



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ ESPECÍFICO DEL
ESPERMATOZOIDE EN MAMÍFEROS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA
SANDRA HERNÁNDEZ GARDUÑO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. LEÓN DAVID ISLAS SUÁREZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ROBERTO CARLOS MUÑOZ GARAY
INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS, UNAM

MÉXICO, CUERNAVACA MORELOS. FEBRERO DEL 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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio número dieciséis del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México), bajo la asesoría del Dr. Takuya Nishigaki dentro del Consorcio de la Fisiología del espermatozoide.

Investigación desarrollada gracias al apoyo de:
CONACYT (CB2017-2018 A1-S-8768), PAPIIT (DGAPA IN205719) y PAPIIT
IN205722.

Además, Sandra Hernández Garduño fue estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas contando con una beca CONACYT (516101).

También recibió apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para la asistencia a congresos nacionales e internacionales

Este trabajo recibió la siguiente asesoría

Asesoría técnica en laboratorio:

M. en C. Yoloxochitl Sánchez Guevara.

M. en C. Paulina Torres Rodríguez.

Biol. José Luis de la Vega Beltrán.

Auxiliar de laboratorio:

Miguel A. Trujillo.

Bioterio Instituto de Biotecnología de la UNAM:

M.V.Z. María Elena Elizabeth Mata Moreno.

M.V.Z. Graciela Margarita Cabeza Pérez.

Técnico Sergio González Trujillo.

Técnico Oswaldo López Gutiérrez.

Apoyo administrativo de la coordinación del posgrado:

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva.

Lic. Lidia Judith Martínez Carrera.

Servicios computacionales:

M. en T. I. Juan Manuel Hurtado.

MEM. David Santiago Castañeda Carreón.

Ing. Roberto Rodríguez Bahena

M.C. Arturo Ocádiz Ramírez

Unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM:

Dr. Rubén Paul Gaytán Colín.

M. en C. Jorge Arturo Yáñez.

M. en C. Eugenio López Bustos.

Biblioteca:

B.A. Dip. Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth.

Lic. I. Omar Arriaga.

Agradecimientos

A mi tutor y amigo, el **Dr. Takuya Nishigaki** por todas sus enseñanzas a través de todo mi doctorado, su guía, ejemplo y apoyo han sido fundamentales en mi formación.

A todos los miembros del **Consortio de la Fisiología del Espermatozoide**. Académicos: Dr. **Alberto Darszon**, Dra. **Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**, Dra. **Carmen Beltrán**, Dr. **Julio Cesar Chávez** y Dr. **Ignacio López**, por su retroalimentación, conocimientos, apoyo y ejemplo durante todo este tiempo. Agradezco la asesoría técnica de la M.C. **Yoloxochitl Sánchez Guevara**, la M.C. **Paulina Torres Rodríguez**, el Biol. **José Luis de la Vega Beltrán** por su participación invaluable en el desarrollo de este proyecto. A mi compañero y amigo, el Dr. **Arturo Matamoros Volante** por su retroalimentación para el desarrollo de este trabajo. A todos mis amigos y compañeros del laboratorio: Gabriela Carrasquel, José Pablo Ocelotl, Mariana Olivares, Hiram Pacheco, Daniel Ocampo, Valeria Castillo y César Arcos por su apoyo, retroalimentación y experiencias del día a día.

Al **Dr. León David Islas Suárez** y al **Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay**, miembros de mi comité tutorial, por su asesoría, sugerencias, conocimientos y acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de mi jurado, la Dra. **Tamara Luti Rosenbaum Emir**, la Dra. **María Castañeda Bueno**, el Dr. **Juan José Acevedo Fernández**, el Dr. **Luis Cárdenas Torres** por sus comentarios, sugerencias y observaciones que contribuyeron a enriquecer el contenido de este trabajo.

Dedicatoria

A mis padres que siempre me han impulsado a cumplir mis sueños y quienes con su ejemplo de motivan a perseverar en cada objetivo que me propongo.

A mi amigo y compañero del día a día Felipe, por su acompañamiento y aliento durante todo este recorrido.

Pokjú!!

Sandra

INDICE

INDICE DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Regulación de la movilidad del espermatozoide.....	13
2.2 El canal CatSper y la movilidad del espermatozoide	14
2.3 El intercambiador Na ⁺ /H ⁺ específico del espermatozoide (sNHE) como modulador de la actividad de CatSper.....	16
2.4 La regulación del pHi en los espermatozoides de ratón y humano	20
3. HIPOTESIS.....	22
4. OBJETIVO GENERAL.....	22
4.1 Objetivos particulares.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1 Reactivos.....	23
5.2 Genotipificación de ratones nulos de sNHE	23
5.3 Muestra biológica.....	23
5.3.1 Espermatozoides de ratón.....	23
5.3.2 Espermatozoides de humano.....	24
5.4 Imágenes de pH intracelular	25
5.5 Análisis de imágenes.....	26
5.6 Valores del pHi basal y el pHi pico	27
5.7 Clasificación del incremento de pHi inducido por valinomicina	27
5.8 Análisis de la movilidad de los espermatozoides de ratón	28
5.9 Evaluación del potencial de membrana (Vm) de los espermatozoides	28
5.10 Análisis bioinformático.....	29
6. RESULTADOS	30
6.1 La hiperpolarización del Vm alcaliniza el pHi del flagelo de los espermatozoides de ratón mediante la actividad de sNHE	30
6.2 La valinomicina induce la alcalinización del pHi del flagelo de los espermatozoides de ratón con diferentes tipos de cinéticas.....	32

6.3 La hiperpolarización del Vm no induce cambios del pHi en los espermatozoides de humano	36
6.4 La dependencia del voltaje del VSD del sNHE de humano podría ser diferente a la que presentan los espermatozoides de erizo de mar y ratón.....	38
7. DISCUSIÓN.....	40
7.1 La hiperpolarización del Vm en la fisiología del sNHE.....	40
7.2 La hiperpolarización del Vm induce la actividad del sNHE en los espermatozoides de ratón	41
7.3 La hiperpolarización del Vm de los espermatozoides de humano no induce la actividad del sNHE.....	44
7.4 La dependencia del voltaje del VSD del sNHE de humano podría ser diferente a la que presentan los espermatozoides de erizo de mar y ratón	45
8. CONCLUSIONES.....	46
9. PERSPECTIVAS.....	47
10. REFERENCIAS.....	48
11. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	57

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Funciones de la movilidad hiperactivada en la fecundación.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 2. Modelo del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE).</i>	<i>17</i>
<i>Figura 3. Relación funcional entre CatSper, el sNHE y la sACs en la hiperactivación espermática. ..</i>	<i>19</i>
<i>Figura 4. Modelo de la vía de regulación de CatSper en ratón y humano.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 5. Imágenes de la fluorescencia de los espermatozoides de ratones sNHE $^{+/+}$ y sNHE $^{-/-}$ después del estímulo de hiperpolarización del Vm.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 6. La hiperpolarización del Vm alcaliniza el pHi de los flagelos de los espermatozoides de ratón activando al sNHE.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 7. La alcalinización del pHi en los flagelos de espermatozoides sNHE $^{+/+}$ presenta diferentes cinéticas.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 8. El pHi basal alcalino afecta la capacidad de respuesta de los flagelos sNHE $^{+/+}$ ante el estímulo de hiperpolarización del Vm.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 9. Los espermatozoides de los ratones sNHE $^{-/-}$ no se alcalinizan por hiperpolarización independientemente del valor del pHi basal (< 7.5).</i>	<i>35</i>
<i>Figura 10. El ionóforo monensina induce la alcalinización del pHi de los espermatozoides de ratón y sNHE $^{+/+}$ y sNHE $^{-/-}$.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 11. La hiperpolarización del Vm no induce la alcalinización del pHi en espermatozoides de humano.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 12. Imágenes de fluorescencia SNARF-5F de espermatozoides de humano después de la adición de diferentes compuestos.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 13. Comparación de los 4 segmentos transmembranales del VSD del sNHE de erizo de mar, ratón y humano.</i>	<i>39</i>
<i>Figura Suplementaria 1. Respuestas individuales del pHi de los flagelos del sNHE $^{+/+}$ después del estímulo de hiperpolarización del Vm.</i>	<i>57</i>
<i>Figura Suplementaria 2. Alineamiento comparativo de los aminoácidos que componen a los segmentos del VSD de sNHE.</i>	<i>58</i>
<i>Figura Suplementaria 3. La hiperpolarización del Vm rescata la movilidad de espermatozoides sNHE $^{+/+}$.</i>	<i>59</i>
<i>Figura Suplementaria 4. Determinación del potencial de membrana (Vm) en población de los espermatozoides de ratones sNHE $^{+/+}$, sNHE $^{-/-}$ y humano. Evaluación.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura Suplementaria 5. La hiperpolarización del Vm alcaliniza los flagelos de los espermatozoides capacitados de ratones sNHE $^{+/+}$ a través de la actividad de sNHE.....</i>	<i>61</i>

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
sNHE	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺ específico de espermatozoide
NHE	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺
sNHE ^{+/+}	Ratón silvestre
sNHE ^{-/-}	Ratón nulo de sNHE
VSD	Dominio sensible a voltaje
CNBD	Dominio de unión a nucleótidos cíclicos
S4	Segmento transmembranal 4
V_m	Potencial de membrana
mV	Milivoltios
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
sAC	Adenilato ciclasa soluble
pH_i	pH intracelular
pH_c	pH citosólico
[Ca²⁺]	Concentración de calcio
K⁺	Ion de potasio
CatSper	Canal de calcio específico del espermatozoide
SLO3	Canal de potasio específico del espermatozoide
Hv1	Canal de protones dependiente del voltaje
SLC9A	Familia de transportadores de soluto, miembro A
SLC9B	Familia de transportadores de soluto, miembro B
SLC9C	Familia de transportadores de soluto, miembro C
SLCO6C1	Transportador de soluto 6C1, familia de transportadores de aniones orgánicos
TMEM249	Proteína transmembranal 249
SNARF-5F AM	Ácido 5-(y-6)-carboxílico, éster acetoximetílico
DISC-3(5)	Yoduro de 3,3'-Dipropiltiadicarbocianina
μM	Micromolar
Mm	Milimolar
s	Segundos
t	Tiempo

RESUMEN

El intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE) es una proteína indispensable para la fertilidad de los mamíferos. Sin embargo, el mecanismo que subyace a su regulación es poco conocido. Estudios en el espermatozoide de erizo de mar indican que la hiperpolarización del potencial de membrana (V_m) regula de forma positiva la actividad del sNHE. Por consiguiente, en este trabajo exploramos la actividad del sNHE en dos especies de mamíferos: humano y ratón, por medio de la obtención de imágenes fluorescentes que permitieron detectar cambios en el pH intracelular (pHi) con el colorante SNARF-5F. Nuestras observaciones muestran que, la hiperpolarización del potencial de membrana inducida por

el ionóforo de K^+ valinomicina, alcalinizan el pHi del flagelo de los espermatozoides de ratones silvestres, pero no el de las células de ratones nulos del sNHE (sNHE^{-/-}). Por otra parte, el incremento del pHi se inhibió cuando se utilizó un medio con altas concentraciones de K^+ (40 mM). Estos resultados apoyan la idea de que el sNHE de los espermatozoides de ratón es activado por hiperpolarización del potencial de membrana, de manera similar a lo reportado para los espermatozoides de erizo de mar. Además, observamos diferentes tipos de cinéticas derivadas de la alcalinización del pHi inducido por valinomicina, incluyendo algunas células que no respondieron al incremento de pHi (30% del total). Nuestro análisis cuantitativo de las determinaciones de pHi reveló que las células que no respondieron al estímulo tenían un pHi de reposo superior a 7.5, lo cual sugiere que la actividad del sNHE de ratón depende del pHi de reposo. Por otra parte, la valinomicina no indujo un aumento del pHi de los espermatozoides de humano, en las regiones de la cabeza y el flagelo, independientemente de su pHi en el estado de reposo. Nuestros hallazgos sugieren que la regulación de la actividad del sNHE es distinta entre las especies de mamíferos.

