos tener mayor tiempo de análisis del efecto de los inhibidores, aunque esto podría estar enmascarando el resultado, ya que se vio que los espermatozoides pueden cambiar su patrón de nado en el tiempo de un segundo a otro.

En la literatura, la hiperactivación se ha definido a partir de experimentos con el sistema CASA a tiempos muy cortos y se ha demostrado que los espermatozoides pueden transitar de una movilidad a otra en cuestión de segundos, por lo que sería conveniente hacer otro tipo de estudios en tiempos más largos en presencia de los inhibidores y a su vez, aumentando de forma artificial la producción de ROS.

Nox5 podría estar participando en la regulación del estado capacitado.

Los resultados de los registros de células individuales sugieren que el O_2^- podría estar modulando de forma negativa la activación de CatSper, ya sea por algún efecto sobre la lipasa ABDH2 o sobre el propio canal, ya que al inhibir la producción de O_2^- , la respuesta de Ca^{2+} a Pg se exagera y se ve afectada la homeostasis de Ca^{2+} . Para corroborar esta idea en trabajos posteriores se propone utilizar controles que favorezcan un ambiente oxidativo, así como el uso de la SOD y los inhibidores de Nox, para medir los cambios en la fluorescencia del Ca^{2+} .

Por otro lado, la inducción de la exocitosis acrosomal por Pg en presencia de los inhibidores de Nox, en condiciones NC producen un aumento en el número de células que reaccionan, lo que apoyaría la propuesta de que el O_2^- podría estar regulando a CatSper, ya que al inhibir a Nox5 se ve afectada la regulación intracelular del Ca^{2+} induciendo una mayor exocitosis acrosomal. Debido

a que estas células se encuentran en un estado NC, podrían no estar activos los mecanismos de regulación que le permiten contender con estos estímulos.

Adicionalmente en condiciones CAP, los inhibidores de Nox tienen un efecto negativo sobre la exocitosis acrosomal, que provoca que las células no reaccionen. Lo que denota que se requiere del O_2^- producido por Nox5 para que ocurra la exocitosis acrosomal, pero en un estado capacitado. Por lo que creemos que el O_2^- podría tener un efecto dual, en el que en condiciones NC, su producción afecta la regulación del Ca^{2+} intracelular provocando cambios en la célula que culminan en la exocitosis acrosomal. A diferencia de un estado CAP, donde se requiere de la actividad de Nox5 para producir O_2^- y regular algunas entidades, (por ejemplo, CatSper) y procesos esenciales en el espermatozoide como lo es la exocitosis acrosomal.

Nuestros datos confirman la participación de Nox5 en la capacitación del espermatozoide de humano y nos dan información para continuar explorando la temporalidad y los fenómenos que ocurren en esta célula tan particular e interesante que es el espermatozoide.

Los resultados de este trabajo sugieren una relación funcional entre Nox5, Hv1 y CatSper.

Conclusiones

- Nox5 se localiza en la zona ecuatorial, en la base de la cabeza y en la pieza principal del espermatozoide humano.
- El patrón de detección de Nox5 es por igual en NC y CAP y homogénea en la población.
- Duox1 está presente en el espermatozoide humano.
- Existe una relación entre la producción de O_2^- y la entrada de Ca^{2+} a la célula producto de la actividad de CatSper.
- Nox5 no regula directamente la movilidad de los espermatozoides.
- Nox5, así como el O_2^- tienen un papel relevante en la respuesta de Ca^{2+} y favorecen el proceso de exocitosis acrosomal en espermatozoides capacitados.

Perspectivas

- Validar los anticuerpos utilizados para detectar a la Nox5 y Duox1 en tejidos/ líneas celulares de expresión endógena de estas proteínas o por expresión heteróloga (control positivo), así como otros que no las expresen (control negativo).

de aminoácidos, sus dominios intracelulares y transmembranales, basados en la información descrita en la base de datos Uniprot (Q96PH1) y en los datos de Banfi, et al., 2001. La numeración del 1 al 6 indican los segmentos transmembranales de la proteína, los aminoácidos marcados en color verde indican los dominios de Manos EF, los marcados en color azul en la región amino terminal indican la secuencia que reconoce el anticuerpo N-terminal y los marcados en azul en la región carboxilo terminal, indican la secuencia que reconoce el anticuerpo C-terminal. Los aminoácidos marcados en color rosa indican el segmento en el que se une el FAD, en color morado el segmento de unión al NADPH y en amarillo la región de unión a Calmodulina. Todos los dominios funcionales de Nox5 se encuentran del lado intracelular de la membrana. Modelado hecho en la herramienta Protter.