ABSTRACT

The sperm-specific Na^+/H^+ (sNHE) is essential for male fertility in mammals. Nevertheless, it is still unknown how mammalian sNHE is regulated. Evidence obtained from sea urchin sNHE indicates that hyperpolarization of plasma membrane potential (V_m), which is a hallmark of mammalian capacitation, positively regulates the sNHE. Therefore, we explored the activity of sNHE in mouse and human sperm by fluorescence imaging of intracellular pH (pHi) with a ratiometric dye, SNARF-5F. A valinomycin-induced V_m hyperpolarization elevated sperm flagellar pHi from WT mice but not in sNHE-null mice (sNHE^{-/-}). Moreover, this pHi increase was inhibited in a high K^+ (40 mM) medium. These results support the idea that mouse sNHE is activated by V_m hyperpolarization. Interestingly, we observed different types of kinetics derived from valinomycin-induced alkalization, including some (30%) without any pHi changes. Our quantitative pHi determinations revealed that unresponsive cells had a high resting pHi (>7.5), suggesting that the activity of mouse sNHE is regulated by the resting pHi. On the other hand, valinomycin did not increase the pHi of human sperm in the head or the flagellum, regardless of their resting pHi values. Our findings suggest that the regulatory mechanisms of mammalian sNHEs are distinct depending on the species.

1. INTRODUCCIÓN

La función principal del espermatozoide es fecundar al ovocito, sin embargo, los espermatozoides recién eyaculados son incapaces de cumplir con este propósito. Para que los espermatozoides de mamíferos sean capaces de fecundar es necesario que experimenten un proceso de maduración denominado capacitación, que ocurre en el tracto genital femenino (Austin *et al.*, 1951; Chang 1951). La capacitación involucra una serie de cambios bioquímicos, que incluyen: cambios en la permeabilidad del ión K^+ , la alcalinización del pH intracelular (pHi), la fosforilación de proteínas y el incremento del calcio intracelular (Visconti *et al.*, 1995; Zeng *et al.*, 1995; Zeng *et al.*, 1996; Muñoz-Garay *et al.*, 2001; Breitbart *et al.*, 2003; Chávez *et al.*, 2014). Algunas investigaciones indican que la hiperpolarización del V_m es uno de los eventos más importantes que ocurren durante la capacitación (Zeng *et al.*, 1995; Arnoult *et al.*, 1999; López-González *et al.*, 2014; Baro *et al.*, 2019; Molina *et al.*, 2020). En el caso de los espermatozoides de ratón, se sabe que la hiperpolarización del V_m es mediada por el canal de potasio específico del espermatozoide SLO3 (Navarro *et al.*, 2007; Santi *et al.*, 2010; Chávez *et al.*, 2013). Este evento es fundamental para producir un aumento en la concentración del Ca^{2+} intracelular mediante CatSper (Chávez *et al.*, 2014), un canal de calcio esencial que modula la movilidad de tipo hiperactivada en el espermatozoide (Navarro *et al.*, 2007; Santi *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011; Chávez *et al.*, 2014). La caracterización electrofisiológica de CatSper indica que su actividad es modulada por la despolarización del V_m y no así por la hiperpolarización del V_m (Kirichok *et al.*, 2006). Lo anterior, genera controversia respecto al papel que desempeña la hiperpolarización en la consecuente entrada de Ca^{2+} intracelular. Por otra parte, se sabe que CatSper también puede ser fuertemente activado por la alcalinización del pHi (Kirichok *et al.*, 2006). En este sentido, resulta importante dilucidar de qué manera la hiperpolarización del V_m y la alcalinización del pHi, se correlacionan con la activación de CatSper.

Por lo menos en el espermatozoide de ratón sNHE es considerado un buen candidato para la regulación del pHi. De hecho, su ausencia produce infertilidad masculina por defectos en la movilidad espermática (Wang *et al.*, 2003; Cavarocchi *et al.*, 2021). El intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide es miembro de una gran familia de acarreadores de soluto (SLC), codificados por el gen *Slc9c1*, el cual se expresa en la pieza principal del flagelo del espermatozoide (Wang *et al.*, 2003; Windler *et al.*, 2018). Comparado con otros miembros de la familia (*Slc9a* y *Slc9b*), sNHE (*Slc9c*) posee dos

dominios regulatorios: un dominio sensor a voltaje (VSD, voltage sensor domain, por sus siglas en inglés), localizado en el segmento 4 transmembranal y un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD, cyclic nucleotide-binding-domain, por sus siglas en inglés) localizado en la región carboxilo terminal de la proteína (Wang *et al.*, 2003; Quill *et al.*, 2006). En otras especies como el espermatozoide de erizo de mar, se ha demostrado que sNHE es activado por la hiperpolarización del potencial de membrana. Comprobándose que la presencia de algunos residuos de aminoácidos cargados positivamente en el segmento transmembranal 4 del VSD resultan esenciales para detectar cambios en el voltaje de la membrana. Adicionalmente, se ha corroborado que la concentración citoplasmática del AMPc también activa a sNHE a través del CNBD (Windler *et al.*, 2018). Sin embargo, el mecanismo de la activación del sNHE en los mamíferos, permanece desconocido hasta ahora, principalmente debido a la dificultad de la expresión heteróloga de sNHE (Nishigaki *et al.*, 2014; Windler *et al.*, 2018; Romero & Nishigaki 2019).

En el espermatozoide de ratón se demostró que la hiperpolarización del V_m evocada con el ionóforo de K^+ valinomicina, genera un incremento del pHi (Chávez *et al.*, 2014). Una hipótesis sugiere que este cambio del pHi podría ser mediado por la actividad del sNHE, de manera similar a lo descrito para los espermatozoides de erizo de mar. En contraste, un reporte realizado en espermatozoides de humano en suspensión marcados con el mismo indicador fluorescente (BCECF) mostró que la hiperpolarización del V_m no produce cambios del pHi (Linares-Hernández *et al.*, 1998; Fraire-Zamora & González-Martínez 2004). Sin embargo, un trabajo reciente en espermatozoides de humano establece que el sNHE es esencial para la fertilidad de esta especie (Cavarocchi *et al.*, 2021). Por lo tanto, es crucial estudiar a mayor detalle la activación y función del sNHE en los mamíferos. En esta investigación empleamos un sistema de imágenes fluorescentes de doble emisión con el colorante SNARF-5F, una metodología que recientemente establecimos en nuestro laboratorio (Chávez *et al.*, 2020) y que nos permite monitorear cuantitativamente cambios del pHi en los espermatozoides de ratón y humano.

2. ANTECEDENTES

2.1 Regulación de la movilidad del espermatozoide

La movilidad es una función fundamental del espermatozoide (Darszon *et al.*, 2020), importante para determinar el éxito reproductivo entre las distintas especies de mamíferos. Durante la maduración espermática, el espermatozoide experimenta una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que lo habilitan para fecundar al ovocito, los cuales colectivamente reciben el nombre de capacitación. Estos cambios incluyen a la reacción acrosomal y a la hiperactivación espermática (Suárez, 2008).

En términos de movilidad, el flagelo del espermatozoide es el apéndice encargado de generar este movimiento, el cual se caracteriza por presentarse en forma de un latiguelo coordinado (Gadêlha *et al.*, 2020). El mecanismo del batido flagelar, se produce por el deslizamiento de las proteínas dineínas ATPasas, entre los dobletes de microtúbulos externos que componen al axonema (9 dobletes de microtúbulos que rodean a un par central) (Okagaki & Kamiya, 1986; Yagui *et al.*, 2005; Darszon *et al.*, 2020).

Usualmente los espermatozoides recuperados del oviducto presentan un batido flagelar vigoroso conocido como movilidad hiperactivada, la cual se caracteriza por ser asimétrica de gran amplitud y de baja frecuencia (Suárez, 2008). La movilidad hiperactivada cumple cuatro grandes funciones para la fecundación 1) mantener la movilidad progresiva en un medio viscoso 2) promover el desprendimiento de los espermatozoides de los reservorios en el oviducto 3) permitir el nado en contra del flujo uterino (reotaxis) y 4) penetrar la zona pelúcida del ovocito (Figura 1) (Nishigaki *et al.*, 2014).

Diversas investigaciones establecen que este tipo de movilidad depende de las concentraciones de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (Brokaw 1987; Suárez *et al.*, 2003; Darszon *et al.* 2011; Nishigaki *et al.*, 2014; Darszon *et al.*, 2020). Es por este motivo que durante la capacitación el espermatozoide experimenta elevaciones del $[Ca^{2+}]_i$, superiores a los 400 nM (Suárez *et al.*, 2003; Darszon *et al.*, 2020).

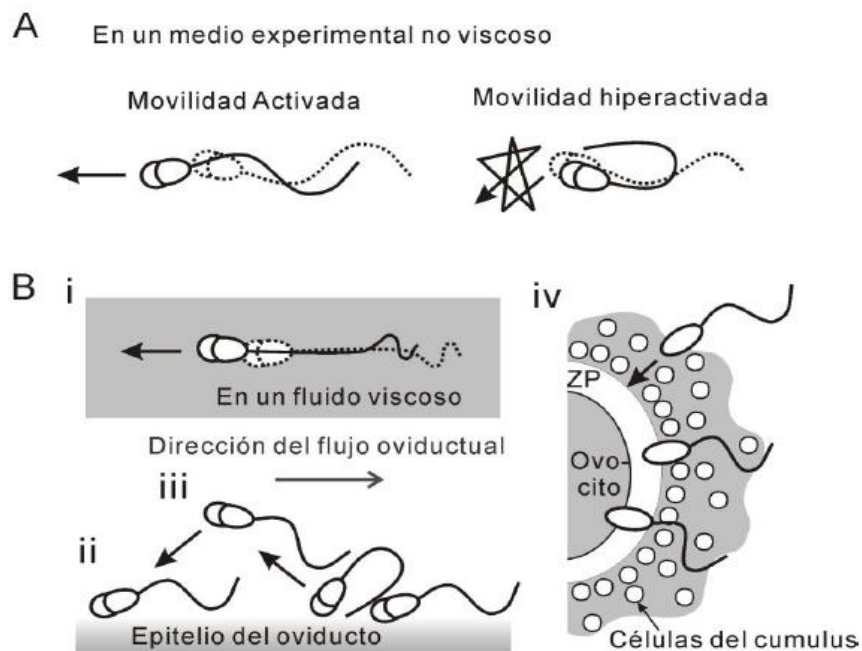


Figura 1. Funciones de la movilidad hiperactivada en la fecundación. A) en medio experimental normal (baja viscosidad), los espermatozoides recién eyaculados (movilidad activada) presentan un movimiento flagelar simétrico, de alta frecuencia y de poca amplitud. En contraste con la movilidad hiperactivada en la cual se observa un batido flagelar asimétrico, de baja frecuencia, pero de gran amplitud. b) Funciones de la hiperactivación. i) dirección y fuerza impulsora generada en un medio viscoso, ii) desprendimiento de los reservorios en el oviducto, iii) nado en contra del flujo del fluido (reotaxis) iv) penetración a través de las células de *cumulus* del ovocito. Modificada de Nishigaki *et al.*, 2014.

2.2 El canal CatSper y la movilidad del espermatozoide

Una de las principales entidades moleculares que regula el movimiento del batido flagelar es el canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide, CatSper (por sus siglas en inglés) (Quill *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2001), el cual se ha descrito como un canal complejo estructuralmente. El canal CatSper está conformado por cuatro subunidades proteicas que conforman al poro (CatSper 1-4) y otras 6 proteínas asociadas (CatSper β , CatSper γ , CatSper δ , CatSper ϵ , CatSper ζ y EFCAB9) (Qi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2021; Clapham & Raymond, 2021). Resultados recientes de crio-microscopía electrónica sugieren la presencia de nuevos componentes del canal iónico en ratón: el transportador de aniones, SLCO6C1 y la proteína transmembranal TMEM249; por lo cual se ha denominado “CatSpermasoma” (Linn *et al.*, 2021). La activación de CatSper responde a la alcalinización del pH intracelular (pHi) y probablemente a otros factores presentes en el tracto reproductivo femenino. Por otra parte, se ha descrito que CatSper es un canal dependiente

del voltaje, que responde a la despolarización del potencial de membrana. Sin embargo, esta vía de activación es descrita como débil (Kirichok *et al.*, 2006; Clapham & Raymond, 2021).

En el 2001, dos grupos independientes describieron que CatSper es un canal esencial para la regulación de la hiperactivación espermática (Quill *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2001; Darszon *et al.*, 2020), de hecho, su ausencia causa infertilidad, por defectos en la movilidad de los espermatozoides (Ren *et al.*, 2001). A pesar de la importancia que desempeña CatSper en la fisiología del espermatozoide, aun no se ha podido completar la caracterización de su funcionamiento, debido principalmente a la dificultad de su expresión heteróloga (Darszon *et al.*, 2020). Por consiguiente, muchos trabajos se han enfocado a dilucidar las vías de regulación que podrían estar implicadas en el incremento del calcio intracelular del espermatozoide.