S2. Controles con anticuerpos secundarios y con espermatozoides de ratón.

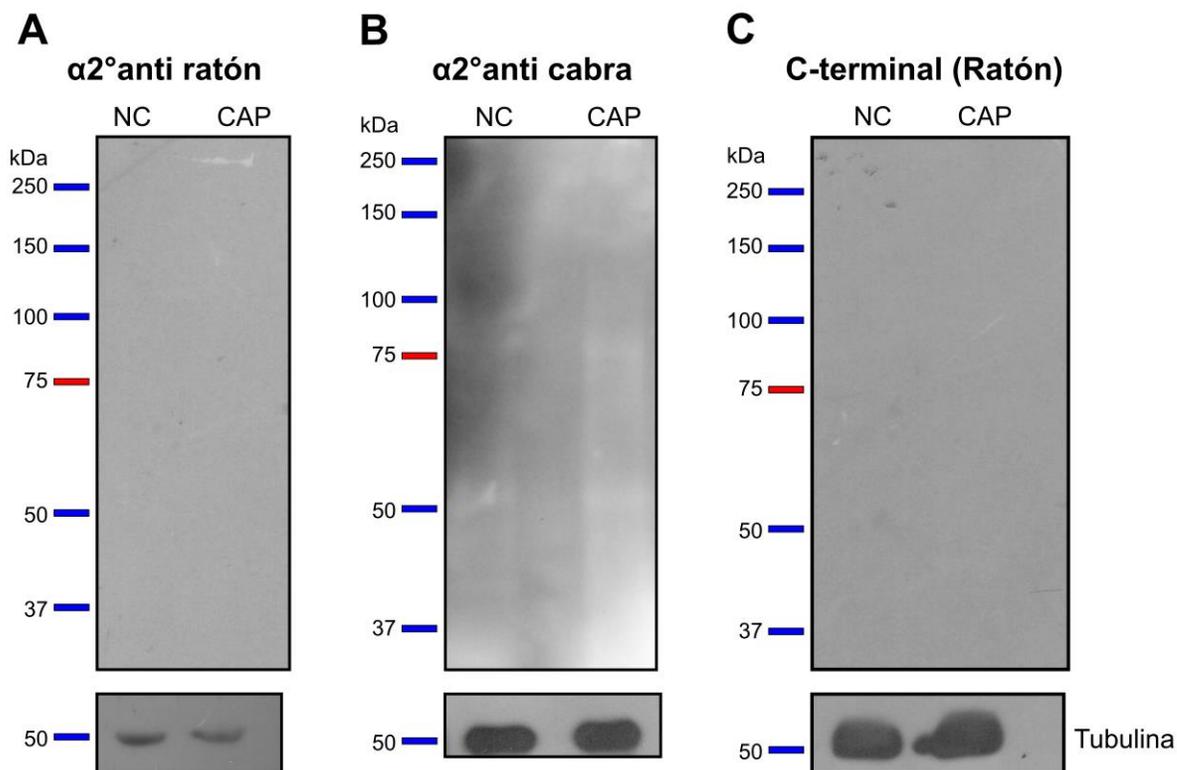


Figura S2. Controles negativos con anticuerpos secundarios y con espermatozoides de ratón. Panel izquierdo y central. Membranas reveladas solo con anticuerpos secundarios, anti ratón y anti cabra, respectivamente. No se detecta alguna señal inespecífica con los anticuerpos secundarios. **Panel derecho.** Membrana revelada contra el anticuerpo para Nox5 C-terminal en espermatozoides de ratón. No se detectan bandas. Parte inferior. Control de carga de cada membrana con el anticuerpo contra Tubulina, con un peso molecular de 50 kDa. n= 2.

S3. Alineamiento de secuencias de Duox1/2 y la secuencia del anticuerpo Nox5 C-terminal.

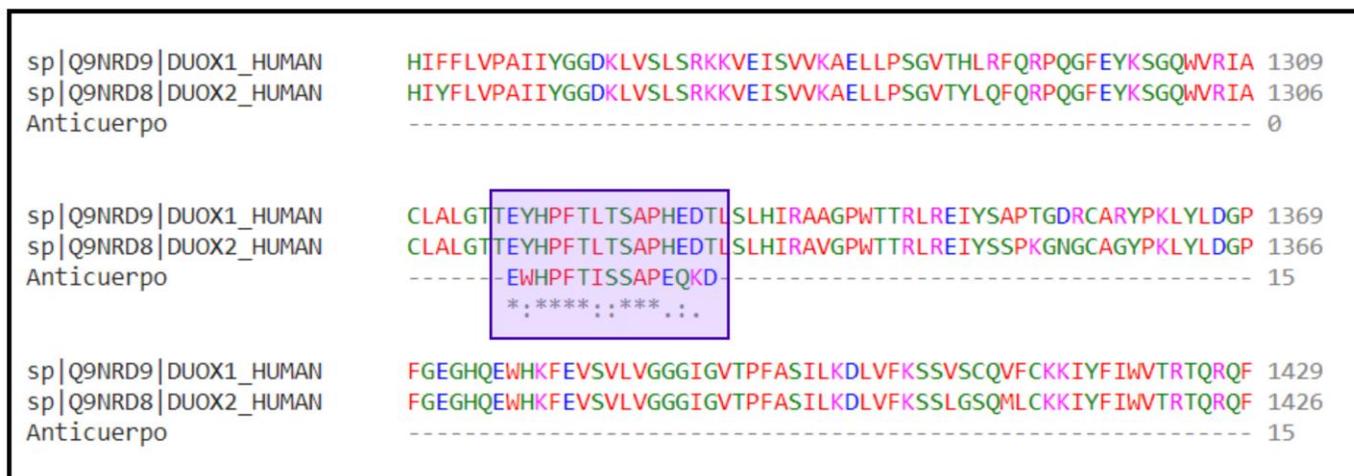


Figura S3. Alineamiento de secuencias de Duox1, Duox2 y la secuencia que reconoce en anticuerpo Nox5 C-terminal. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos Pubmed (Q9NRD9 y Q9NRD8). Se realizó un alineamiento de secuencias usando el programa Clustal Omega. En el recuadro de color morado se muestra el alineamiento de las 3 secuencias, el asterisco (*) muestra la posición con residuos 100 % idénticos, los dos puntos (:) indican posiciones en las que se realizaron sustituciones conservativas y el punto (.) indica sustituciones menos conservativas.

S4. Controles de inmunofluorescencia con anticuerpos secundarios.