En el 2014, Chávez y colaboradores describieron que la hiperpolarización del Vm de los espermatozoides no capacitados es crucial para producir el incremento en las concentraciones del calcio intracelular. De hecho, la hiperpolarización de Vm se considera vital para los espermatozoides de esta especie (Zeng *et al.*, 1995; Hernández-González *et al.*, 2006; De La Vega-Beltran *et al.*, 2012; Baro *et al.*, 2019), debido a que los espermatozoides que no hiperpolarizan su Vm no presentan la reacción acrosomal (Schreiber *et al.*, 1998; Santi *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; Chávez *et al.*, 2014; Baro *et al.*, 2019). El mecanismo que produce la hiperpolarización del Vm involucra la apertura de canales de potasio específicos del espermatozoide, SLO3 (Santi *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; Chávez *et al.*, 2014; Baro *et al.*, 2019), los cuales se activan por despolarización del potencial de membrana y por la alcalinización del pHi (Schreiber *et al.*, 1998; Chávez *et al.*, 2014).

A pesar de la interconexión que existe entre el fenómeno de hiperpolarización del potencial de membrana y el incremento en las concentraciones de calcio intracelular, aún no se tiene claro el mecanismo que vincula la función de los canales SLO3 y CatSper. Sin embargo, se ha propuesto la participación del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE), como un intermediario que podría asociar la función de ambos canales iónicos (Chávez *et al.*, 2014). Recientemente se describió que el sNHE de erizo de mar responde a la hiperpolarización del potencial membrana, condición que repercute en la alcalinización del pHi de los espermatozoides de esta especie (Windler *et al.*, 2018). Interesantemente este aumento del pHi podría ser importante para favorecer la vía de activación de CatSper.

2.3 El intercambiador Na⁺/H⁺ específico del espermatozoide (sNHE) como modulador de la actividad de CatSper

Se ha propuesto que el pHi cumple un rol importante en la movilidad de los espermatozoides de vertebrados e invertebrados. En particular los intercambiadores Na⁺/H⁺ (NHE's, por sus siglas en inglés) regulan el pHi de los espermatozoides de diversas especies (Schackmann *et al.*, 1986; García *et al.*, 1999; Woo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007). Generalmente, los NHE's son proteínas integrales de membrana que catalizan el intercambio Na⁺/H⁺ a través de las bicapas lipídicas (Chen *et al.*, 2016). La familia de los NHE's está codificada por los genes SLC9 que componen diferentes isoformas agrupadas en 3 diferentes subfamilias: (SLC9A, SLC9B y SLC9C), muchas de las cuales se distribuyen de manera ubicua en diversos organismos (Fuster *et al.*, 2013; Yeste *et al.*, 2021). En el espermatozoide se expresan varias isoformas de NHEs; NHE1, NHE5 y NHE8 (SLC9A1, 5, 8) y las isoformas NHA1, NHA2 (SLC9AB1-2) y sNHE (SLC9C1), que han sido identificadas en la pieza principal del flagelo (Wang *et al.*, 2013; Fuster *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016; Oberheide *et al.*, 2017; Yeste *et al.*, 2021).

El sNHE es una proteína de paso múltiple, con 14 segmentos transmembranales predichos (Figura 2). Los primeros 10 segmentos transmembranales del sNHE están bastante conservados con respecto a los intercambiadores Na⁺/H⁺ de procariotas y eucariotas (Brett *et al.*, 2005; Quill *et al.*, 2006). Estos segmentos, median la entrada de Na⁺ por la salida de H⁺. A diferencia de otros NHE's, el sNHE, tiene 4 segmentos transmembranales extra (segmentos 11-14), que componen al dominio sensor a voltaje (VSD, por sus siglas en inglés). Dichos segmentos comúnmente han sido descritos en los canales iónicos dependientes de voltaje, como CatSper. Como una característica importante del VSD, el cuarto segmento transmembranal (S4, que corresponde al S14 del sNHE de ratón) conserva de 3-7 aminoácidos con carga positiva (R o K) por cada tres aminoácidos hidrofóbicos que conforman la alfa hélice que cruza la membrana plasmática. En la región carboxilo terminal (región citoplasmática del sNHE), está presente un dominio no conservado de aproximadamente 700 residuos de aminoácidos de longitud que contiene un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD, por sus siglas en inglés) (Quill *et al.*,

2006). El sNHE se localiza en la pieza principal del espermatozoide, de manera similar a CatSper (Wang *et al.*, 2003).

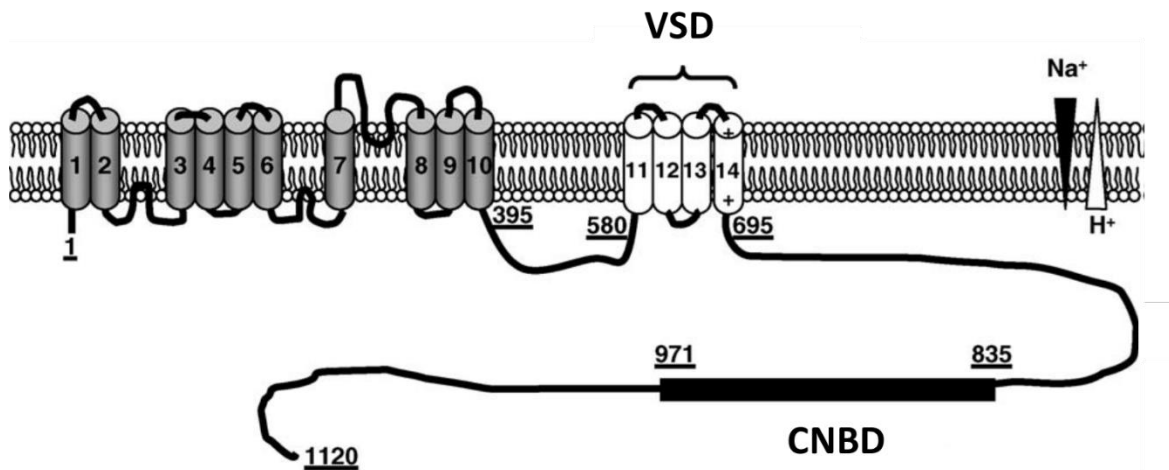


Figura 2. Modelo del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE). Se observa la región amino terminal con 10 hélices transmembranales sombreadas en gris, homólogas a la que presentan la mayoría de los NHEs. La hipotética asociación de loops entre las hélices 2 y 3, 6 y 7 y 8; está basada en las secuencias de los intercambiadores NHE1 y NHE3. Las 4 hélices transmembranales con aparente homología al dominio putativo sensor a voltaje (VSD) presente en canales iónicos regulados por voltaje. Los signos + en el segmento 4 representan las cargas positivas en la hélice dependiente de voltaje. En la región carboxilo terminal existe un motivo putativo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). Los números subrayados indican la posición de aminoácidos de acuerdo con la secuencia primaria del sNHE de ratón. Modificado de Quill *et al.*, 2006.

En 1984, Lee reportó que el espermatozoide de erizo de mar posee un NHE atípico activado por cambios de potencial de membrana. De hecho, muy recientemente Windler y colaboradores demostraron que el sNHE de erizo de mar expresado en células CHO responde al estímulo de hiperpolarización del V_m . Interesantemente, la función del VSD del sNHE de esta especie depende de la composición de los aminoácidos que conforman al segmento 4, debido a que la sustitución del aminoácido arginina (R) por glutamina (Q) resulta en un corrimiento del voltaje medio ($V_{1/2}$) de activación de la corriente de compuerta hacia voltajes de membrana más negativos (de -94.7 ± 2.9 a -117.9 ± 7.1 mV). Por otra parte, el $V_{1/2}$ de activación de la corriente de compuerta se hace más positivo (-74.4 ± 6.4 mV), en presencia de 1 mM de AMPc, comparado con el $V_{1/2}$ de activación en ausencia de AMPc (-94.7 ± 2.9) (Windler *et al.*, 2018). Esto indica que el CNBD del sNHE, desempeña un rol importante en la activación del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide.

En los mamíferos la expresión heteróloga del sNHE no ha sido del todo exitosa, por lo que no se ha realizado la caracterización biofísica fina como el caso del sNHE del erizo de mar. Sin embargo, el genotipo nulo en ratón presume que el sNHE es fundamental para

la fertilidad de esta especie, ya que los espermatozoides que carecen de dicho intercambiador presentan defectos en la movilidad y en los niveles de AMPc (Wang *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2007). El incremento del pHi con cloruro de amonio (NH₄Cl) particularmente recupera la movilidad de los espermatozoides sNHE^{-/-}. Interesantemente, la adición de análogos permeables de AMPc puede recuperar eficientemente la movilidad de los espermatozoides afectados por la ausencia del sNHE (Wang *et al.*, 2003).

La adenilato ciclasa soluble (sAC por sus siglas en ingles), es una enzima que sintetiza AMPc, importante en el proceso de capacitación del espermatozoide. En 2007, se demostró claramente que la expresión del sNHE es fundamental para que la sAC se exprese; debido a que los espermatozoides sNHE^{-/-} expresan solamente una isoforma trunca de la sAC (Wang *et al.*, 2007).

Por otro lado, en espermatozoide de erizo de mar se demostró tanto mediante experimentos de quimiotaxis como con registros electrofisiológicos usando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana *patch clamp*, que la activación de CatSper es regulada por la alcalinización del pHi (Seifert *et al.*, 2014; Loyo-Celis *et al.* 2021). En este sentido, recientemente se comprobó que el sNHE contribuye fuertemente al incremento del pHi durante el proceso de quimiotaxis del espermatozoide de esta especie por medio de un análisis de expresión de sNHE en células CHO (Windler *et al.*, 2018). Esta evidencia sugiere que en el espermatozoide de erizo de mar hay un acoplamiento funcional entre CatSper y el sNHE.

El acoplamiento funcional entre el sNHE y la sAC en mamíferos y entre el sNHE y CatSper en erizo de mar sugieren una relación estrecha entre las tres proteínas del espermatozoide. Por otro lado, a pesar de que CatSper es esencial en la fisiología de los espermatozoides de mamíferos, existen varios grupos de animales que no conservan CatSper en su genoma (Cai & Clapham, 2008). Romero y Nishigaki realizaron un análisis de genética comparativa para describir la correlación entre la pérdida y la conservación de las tres proteínas, a partir del cual describieron un patrón de co-evolución entre ellas en Metazoarios (Figura 3A) (Darszon *et al.*, 2020; Romero and Nishigaki 2019). El mismo análisis sugiere que el sNHE (con el sensor de voltaje) se encuentra solamente en Metazoarios, aunque CatSper y la sAC están en otros organismos fuera de los Metazoarios. El patrón de co-evolución del sNHE, la sAC y CatSper sugiere que son proteínas prototípicas que regulan el batido flagelar de los espermatozoides de metazoarios (Figura 3B).

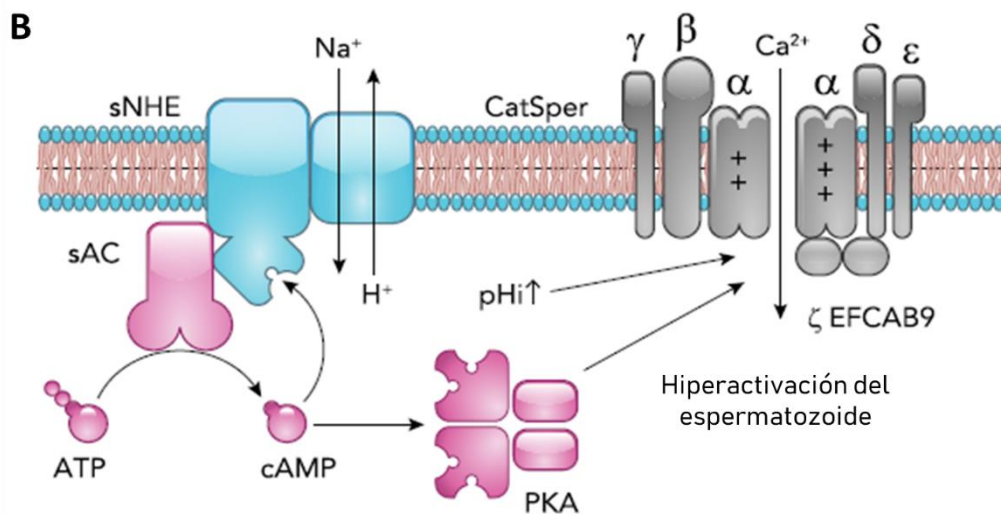
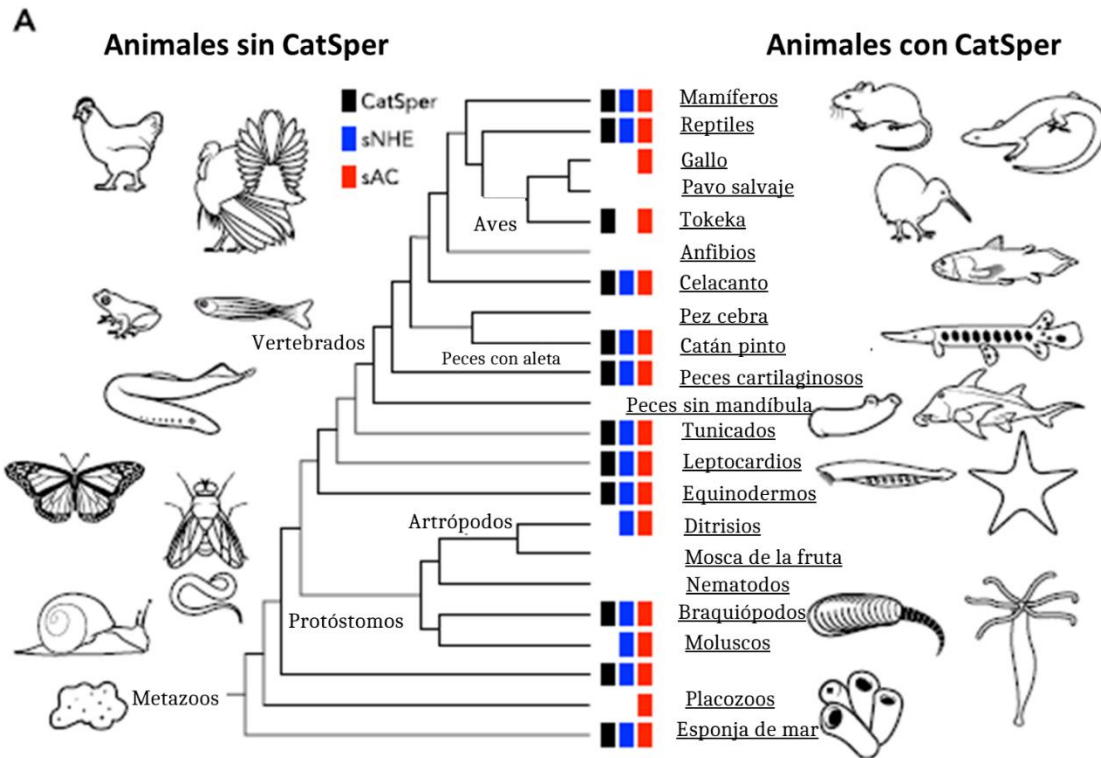


Figura 3. Relación funcional entre CatSper, el sNHE y la sACs en la hiperactivación espermática. (A) distribución de los genes que codifican para CatSper, el sNHE y la sAC entre diferentes grupos taxonómicos de Metazoarios. (B) Modelo propuesto que involucra a los elementos de regulación de CatSper en metazoos. En donde la sACs produce AMPc, lo cual activa a la PKA y al sNHE. El intercambiador específico del espermatozoide genera la alcalinización del pHi del espermatozoide que en conjunto con la actividad de la PKA, promueve la actividad de CatSper para el incremento de la [Ca²⁺]_i, resultando en la hiperactivación del espermatozoide. Modificada de Darszon *et al.*, 2020.

Hasta ahora, las investigaciones indican que la actividad de CatSper es regulada por el potencial de membrana y por alcalinización del pHi, siendo este último el que adquiere mayor relevancia sobre su modulación (Kirichock., 2006). Sin embargo, la activación polimodal de CatSper implica otras vías de señalización que dependen de la fosforilación de proteínas por PKA (Visconti *et al.*, 1995; Orta *et al.*, 2018). Por tal motivo es probable que la presencia de sNHE en el ratón implique dos roles importantes en la activación de CatSper: 1) que depende de la alcalinización del pHi y 2) la que depende del metabolismo del AMPc (Figura 3B).

2.4 La regulación del pHi en los espermatozoides de ratón y humano

La regulación de la concentración interna de H⁺ es fundamental para el control de muchas reacciones bioquímicas y funciones del espermatozoide. Por lo tanto, el equilibrio del pHi y pH extracelular (pHe), requiere de mecanismos dinámicos en términos de producción, eliminación, transporte y amortiguación de la concentración de H⁺ (Nishigaki *et al.*, 2014). En el espermatozoide este proceso es sumamente complejo e involucra gradientes de pH que transcurren desde que el espermatozoide se almacena en el testículo y hasta que culmina su paso por el tracto reproductor femenino (Mishra *et al.*, 2018). En principio, los espermatozoides que entran en contacto con el fluido seminal incrementan su pHi, condición que favorece el inicio del batido flagelar (Chávez *et al.*, 2019). Posteriormente durante su tránsito por el tracto reproductivo femenino los espermatozoides se exponen a un ambiente alcalino y al HCO₃⁻ (Nishigaki *et al.*, 2014). Por consiguiente, los transportadores de HCO₃⁻ y H⁺ son considerados clave en el proceso de capacitación e hiperactivación del espermatozoide (Chávez *et al.*, 2014). Varios de estos transportadores han sido descritos en los espermatozoides de mamíferos incluyendo a los intercambiadores Na⁺/H⁺ (Garcia y Meizel, 1999; Wang *et al.*, 2003; Chávez *et al.*, 2014), los cotransportadores Na⁺/HCO₃⁻ (Zeng *et al.*, 1996), que utilizan el gradiente de Na⁺ para producir la alcalinización del pHi (Demarco *et al.*, 2003) y el intercambiador Cl⁻/HCO₃⁻ (Chávez *et al.*, 2012).

Por otra parte, se han descrito otros mecanismos para la salida de H⁺ que influyen notablemente en el control del pHi, entre los cuales podemos mencionar al canal de protones dependiente de voltaje Hv1 (HVCN1), por sus siglas en inglés y al sNHE, quienes aparentemente desempeñan funciones distintas en la regulación del pHi entre las especies de mamíferos (Figura 4).

En el espermatozoide de humano se ha establecido que la regulación del pH_i se rige principalmente a través del canal Hv1, debido a que los espermatozoides de humano presentan corrientes importantes de H^+ (Lishko *et al.*, 2010). De hecho, la actividad de Hv1 se incrementa durante el proceso de capacitación, principalmente a nivel de la pieza principal del flagelo del espermatozoide (Matamoros y Treviño, 2019). Curiosamente, en los espermatozoides de ratón, no se observan corrientes de H^+ (Lishko *et al.*, 2010).

A pesar de que la evidencia sugiere que el sNHE de humano no funge un rol importante en la regulación del pH_i , recientemente los resultados de un análisis de pacientes infértiles mostraron que las mutaciones en el gen *SLC9C1* de humano repercuten en la disminución de la movilidad de los espermatozoides de esta especie (Cavarochi *et al.*, 2019). Este nuevo reporte sugiere que la función del sNHE en el espermatozoide de humano es indispensable para regular los procesos de movilidad importantes como el fenómeno de hiperactivación espermática.

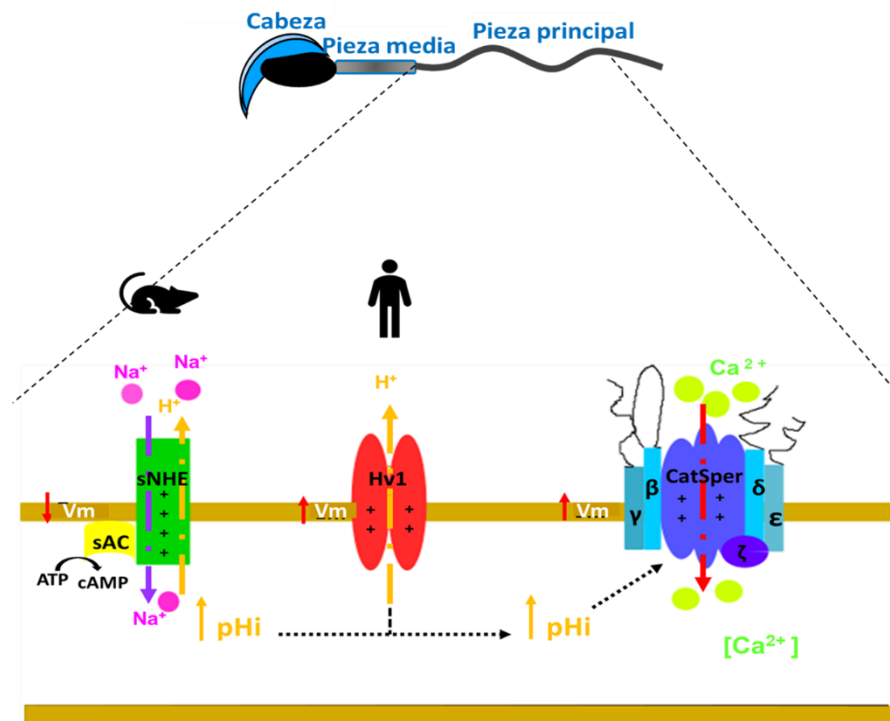


Figura 4. Modelo de la vía de regulación de CatSper en ratón y humano. En el espermatozoide de ratón se observa la participación de sNHE como entidad que produce el fenómeno de alcalinización del pH_i , importante para la activación de CatSper. Por otra parte, se observa que en caso del espermatozoide de humano la alcalinización del pH_i involucra la participación del canal Hv1, la cual activa positivamente la función de CatSper.

3. HIPOTESIS

La determinación del pHi absoluto regulado por cambios del potencial de membrana en los espermatozoides de ratón y humano podrá permitir describir el mecanismo de activación del sNHE para ambas especies.

4. OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto de la hiperpolarización del potencial de membrana sobre la regulación de la actividad del sNHE de ratón y humano evaluando el pH intracelular.

4.1 Objetivos particulares

1. Determinar si los espermatozoides de ratón (silvestres y nulos del sNHE) incrementan su pHi ante el estímulo de hiperpolarización del potencial de membrana.
2. Analizar si los espermatozoides de humano incrementan su pHi ante el estímulo de hiperpolarización del potencial de membrana.
3. Establecer si la alcalinización del pHi ocurre de manera diferencial en la cabeza y en el flagelo (pieza media) de los espermatozoides de ratón y humano.
4. Clasificar los diferentes tipos de alcalinización del pHi de acuerdo a sus características cinéticas.
5. Examinar si la regulación del pHi a través de la actividad del sNHE depende del valor de pHi absoluto en los espermatozoides de ambas especies.
6. Analizar las secuencias de aminoácidos que componen al segmento 4 del VSD del sNHE, para describir particularidades asociadas a la dependencia de voltaje.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Los reactivos químicos se obtuvieron de las siguientes fuentes. El colorante SNARF-5F AM (ácido 5-(y-6)-carboxílico, éster acetoximetílico), DiSC-3(5) (yoduro de 3,3'-Dipropiltiadicarbocianina y el ácido plurónico F-127 fueron suministrados por ThermoFisher. La albumina de suero bovino (BSA) fue suministrada por US Biological. El desacoplador de potencial de membrana CCCP (Cianocarbonil-m-cloro-fenilhidrazona), la valinomicina, la monensina A, el dimetil sulfóxido (DMSO), la concanavalina A y todos los demás reactivos fueron provistos por Sigma-Aldrich. El cloruro de amonio fue suministrado por Merck.

5.2 Genotipificación de ratones nulos de sNHE

Todos los procedimientos con ratones fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los ratones (C57BL/6J) de tipo silvestre (sNHE ^{+/+}) y nulos del sNHE (sNHE ^{-/-}) generados por el grupo del Dr. Garbers (Wang *et al.*, 2003), fueron suministrados por el Laboratorio de Jackson (ME, EU). Los genotipos se determinaron según el protocolo de PCR propuesto por el laboratorio de Jackson con algunas modificaciones. Los cebadores utilizados en la determinación del genotipo por PCR fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del IBt de la UNAM. El cebador sentido fue 5'-GAA GGG CTC AGG GAT GTG TA-3' para ambos genotipos (silvestre y mutante) y como cebadores anti-sentido se usaron 5'-GGC AAC ATT AAA GAT AAT CAC TGG-3' (para silvestre) y 5'-GCC AGA GGC CAC TTG TGT AG-3' (para mutante). Para amplificar los fragmentos de ADN (298 pb para el genotipo silvestre y 353 pb para el genotipo mutante) se utilizó la enzima Taq ADN polimerasa (Amplificasa) (BioTecMol, México).