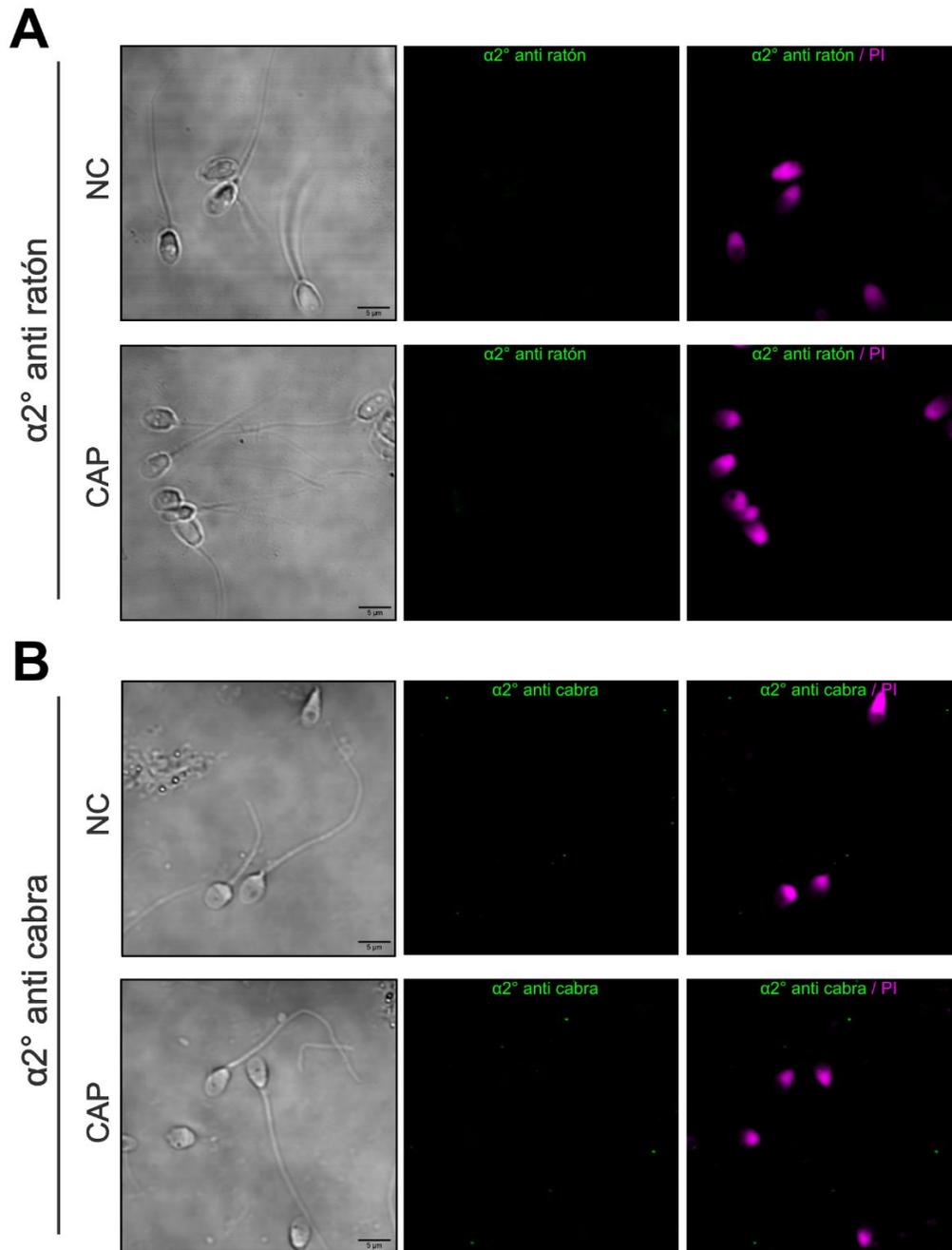


Figura S4. Inmunofluorescencia con los anticuerpos secundarios en espermatozoides humanos. Imágenes representativas en condiciones NC y CAP, que muestran el canal para la señal de los $\alpha 2^\circ$ anti ratón en **A.**, y $\alpha 2^\circ$ anti cabra en **B.** **Panel izquierdo.** Campo claro. **Panel central.** Señal del anticuerpo secundario. **Panel derecho.** Sobreposición de la imagen en fluorescencia de los anticuerpos secundarios y el núcleo de la célula teñido con PI (magenta). n= 3 donadores, ~30 células totales.

S5. Inmunofluorescencia contra Nox5 en espermatozoides de ratón.