5.3 Muestra biológica

5.3.1 Espermatozoides de ratón

Los espermatozoides se obtuvieron por disección de las caudas de epidídimos de ratones sNHE ^{+/+} y ratones sNHE ^{-/-} de 3 a 4 meses de edad. Una vez aislados los epidídimos, se realizaron pequeños cortes en el tejido para realizar la técnica de nado de espermatozoides hacia afuera (*swim out*). Los epidídimos se colocaron en tubos cónicos con 1 ml de medio

Toyoda Yokoyama Hoshi (TYH) no capacitante compuesto por: NaCl 119 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, glucosa 5.56 mM, CaCl₂ 1.71 mM, piruvato de sodio 0.51 mM, Hepes 20 mM. El medio capacitante fue enriquecido con 15 mM de HCO₃⁻ y 5 mg/ml de BSA. Ambos medios fueron ajustados a un pH de 7.4 con NaOH. Los espermatozoides capacitados y no capacitados se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Finalizando el periodo de incubación se seleccionó la fracción superior del tubo (500 µl). Los espermatozoides capacitados continuaron por 30 minutos más el periodo de incubación a 37°C, para cumplir con el tiempo de capacitación (40 minutos). Una vez finalizado el tiempo de incubación para cada condición (capacitante y no capacitante), se contabilizó el número de espermatozoides con una cámara de Makler (Irvine Scientific, USA), ajustando la concentración a 10 x 10⁶ células/ml.

Para los tratamientos experimentales se utilizaron dos medios con diferente concentración de KCl: medio TYH con 4.7 mM de KCl (nombrado K4.7) y medio TYH con 40 mM de KCl (nombrado K40). El medio K40 requirió un ajuste al contenido de 40 mM de KCl por la reducción equivalente de la concentración de NaCl, el pH se ajustó a 7.4 con NaOH.

5.3.2 Espermatozoides de humano

Los espermatozoides se obtuvieron del eyaculado de donadores sanos (quienes firmaron previamente un formato de consentimiento), siguiendo los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2022), para el uso de muestras espermáticas. El protocolo para obtención de las muestras fue aprobado por el comité de bioética del IBT-UNAM. El semen se incubó durante 30 minutos a 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa para permitir su licuefacción. Una vez finalizado este periodo se seleccionó la fracción superior del tubo (300 µl) mediante la técnica de nado hacia arriba (*swim up*) por un periodo de 1 hora a 37°C, en el medio *Human Tubal Fluid* (HTF), compuesto por (en mM): NaCl 90.7, KCl 5, KH₂PO₄ 0.31, MgSO₄ 1.2, glucosa 2.78, CaCl₂ 1.6, piruvato de sodio 3.38, lactato de sodio 60, Hepes 23.8, con un pH de 7.4 ajustado con NaOH.

5.4 Imágenes de pH intracelular

Los espermatozoides móviles de humano y ratón (10×10^6 células/ml) se incubaron con el colorante de doble emisión ($\lambda_{emi} = 575/640$ nm) sensible a pH SNARF 5F-AM (nombrado SNARF 5F), a una concentración de 20 μ M, adicionado con plurónico F-127 al 0.05% en medio HTF o TYH, según sea el caso, por 40 minutos a una temperatura de 37°C en oscuridad. Los espermatozoides recuperados fueron pegados a cubreobjetos tratados con Concanavalina (1 mg/ml) por dos minutos, para propiciar el pegado de la cabeza y el flagelo del espermatozoide. Los espermatozoides que no se unieron al cubreobjetos se retiraron lavando con 200 μ l de medio HTF o TYH según fuera el caso.

Los cambios de pHi fueron evaluados empleando 1 μ M del ionóforo de K⁺ valinomicina para inducir la hiperpolarización del potencial de membrana. Adicionalmente empleamos monensina A, un ionóforo que permite el intercambio Na⁺/H⁺, con la finalidad de probar que este mecanismo permanece funcional en las células espermáticas analizadas. Durante los ensayos empleamos 20 μ M cloruro de amonio (NH₄Cl) para inducir la alcalinización del pHi de manera independiente al control positivo por el gradiente de Na⁺. Todos los compuestos fueron añadidos gentilmente por goteo con una micropipeta. En todas las figuras definimos el tiempo de adición de valinomicina o monensina como tiempo 0 (0 segundos).

Las imágenes de célula única se adquirieron usando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71 acoplado a un LED como fuente de iluminación, equipado con un objetivo de inmersión PlanApo N60x/1.42 (Chávez *et al.*, 2020). Los espermatozoides cargados con el colorante SNARF-5F fueron excitados con un LED verde (530 nm) con un filtro ET 530/30X, acoplado a un controlador de LED (optoLED, Cairn Research, Kent, UK). Para adquirir la doble emisión fluorescente del colorante SNARF-5F (575/640 nm) usamos un divisor de imagen OptoSplit II (Cairn Research), que nos permitió obtener las dos longitudes de onda con un filtro de banda ancha ET 575/50 M para colectar la emisión del canal de 575 nm (referido como canal 1) y otro filtro de banda ancha 640/20 M para colectar la emisión del canal de 640 nm (nombrado canal 2), combinando con un espejo dicróico DC 620lp (Chroma Technology, USA).

Las células fueron excitadas con pulsos de iluminación durante 10 ms (milisegundos) y las imágenes fueron capturadas cada 50 ms (2 fps) por al menos 10 minutos. La secuencia de imágenes fluorescentes se obtuvo con el software Andor iQ versión 2.9.1 (Oxford Instruments, Bristol, UK), y las imágenes digitales se almacenaron en formato TIFF.

5.5 Análisis de imágenes

Las imágenes fueron procesadas y analizadas con el software Fiji de ImageJ (versión 1.53c, NIH, USA). Las regiones de interés fueron dibujadas de forma manual para cada región del espermatozoide cabeza y flagelo (pieza media), seleccionando la misma área para los canales 1 y 2. Adicionalmente se creó una región de interés para el fondo de la imagen. Los valores de fluorescencia de las células y del fondo fueron exportados a Microsoft Excel (Microsoft, USA), en donde, la intensidad de fluorescencia media se obtuvo por la substracción del valor del fondo de la imagen. Para transformar los datos de fluorescencia a valores de pHi absolutos, usamos las siguientes ecuaciones de pHi: $pH = (RF640/F575 + 7.52) / 1.32$ para los espermatozoides de ratón y $(RF640/F575 + 6.96) / 1.22$ para los espermatozoides de humano.

En donde, RF640/RF575, representan la división de los valores de fluorescencia del canal 2 sobre el valor de la fluorescencia del canal 1 (RF640/F575). Estas ecuaciones se obtuvieron por la calibración del colorante para ambas especies, con un medio compuesto por 10 μ M de nigericina (ionóforo del intercambio K^+/H^+) y alto en K^+ (120 mM) a distintos valores de pH (Chávez *et al.*, 2019). Los valores de RF640/F575 tienen una correlación lineal con distintos valores de pH que van de 6.0 a 8.0 ($R^2 = 0.98$ para ratón y $R^2 = 0.99$ para humano).

Estas ecuaciones fueron previamente descritas por Chávez y colaboradores (2020), a través de la calibración del colorante SNARF-5F en espermatozoides de humano y ratón. El protocolo de Chávez y colaboradores se basó en el uso de un ionóforo del intercambio K^+/H^+ (nigericina) a una concentración de 10 μ M y un medio alto en K^+ (120 mM) a distintos valores del pH. Considerando que el desarrollo de este proyecto de investigación se realizó con el mismo equipo de microscopia y la misma configuración utilizada por Chávez y colaboradores (2020), (excitación LED, filtros de emisión, espejo dicróico, objetivos y microscopio), en este trabajo aplicamos las ecuaciones descritas para la obtención de los valores absolutos de pHi.

5.6 Valores del pHi basal y el pHi pico

El pHi basal de cada región, se determinó como un promedio de los valores de pH durante 30 segundos (60 puntos) antes de la adición de valinomicina o monensina A (de -35 s a -5 segundos en cada experimento). El valor máximo (pico del pHi) fue determinado considerando 3 casos: (1) un promedio de los valores de pHi por al menos 10 s (± 5 s) alrededor del valor máximo (pico aparente) después de la adición de valinomicina y antes de los 240 segundos. (2) un promedio de los valores del pH que va de los 205 a 235 segundos después de la adición de valinomicina o monensina A (justo antes de la adición de NH_4Cl), cuando el pHi aumento gradualmente sin mostrar un pico aparente, antes de los 240 segundos (pico convencional) y (3) un promedio de los valores de pH de los 205 a los 235 segundos después de la adición de valinomicina o monensina A (justo antes de la adición de NH_4Cl) cuando el pHi no excedió el valor de pHi basal (pico opuesto). En muchos casos los valores de los picos del pHi del caso 3 (pico opuesto) exhibieron valores más bajos que sus valores de pHi basal.

La cuantificación del incremento del pHi inducido por valinomicina ΔpHi , fue calculado por sustracción del pHi basal del valor del pico del pHi ($\text{pHi}(\text{pico}) - \text{pHi}(\text{basal})$). Considerando como un ΔpHi positivo (la inducción del incremento de pHi por valinomicina), cuando el valor del ΔpHi fue más grande que una desviación estándar (ruido) del pHi basal. Por otra parte, consideramos a las células como no responsivas al tratamiento de valinomicina cuando su ΔpHi no fue superior al valor de 0 y cuando no mostraron un ΔpHi positivo (valores de ΔpHi negativos).

5.7 Clasificación del incremento de pHi inducido por valinomicina

Definimos 3 categorías de respuesta positiva al tratamiento de valinomicina (ΔpHi positivo), a partir de los siguientes criterios: Grupo 1, aquellos valores de pHi que a los 60 segundos (después de la adición de valinomicina) fueron superiores a la mitad del valor máximo ($1/2$ máximo $\Delta\text{pHi} + \text{pHi}$ basal) y Grupo 2, aquellos valores que fueron inferiores que la mitad del valor máximo. El Grupo 1 se dividió en dos subgrupos: Grupo 1A, células que tuvieron valores de pHi superiores a la mitad del valor máximo de pHi (240 segundos después de la adición de valinomicina, justo antes de la adición de NH_4Cl) y Grupo 1B aquellos valores de pHi que fueron inferiores a la mitad del valor máximo de pHi.

A pesar de la variedad de las respuestas celulares, cada grupo fue catalogado con base en las siguientes características: Grupo 1A “sostenido”, Grupo 1B “transitorio” y Grupo 2 “gradual”. En todos los casos corroboramos la normalidad de los datos aplicando la prueba estadística de Shapiro-Wilk. El análisis de las diferencias estadísticas se corroboró con las pruebas estadísticas de Kruskal-Wallis y Wilcoxon (estadística no paramétrica). Algunas pruebas estadísticas fueron seguidas de un análisis *post hoc* con la prueba de Dunn (los detalles son descritos en cada pie de figura). Los valores de $P < 0.05$ son considerados como estadísticamente significativos. El análisis estadístico se realizó con el software de R Studio (<https://www.R-project.org/>), adicionalmente utilizamos la biblioteca de ggplot2 (Wickham, 2009) para graficar los datos. La versión final de las figuras se preparó usando el software de Inkscape 0.92 (Inkscape.org 2007).

5.8 Análisis de la movilidad de los espermatozoides de ratón

Se evaluó el rescate de la movilidad de los espermatozoides de ratones sNHE ^{+/+}, bajo la presencia de valinomicina. Para ello incubamos a los espermatozoides en un medio TYH control y un medio TYH suplementado con 100 mM de acetato de sodio (AcNa). Este último se empleó para disminuir la movilidad de los espermatozoides. Posteriormente se evaluó el porcentaje de espermatozoides móviles e hiperactivados por medio del sistema CASA (Análisis del Semen Asistido por Computadora). Para determinar si la hiperpolarización del V_m favorecía la recuperación de la movilidad se adiciono 1 μM de valinomicina (ionóforo de K^+). Como controles positivos de la alcalinización del pHi se incluyó la adición de 1 μM de monensina y 10 mM NH_4Cl .

5.9 Evaluación del potencial de membrana (V_m) de los espermatozoides

Los espermatozoides móviles de humano y ratón ($6-7 \times 10^6$ células/ml) se incubaron con el colorante DiSC-3 (5) (yoduro de 3,3'-Dipropiltiadicarbocianina) ($\lambda_{\text{ex}} 620 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} 670 \text{ nm}$) a una concentración de 1 μM durante 10 minutos. Para desacoplar el potencial de membrana mitocondrial se utilizó cianocarbonil-m-cloro-fenilhidrazona (CCCP) a una concentración de 500nM. La calibración se realizó utilizando 1 μM del ionóforo de K^+ valinomicina, seguido de adiciones subsecuentes de diferentes concentraciones de KCl (1.3, 2.5, 5, 10 mM). Los cambios del potencial de membrana fueron monitoreados a través del espectrofluorómetro Ocean Optics USB4000, operado por el sistema Spectra Suite

(Ocean Optics, Inc., USA). En cada evaluación se mantuvo control de temperatura (37°C) y agitación constante de cada cubeta evaluada.

El potencial de membrana de los espermatozoides se obtuvo a través de interpolar los valores de potencial teóricos contra las unidades arbitrarias de fluorescencia de los trazos obtenidos. El potencial de equilibrio para el ión K^+ (E_k) fue calculado con la ecuación de Nernst asumiendo que la concentración de $[K^+]_i$ corresponde a 120 mM.

5.10 Análisis bioinformático

Para determinar la variabilidad de las secuencias del dominio sensor a voltaje (DSV) del sNHE, buscamos y comparamos las secuencias proteicas de 73 especies de mamíferos incluyendo al *Homo sapiens* (humano), *Mus musculus* (ratón) y *Strongylocentrotus purpuratus* (erizo de mar), disponibles en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA). El alineamiento múltiple se ejecutó con el programa en línea ClustalW (EMBL, UK), siguiendo los parámetros predeterminados.

6. RESULTADOS

6.1 La hiperpolarización del V_m alcaliniza el pH_i del flagelo de los espermatozoides de ratón mediante la actividad de sNHE

Por lo menos en el espermatozoide de ratón hay un reporte que demuestra que la valinomicina produce un aumento del pH_i (Chávez *et al.*, 2014). Una propuesta es que este evento es mediado por la actividad del sNHE, como previamente se describió para el espermatozoide de erizo de mar (Lee *et al.*, 1984; Windler *et al.*, 2018). Con la finalidad de corroborar esta hipótesis, analizamos espermatozoides de ratones sNHE $^{+/+}$ y ratones sNHE $^{-/-}$ usando un sistema de imágenes de doble emisión, para lo cual utilizamos el colorante de razón sensible a pH SNARF 5F. En contraste con los colorantes de pH de una sola longitud de emisión, este sistema disminuye las distorsiones en la fluorescencia de emisión, ocasionada por artefactos de ruido, lo cual provee una ventaja significativa sobre la determinación del valor de pH_i absoluto del espermatozoide (Chávez *et al.*, 2020). Por otra parte, llevamos a cabo un análisis subcelular del espermatozoide, en donde describimos las diferencias del incremento del pH_i entre la región del flagelo (pieza media) y la cabeza. Esto con la finalidad de describir espacialmente probables diferencias sobre los cambios del pH_i . En la Figura 5 se muestran imágenes representativas de espermatozoides de ratón en las cuales se observan ligeros cambios sobre la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, al realizar el análisis cuantitativo para determinar el valor de pH_i absoluto observamos que el ionóforo de K^+ valinomicina, induce la alcalinización del pH_i del flagelo de los espermatozoides de ratones silvestres y no así de la cabeza (Figuras 6A y 6B). La comparación entre las medias del ΔpH_i de los espermatozoides sNHE $^{+/+}$ y sNHE $^{-/-}$, mostró que solo los flagelos de los espermatozoides de ratones silvestres alcalinizaron significativamente su pH_i después de la adición de valinomicina. En contraste con los espermatozoides de ratones nulos del sNHE (Figuras 6B y 6C) que no alcalinizaron su pH_i . Lo anterior, apoya la hipótesis de que la hiperpolarización del V_m activa al sNHE y eleva el pH_i del espermatozoide.

Para probar nuestra hipótesis, despolarizamos a los espermatozoides diluyéndolos en medio TYH con alta concentración de K^+ (KCl 40 mM). En este medio el potencial de equilibrio del ión K^+ debería estar en -35 mV, por lo tanto, valinomicina no debería inducir la hiperpolarización del E_m . En estas condiciones, no observamos un aumento significativo del pH_i en el flagelo de los espermatozoides silvestres (Figuras 6B y 6C). Este resultado

apoya la hipótesis de que la hiperpolarización del Vm induce la actividad de sNHE y no así el tratamiento de valinomicina.

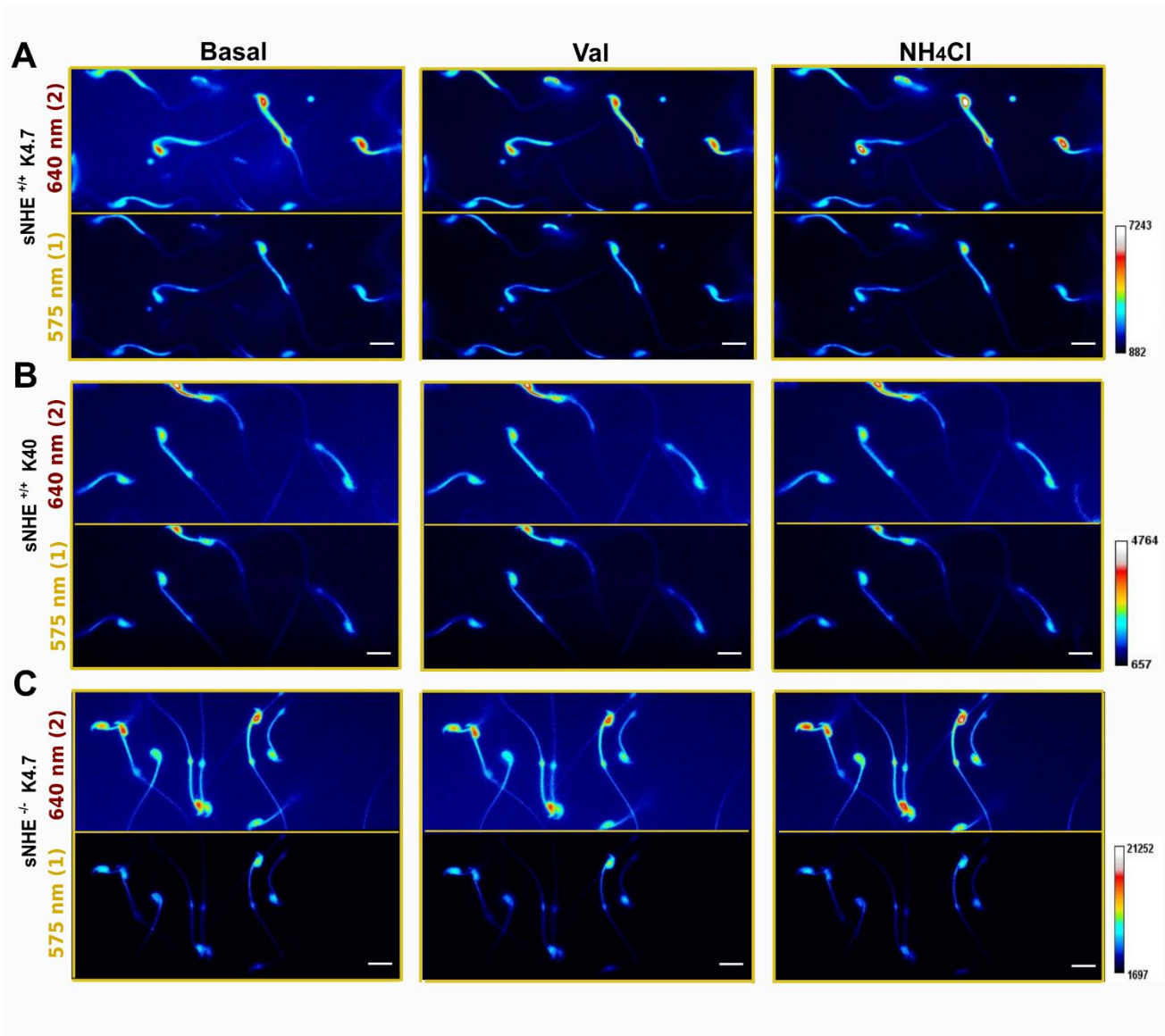


Figura 5. Imágenes de la fluorescencia de los espermatozoides de ratones *SNHE*^{+/+} y *SNHE*^{-/-} después del estímulo de hiperpolarización del Vm. (A). Imágenes representativas de espermatozoides *SNHE*^{+/+} en medio TYH con 4.7 mM de KCl (*SNHE*^{+/+} K4.7). (B). Espermatozoides *SNHE*^{+/+} incubados en medio TYH con 40 mM de KCl (*SNHE*^{+/+} K40). (C). Espermatozoides *SNHE*^{-/-} incubados en medio TYH con 4.7 mM de KCl (*SNHE*^{-/-} K4.7). Las imágenes se obtuvieron antes de la adición (Basal, paneles de la izquierda), después de la adición de valinomicina (Val, paneles centrales) y después de la alcalinización con cloruro de amonio (NH₄Cl 20 mM, paneles de la derecha). La escala de la derecha representa la intensidad de la fluorescencia. La barra inferior en cada imagen corresponde a una escala igual a 10 μ m.

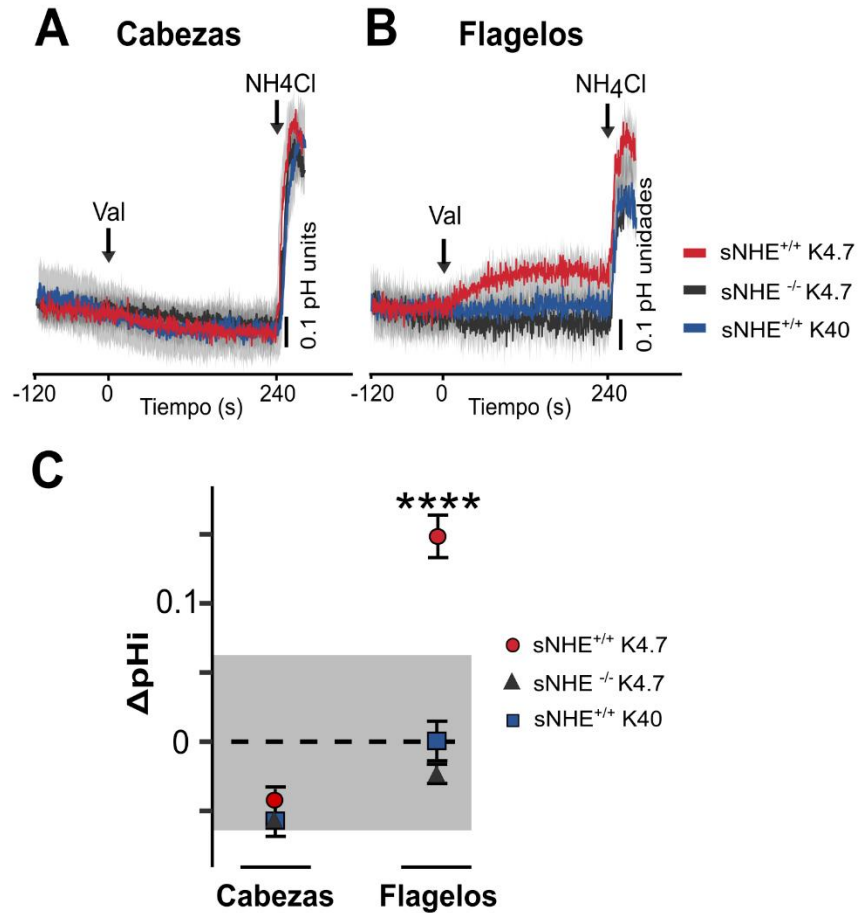


Figura 6. La hiperpolarización del Vm alcaliniza el pHi de los flagelos de los espermatozoides de ratón activando al sNHE. Se muestran los registros promedio del pHi de la cabeza (A) y el flagelo (B) de los espermatozoides de ratones silvestres (sNHE^{+/+}) incubados en medio TYH con 4.7 mM de KCl (sNHE^{+/+} K4.7, líneas rojas), medio TYH con 40 mM de KCl (sNHE^{+/+} K40, líneas azules) o espermatozoides nulos de sNHE (sNHE^{-/-}) en medio TYH con 4.7 mM de KCl (sNHE^{-/-} K4.7, líneas negras). Las flechas indican la adición del compuesto: 1 μM de valinomicina (Val) y 20 mM de cloruro de amonio (NH₄Cl). El sombreado gris de cada trazo representa el ± S.E.M de cada tratamiento. (C) Comparación de los cambios de pHi, ΔpHi (pHi_(pico) – pHi_(basal)) después de la adición de valinomicina de los espermatozoides sNHE^{+/+} K4.7 (círculos rojos), sNHE^{+/+} K40 (cuadrados azules) y sNHE^{-/-} K4.7 (triángulos negros). La línea punteada indica valores de Δ= 0 y el sombreado gris representa la ± S.D del ruido presente en el pHi basal. Los asteriscos indican diferencias estadísticas *****P* < 0.0001, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Se analizaron 9 ratones sNHE^{+/+} para el tratamiento K 4.7 (98 células), 6 ratones sNHE^{+/+} para el tratamiento K40 (38 células) y 6 ratones sNHE^{-/-} para el tratamiento K4.7 (61 células).