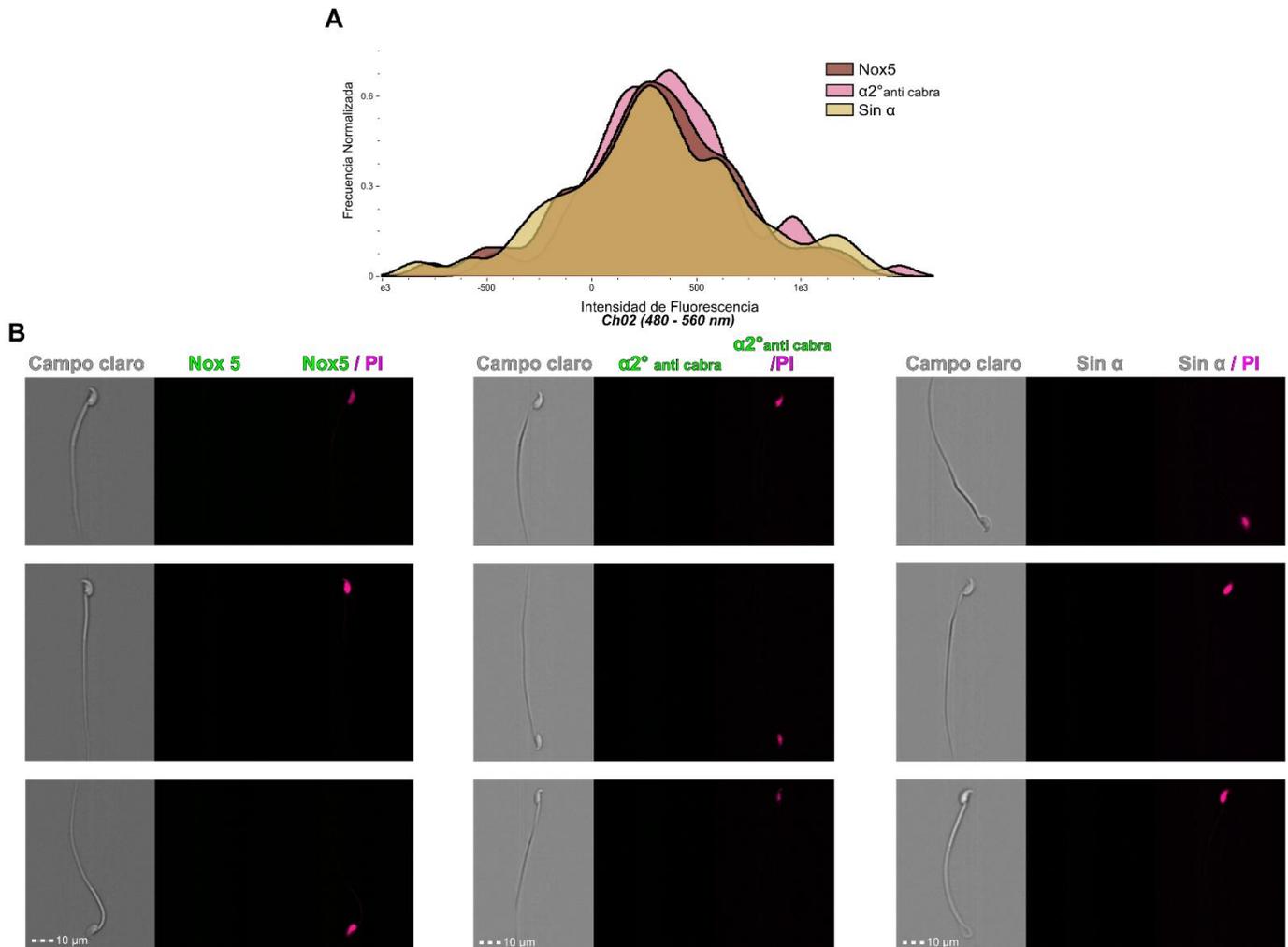


Figura S5. Inmunofluorescencia contra Nox5 en espermatozoides de ratón. **A.** Distribución representativa de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo Nox5 C-terminal (trazo rosa oscuro), $\alpha 2^{\circ}$ anti cabra (trazo rosa claro) y sin anticuerpo (trazo café claro) en condiciones CAP. **B.** Imágenes representativas que corresponden a los histogramas en A. **Panel izquierdo-** condición con el anticuerpo de Nox5, **Panel central-** condición con el $\alpha 2^{\circ}$ anti cabra y **Panel izquierdo-** condición sin anticuerpo Sin α /PI. Cada panel muestra el campo claro, el canal para el anticuerpo Nox5 y una sobre posición de la fluorescencia del anticuerpo Nox5 y de PI. $n = 2$, $\sim 2,000$ células por condición.

Información Complementaria

Soluciones para Western Blot

Acrilamida: Bis-Acrilamida (30:0.8)

Acrilamida 30 g, N-N metileno-bis acrilamida 0.8 g y 100 ml de agua destilada. Almacenar a 4 °C y cubierta de la luz.

Dodecil sulfato sódico (SDS) 10 %

SDS 5 g y 50 ml de agua destilada. Almacenar a 4 °C o a T.A, si se precipita se debe volver a disolver.

Buffer de corrida 10X

Tris base 15.2 g, Glicina 72.1 g, SDS 5 g y 500 ml de agua destilada.

TBS 10X (Tris buffer salino)

NaCl 80 g (1300 mM), Tris base 24.2 g (200 mM) y 100 ml de agua destilada.

TBS-T 1X (TBS 1X + Tween-20 0.1 %)

A 500 ml de TBS 1X, agregar 500 µl de Tween-20. Almacenar a T.A.

Buffer de carga 2.5X (SB 2.5X) sin β-mercaptoetanol

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (0.2 M) 4 ml, SDS 0.5 g (5 %), Azul de bromofenol 0.0015 g (0.15 mg/ml), Glicerol 2.5 ml (25 %) y 3 ml de agua destilada (volumen final 10 ml).

Se puede agregar 5 ml de SDS 10 %. Almacenar a T.A, 4 °C o -20 °C.

Buffer de Transferencia 10X

Tris base 30.2 g, Glicina 144.1 g, 1000 ml de agua destilada. Almacenar a T.A.

Gel Separador 10 %

Agua destilada 4 ml, buffer pH 8.8 2.5 ml, Acrilamida 3.3 ml, APS 10 % 120 µl y TEMED 6 µl. Volumen final 10 ml.

Gel Condensador 4.5 %

Agua destilada 2.36 ml, buffer pH 6.8 1 ml, Acrilamida 0.6 ml, APS 10 % 37.5 µl y TEMED 2.5 µl. Volumen final 4 ml.