6.2 La valinomicina induce la alcalinización del pHi del flagelo de los espermatozoides de ratón con diferentes tipos de cinéticas

Durante nuestro análisis, encontramos que la hiperpolarización del Vm induce diferentes patrones de alcalinización del pHi del flagelo del espermatozoide (Figura Suplementaria 1). Por lo anterior, clasificamos los diferentes tipos de patrones de acuerdo con la velocidad y duración del incremento del pHi (Figura 7A): 1) Grupo 1A sostenido, 2) Grupo 1B transitorio, 3) Grupo 2 gradual y 4) no responsivos. Posteriormente analizamos la basal y el pico

(máxima respuesta) del pHi de las células que responden al estímulo de hiperpolarización del Vm. En este análisis encontramos que los espermatozoides exhiben diferentes valores de pHi basal. Por lo tanto, los cambios de pHi son relativamente pequeños, excepto para el grupo 2 que mostró una diferencia significativa entre el pHi basal y el pico. En contraste, cuando se compararon los valores de ΔpHi de los 3 grupos clasificados, se observó que el incremento del pHi por la hiperpolarización del Vm era significativo para los 3 grupos comparados (Figura 7C).

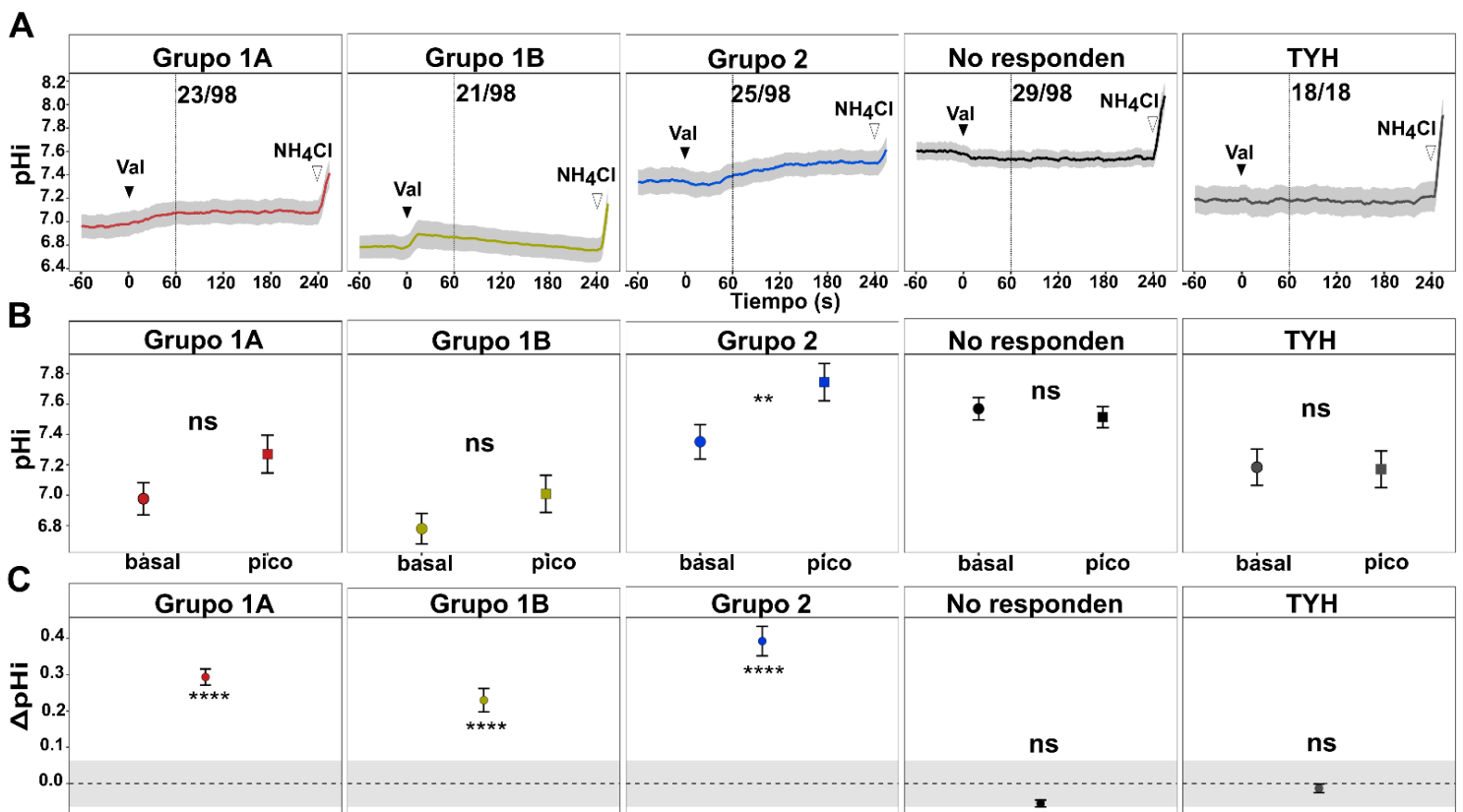


Figura 7. La alcalinización del pHi en los flagelos de espermatozoides *sNHE*^{+/+} presenta diferentes cinéticas. (A) Registros de la fluorescencia promedio de pHi de los flagelos de espermatozoides de ratón *sNHE*^{+/+} K4.7. Categorizados de acuerdo con el tipo de respuesta que presentaron después de la adición de 1 μ M valinomicina, tiempo 0 (punta de flecha sólida). Categorías: Grupo 1A (tipo sostenido), grupo 1B (tipo transitorio), grupo 2 (tipo gradual), células que no responden y células control negativo incubado con medio TYH K4.7. Las líneas verticales (60 s) indican el $V_{1/2}$ de la máxima respuesta alcanzada después de la adición de valinomicina. Las líneas continuas indican el pHi promedio de las células para cada tipo de respuesta, y las líneas grises desaparecidas representan el \pm S.E.M. Se adicionó 20 mM de NH_4Cl a los 240 s (punta de flecha). También se indica la frecuencia de aparición de cada tipo de respuesta. (B) Media comparativa del pHi antes (basal) y después (pico) del estímulo de valinomicina o medio TYH. Las barras verticales indican \pm S.E.M. según la prueba estadística de Wilcoxon. (C) Comparación de los valores ΔpHi ($pHi_{(pico)} - pHi_{(basal)}$) para cada tipo de respuesta. Los asteriscos indican diferencias estadísticas ** $P < 0.05$, **** $P < 0.00001$, ns indica que no hay diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Wilcoxon. Se analizaron las células de 6 ratones (18 células) para el control negativo con TYH (18 células) y de 9 ratones para el tratamiento de valinomicina (98 células). Grupo 1A (23 células), grupo 1B (21 células), grupo 2 (25 células) y espermatozoides que no responden (29 células).

Interesantemente nuestro análisis del pHi basal mostró que los flagelos que no responden al estímulo de valinomicina, presentan un pHi basal más alto (7.52 ± 0.04) en comparación con el pHi basal de los espermatozoides que si respondieron al estímulo 7.04 ± 0.05 ($p < 0.00001$) (Figura 8).

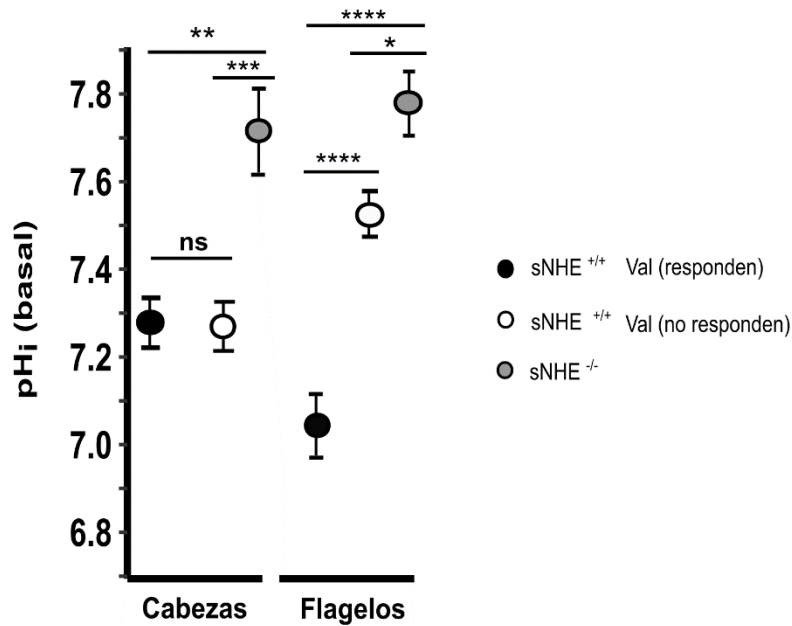


Figura 8. El pHi basal alcalino afecta la capacidad de respuesta de los flagelos sNHE ^{+/+} ante el estímulo de hiperpolarización del Vm. Se muestran las medias de pHi basal de las cabezas y los flagelos de ratones sNHE ^{+/+} y ratones sNHE ^{-/-}. Las células se clasificaron en aquellas que responden y que no responden al estímulo. Las barras verticales indican \pm S.E.M. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre las medias * $P < 0.02$, ** $P < 0.002$, *** $P < 0.0001$ y **** $P < 0.00001$, respectivamente, según la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de un análisis *post hoc* mediante la prueba de Dunn.

Por otra parte, encontramos que el pHi basal de los espermatozoides de ratones sNHE ^{-/-} también presenta variaciones: 1) espermatozoides sNHE ^{-/-} con un pHi alcalino (7.78 ± 0.05 , $p < 0.00001$) (Figuras 8 y 9) espermatozoides sNHE ^{-/-} con un pHi < 7.5 (Figura 5). Es importante mencionar que en ninguna de las poblaciones celulares de espermatozoides sNHE ^{-/-} se observó el incremento del pHi producido por la hiperpolarización del Vm.

En nuestro análisis también confirmamos que la adición del ionóforo del intercambio Na⁺/H⁺ monensina A, favorece el incremento del pHi en la cabeza y en el flagelo, este resultado indica que los gradientes iónicos de Na⁺/H⁺ permanecen normales para ambos genotipos de espermatozoides (Figura 10).

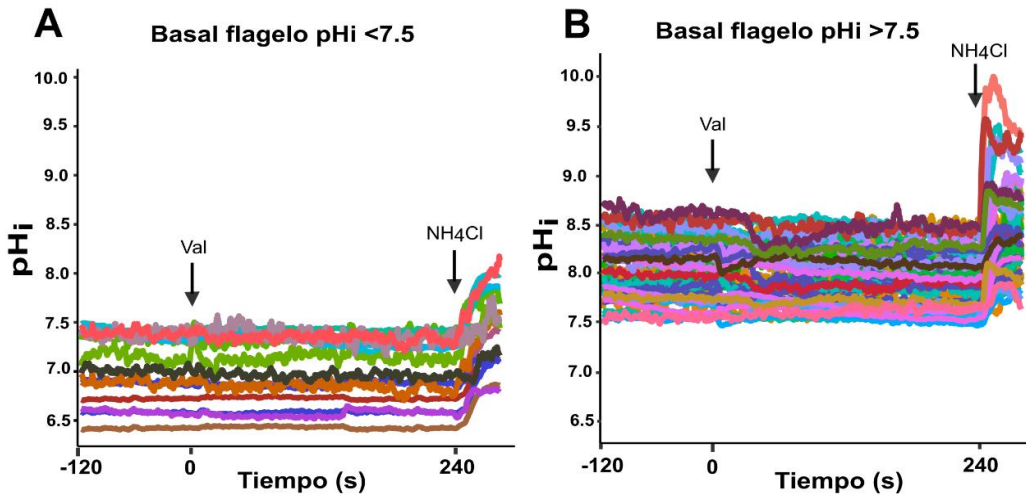


Figura 9. Los espermatozoides de los ratones *sNHE*^{-/-} no se alcalinizan por hiperpolarización independientemente del valor del *pHi* basal (< 7.5). Trazos representativos del *pHi* de los flagelos de ratones *sNHE*^{-/-} (A) flagelos con un *pHi* basal < 7,5 y (B) flagelos con *pHi* basal > 7,5. Las flechas indicaron el momento de adición de: 1 μ M de valinomicina (Val) y 20 mM de cloruro de amonio (NH_4Cl).