Referencias

1. Lottero-Leconte, R., Isidro Alonso, C. A., Castellano, L. & Martinez, S. P. Mechanisms of the sperm guidance, an essential aid for meeting the oocyte. *Transl Cancer Res* **6**, S427–S430 (2017).
2. Breitbart, H. & Shabtay, O. *Sperm acrosome reaction*. *Encyclopedia of Reproduction* vol. 3 (Elsevier, 2018).
3. Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C. & Treviño, C. L. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev* **91**, 1305–1355 (2011).
4. Yanagimachi, R. Fertility of mammalian spermatozoa: Its development and relativity. *Zygote* **2**, 371–372 (1994).
5. Chang, M. C. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* (1951).
6. Austin. The Capacitation of the Mammalian Sperm. **170**, 328–329 (1952).
7. Cross, N. L. & Razy-Faulkner, P. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod* **56**, 1169–1174 (1997).
8. Matamoros-Volante, A. & Treviño, C. L. Capacitation-associated alkalization in human sperm is differentially controlled at the subcellular level. *J Cell Sci* **133**, (2020).
9. López-González, I. *et al.* Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **20**, 619–629 (2014).
10. Carrera, A. *et al.* Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: Identification of A Kinase Anchor Proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol* **180**, 284–296 (1996).
11. Visconti, P. E. *et al.* Capacitation of mouse spermatozoa. 1. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**, 1129–1137 (1995).
12. Davis, B. K. Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/ phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval (interspecies correlations/sperm cholesterol efflux/acrosome reaction). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **78**, 7560–7564 (1981).
13. Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H. & Sugita, Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 9699–9705 (1985).
14. Chen, Y. *et al.* Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* (1979) **289**, 625–628 (2000).
15. Buffone, M. G., Wertheimer, E. V., Visconti, P. E. & Krapf, D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1842**, 2610–2620 (2014).
16. Yanagimachi, R. The Movement of Golden Hamster Spermatozoa Before And After Capacitation. *J. Reprod. Fertil.* **23**, 193–196 (1970).

17. Yanagimachi, R. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Reprod Fertil* **18**, 275–286 (1969).
18. Suarez, S. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* **17**, (1996).
19. Suarez, S. S. Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update* vol. 14 647–657 Preprint at <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn029> (2008).
20. Buffone, M. G., Hirohashi, N. & Gerton, G. L. Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biol Reprod* **90**, 1–8 (2014).
21. Ickowicz, D., Finkelstein, M. & Breitbart, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl* **14**, 816–21 (2012).
22. Lamirande, E. De & Flaherty, C. O. *Sperm Capacitation as an Oxidative Event*. vol. Chapter 4 (2012).
23. Lamirande, E. De, Jiang, H., Zini, A., Kodama, H. & Gagnon, C. *Reactive oxygen species and sperm physiology*. *Reviews of Reproduction* vol. 2 (1997).
24. Lamirande, E. De & Gagnon, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa : a balancing act between beneficial and detrimental effects. 15–21 (1993).
25. Lamirande, E. De & Lamothe, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* **46**, 502–510 (2009).
26. O'Flaherty, C., De Lamirande, E. & Gagnon, C. Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* **40**, 1045–1055 (2006).
27. Moreno-Irusta A, et al., 2020. Reactive oxygen species are involved in the signaling of equine sperm chemotaxis. *Reproduction* **148** 581–59, (2020).
28. de Lamirande, E. & Cagnon, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med* **14**, 157–166 (1993).
29. Ghanbari, H., Keshtgar, S. & Kazeroni, M. *Inhibition of the CatSper Channel and NOX5 Enzyme Activity Affects the Functions of the Progesterone-Stimulated Human Sperm*. *IJMS* vol. 43 (2018).
30. Aitken, R. J. A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev* **6**, 19–24 (1994).
31. Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A. & Aitken, R. J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93**, 3199–3207 (2008).
32. Bedard, K. & Krause, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* **87**, 245–313 (2007).
33. Aitken, R. J. & Clarkson, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* **81**, 459–469 (1987).

34. Murphy, R. & DeCoursey, T. E. Charge compensation during the phagocyte respiratory burst. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1757**, 996–1011 (2006).
35. Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., Meir, E. G. V. & Lambeth, J. D. Homologs of gp91phox: Cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* **269**, 131–140 (2001).
36. Moghadam, Z. M., Henneke, P. & Kolter, J. From Flies to Men: ROS and the NADPH Oxidase in Phagocytes. *Front Cell Dev Biol* **9**, (2021).
37. Bánfi, B. *et al.* A Ca²⁺-activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph Nodes. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 37594–37601 (2001).
38. Armstrong, J. S., Bivalacqua, T. J., Chamulitrat, W., Sikka, S. & Hellstrom, W. J. G. A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells. *Int J Androl* **25**, 223–229 (2002).
39. Bedard, K., Jaquet, V. & Krause, K. H. NOX5: From basic biology to signaling and disease. *Free Radic Biol Med* **52**, 725–734 (2012).
40. Krause, K. H. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* **57**, 155–156 (2004).
41. Magnani, F. *et al.* Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 6764–6769 (2017).
42. Sumimoto, H., Miyano, K. & Takeya, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 677–686 (2005).
43. Musset, B. *et al.* NOX5 in human spermatozoa: Expression, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 9376–9388 (2012).
44. Fulton, D. J. R. Nox5 and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal* **11**, 2443–2452 (2009).
45. Maghzal, G. J., Krause, K. H., Stocker, R. & Jaquet, V. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med* **53**, 1903–1918 (2012).
46. Touyz, R. M., Anagnostopoulou, A., Camargo, L. L., Rios, F. J. & Montezano, A. C. Vascular Biology of Superoxide-Generating NADPH Oxidase 5-Implications in Hypertension and Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal* 1–14 (2019) doi:10.1089/ars.2018.7583.
47. Bánfi, B. *et al.* Mechanism of Ca²⁺ Activation of the NADPH Oxidase 5 (NOX5). *Journal of Biological Chemistry* **279**, 18583–18591 (2004).
48. Miguel-Jiménez, S. *et al.* NADPH Oxidase 5 and Melatonin: Involvement in Ram Sperm Capacitation. *Front Cell Dev Biol* **9**, 1–14 (2021).
49. Sabeur, K. & Ball, B. A. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reproduction* **134**, 263–270 (2007).
50. Castillo, K. *et al.* Voltage-gated proton (Hv1) channels, a singular voltage sensing domain. *FEBS Letters* vol. 589 3471–3478 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.003> (2015).

51. Miller, M. R. *et al.* Asymmetrically Positioned Flagellar Control Units Regulate Human Sperm Rotation. *Cell Rep* **24**, 2606–2613 (2018).
52. Zhao, R. *et al.* Role of human Hv1 channels in sperm capacitation and white blood cell respiratory burst established by a designed peptide inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E11847–E11856 (2018).
53. Lishko, P. V. *et al.* The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol* **74**, 453–475 (2012).
54. Carlson, A. E. *et al.* CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 14864–14868 (2003).
55. Quill, T. A. *et al.* Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 14869–14874 (2003).
56. Marquez, B. & Suarez, S. S. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline-Stimulated Ca²⁺ Influx1. *Biol Reprod* **76**, 660–665 (2007).
57. Hwang, J. Y. *et al.* Dual Sensing of Physiologic pH and Calcium by EFCAB9 Regulates Sperm Motility. *Cell* **177**, 1480-1494.e19 (2019).
58. Lamirande, E. De & Gagnon, C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* **16**, 21–25 (1993).
59. Lamirande, E. V. E. D. E. & Gagnon, C. Capacitation- associated production of superoxide anion by human spermatozoa. **18**, 487–495 (1995).
60. Aitken, R. J. *et al.* Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev* **47**, 468–482 (1997).
61. Griveau, J. F., Renard, P. & Lannou, D. LE. Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process. *Int J Androl* **18**, 67–74 (1995).
62. Altenhöfer, S., Radermacher, K. A., Kleikers, P. W. M., Wingler, K. & Schmidt, H. H. H. W. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxid Redox Signal* **23**, 406–427 (2015).
63. Gaggini, F. *et al.* First in Class , Potent , and Orally Bioavailable NADPH Oxidase Isoform 4 (Nox4) Inhibitors for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **4**, 7715–7730 (2010).
64. Seredenina, T., Demaurex, N. & Krause, K. H. Voltage-gated proton channels as novel drug targets: From NADPH oxidase regulation to sperm biology. *Antioxid Redox Signal* **23**, 490–513 (2015).
65. Satouh, Y., Inoue, N., Ikawa, M. & Okabe, M. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci* **125**, 4985–4990 (2012).
66. Alvarez, L., Friedrich, B. M., Gompper, G. & Kaupp, U. B. The computational sperm cell. *Trends Cell Biol* **24**, 198–207 (2014).

67. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. World Health vol. Edition Si (2021).
68. Sánchez-Cárdenas, C. *et al.* Starvation induces an increase in intracellular calcium and potentiates the progesterone-induced mouse sperm acrosome reaction. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **35**, 1–18 (2021).
69. Mata-Martínez, E. *et al.* Measuring intracellular Ca²⁺ changes in human sperm using four techniques: conventional fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging. *J Vis Exp* e50344 (2013) doi:10.3791/50344.
70. Ritagliati, C. *et al.* Lysine acetylation modulates mouse sperm capacitation. *Sci Rep* **8**, 1–14 (2018).
71. Matamoros-Volante, A. *et al.* Semi-automatized segmentation method using image-based flow cytometry to study sperm physiology: The case of capacitation-induced tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* **24**, 64–73 (2018).
72. Reis, J. *et al.* A closer look into NADPH oxidase inhibitors: Validation and insight into their mechanism of action. *Redox Biol* **32**, (2020).
73. Alquézar-Baeta, C. *et al.* OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS Comput Biol* **15**, 1–18 (2019).
74. Mortimer, S. T. CASA—Practical Aspects. *J Androl* **21**, 515–524 (2000).
75. Chávez, J. C. *et al.* Acrosomal alkalization triggers Ca²⁺ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *J Cell Physiol* **233**, 4735–4747 (2018).
76. Sánchez-Cárdenas, C. *et al.* Acrosome reaction and Ca²⁺ imaging in single human spermatozoa: New regulatory roles of [Ca²⁺]_i. *Biol Reprod* **91**, 1–13 (2014).
77. Manea, A. *et al.* Human monocytes and macrophages express NADPH oxidase 5; A potential source of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* **461**, 172–179 (2015).
78. Selemidis, S. *NADPH Oxidases*. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (2011). doi:10.1016/B978-008055232-3.63973-X.
79. Amaral, A., Castillo, J., Ramalho-Santos, J. & Oliva, R. The combined human sperm proteome: Cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Hum Reprod Update* **20**, 40–62 (2014).
80. Alva Alma, et al., 2022. Fluorescence fluctuation-based super-resolution microscopy : Basic concepts for an easy start. *J Microsc* 1–24 (2022) doi:10.1111/jmi.13135.
81. Touyz, R. M., Anagnostopoulou, A., Rios, F., Montezano, A. C. & Camargo, L. L. NOX5: Molecular biology and pathophysiology. *Exp Physiol* **104**, 605–616 (2019).
82. Burnaugh, L., Sabeur, K. & Ball, B. A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology* **67**, 580–589 (2007).

83. Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. *Hypertension Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. vol. 1527 (2017).
84. Aitken, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* **84**, 1039–1052 (2017).
85. Erdahl, W. L., Chapman, C. J., Taylor, R. W. & Pfeiffer, D. R. Effects of pH conditions on Ca²⁺ transport catalyzed by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin suggest problems with common applications of these compounds in biological systems. *Biophys J* **69**, 2350–2363 (1995).
86. Ghanbari, H., Keshtgar, S., Zare, H. R. & Gharezi-Fard, B. Inhibition of CatSper and Hv1 channels and NOX5 enzyme affect progesterone-induced increase of intracellular calcium concentration and ROS generation in human sperm. *Iran J Med Sci* **44**, 127–134 (2019).
87. Strünker, T. *et al.* The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* **471**, 382–387 (2011).
88. Harper, C. V., Barratt, C. L. R. & Publicover, S. J. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of [Ca²⁺]_i oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 46315–46325 (2004).
89. Tamburrino, L. *et al.* The CatSper calcium channel in human sperm: Relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. *Human Reproduction* **29**, 418–428 (2014).
90. Lishko, P. V., Botchkina, I. L. & Kirichok, Y. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* **471**, 387–392 (2011).
91. De Lamirande, E., Harakat, A. & Gagnon, C. Human Sperm Capacitation Induced by Biological Fluids and Progesterone, but Not by NAD or NADPH, is Associated With the Production of Superoxide Anion. (1998).
92. Aitken, R. J., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D. W. & Van Duin, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* **108**, 2017–2025 (1995).
93. Baker, M. A. *et al.* Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis. *Proteomics Clin Appl* **1**, 524–532 (2007).
94. Torres E, *et al.*, 2022. Nanoscopic resolution within a single imaging frame. *bioRxiv* 2021.10.17.464398 (2022).
95. De Iulius, G. N., Wingate, J. K., Koppers, A. J., McLaughlin, E. A. & Aitken, R. J. Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91**, 1968–1975 (2006).
96. Rodiño-Janeiro, B. K. *et al.* Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. *Vascular Health and Risk Management* vol. 9 401–428 Preprint at <https://doi.org/10.2147/VHRM.S33053> (2013).

97. Matamoros-Volante, A., Castillo-Viveros, V., Torres-Rodríguez, P., Treviño, M. B. & Treviño, C. L. Time-lapse flow cytometry: A robust tool to assess physiological parameters related to the fertilizing capability of human sperm. *Int J Mol Sci* **22**, 1–18 (2021).