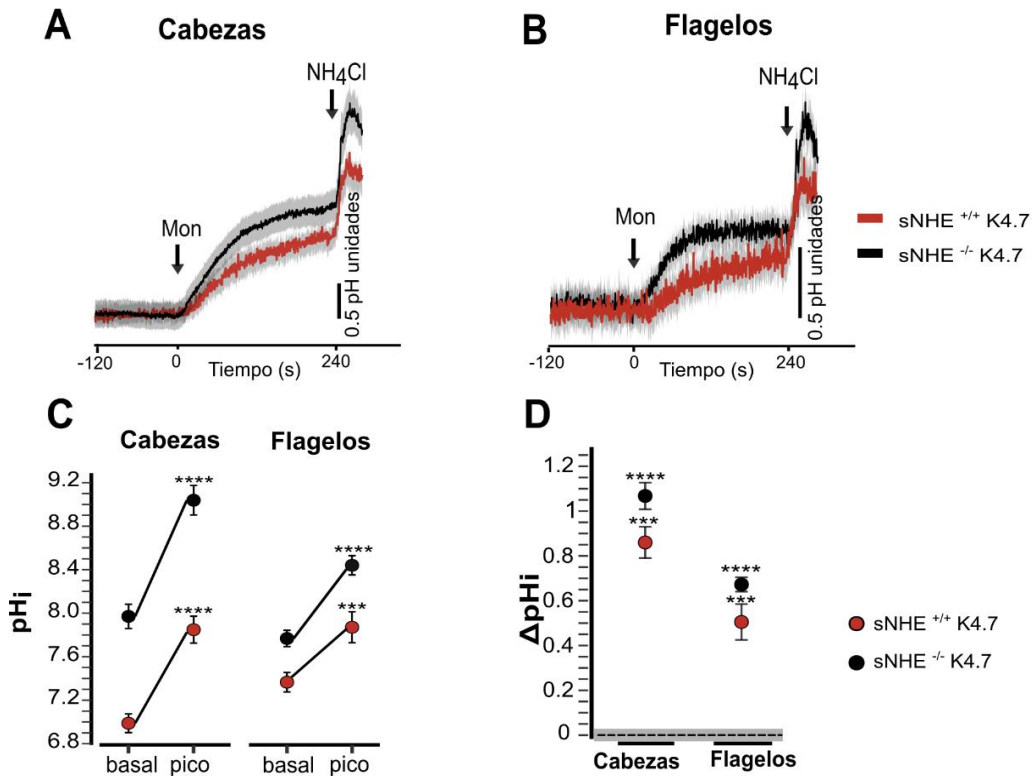


Figura 10. El ionóforo monensina induce la alcalinización del *pHi* de los espermatozoides de ratón *sNHE*^{+/+} y *sNHE*^{-/-}. Registros del *pHi* promedio de las cabezas (A) y los flagelos (B) de los espermatozoides *sNHE*^{+/+} (rojo) o *sNHE*^{-/-} (negro). Las líneas sombreadas de cada trazo representan \pm SD. de los trazos promedio. Las flechas indican la adición del estímulo: monensina (Mon) y NH_4Cl . (C) Se muestra la comparación de las medias del *pHi* basal y del pico. Las barras verticales indican \pm S.E.M. Los asteriscos indican diferencias estadísticas $***p < 0,0009$, $****p < 0,00001$ respectivamente, según la prueba de Wilcoxon. (D) Comparación de los $\Delta p\text{Hi}$ ($p\text{Hi}_{(\text{pico})} - p\text{Hi}_{(\text{basal})}$). La línea punteada indica valores delta 0 y el sombreado gris representa el \pm SD del ruido del *pHi* basal. Los asteriscos indican diferencias estadísticas $***p < 0,0002$ y $****p < 0,0001$ respectivamente, según la prueba de Wilcoxon. Estos resultados se obtuvieron después de analizar 50 células de al menos 9 ratones *sNHE*^{+/+} y 28 células de al menos 6 ratones *sNHE*^{-/-}.

6.3 La hiperpolarización del Vm no induce cambios del pHi en los espermatozoides de humano

Los espermatozoides de humano también expresan el gen ortólogo *SLC9C1* que se ha demostrado que es esencial para la fertilidad masculina (Cavarocchi *et al.*, 2021). En el espermatozoide de humano el gen parólogo *SLC9C2* también se expresa (<https://www.proteinatlas.org/>). Sin embargo, aún no se tiene clara su relevancia fisiológica en el espermatozoide de esta especie. Durante nuestras determinaciones del pHi no observamos el incremento del pHi de los espermatozoides de humano por el estímulo de hiperpolarización del potencial de membrana en las regiones de cabeza y flagelo (Figuras 11 y 12).

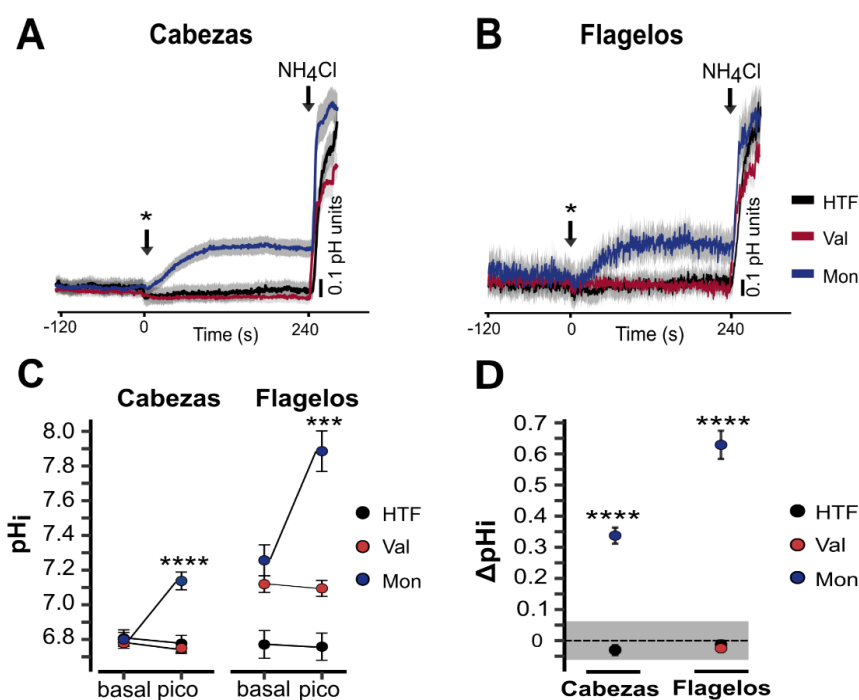


Figura 11. La hiperpolarización del Vm no induce la alcalinización del pHi en espermatozoides de humano. Trazos que representan el promedio del pHi de las cabezas (A) y los flagelos (B). La flecha con asterisco indica el estímulo: valinomicina (líneas rojas), monensina (líneas azules) o medio HTF (líneas negras). Las líneas sombreadas representan el \pm S.E.M. de cada trazo. (C) Se muestran las medias del pHi antes (basal) y después (pico) del estímulo: Valinomicina círculos rojos, Monensina círculos azules y HTF (círculos negro s). Las barras verticales indican \pm S.E.M. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre las medias ***P < 0.0005, ****P < 0.0001, respectivamente, según la prueba estadística de Wilcoxon. (D) Comparación de los cambios del Δ pHi ($pHi_{(pico)} - pHi_{(basal)}$). La línea punteada indica valores delta 0 y el sombreado gris representa el \pm S.D. del ruido del pHi basal. Los asteriscos indican diferencias estadísticas ****P < 0.0001 respectivamente, según estadística de Wilcoxon. Estos resultados se obtuvieron de analizar para cada tratamiento: TYH (54 células), Mon (63 células) y Val (53 células), de al menos seis donadores.

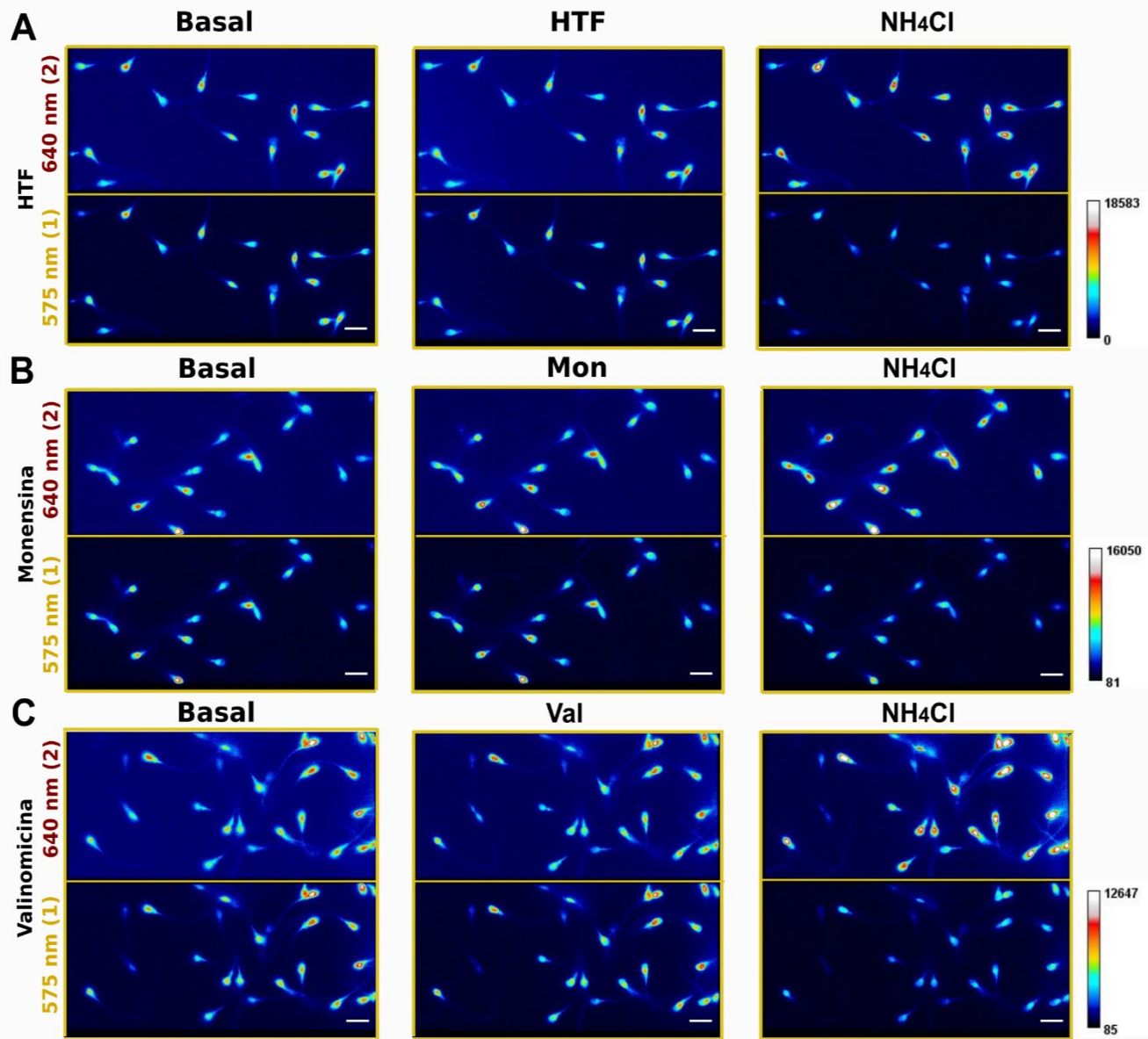


Figura 12. Imágenes de fluorescencia SNARF-5F de espermatozoides de humano después de la adición de diferentes compuestos. Imágenes representativas de espermatozoides de humano. (A) medio HTF, (B) 1 μ M de monensina (Mon), (C) 1 μ M de valinomicina (Val). Las imágenes se obtuvieron antes de la adición (Basal, paneles de la izquierda), después de los estímulos (paneles centrales) y después de la adición de 20 mM de cloruro de amonio (NH₄Cl, paneles de la derecha). Los dos canales de emisión para el colorante SNARF 5F-AM: 640 nm (rojo) y 575 nm (amarillo). Las escalas de intensidad de fluorescencia se representan con la barra de pseudocolor. En cada imagen la barra abajo a la derecha equivale a 10 μ m.

Adicionalmente incluimos como control positivo a monensina A, con la finalidad de corroborar la funcionalidad del gradiente de Na^+/H^+ . Nuestros resultados muestran (Figura 11) que la exposición de los espermatozoides de humano a monensina A, aumentó el pH_i tanto en la cabeza como en el flagelo, lo cual indica que el gradiente es funcional bajo las condiciones experimentales que utilizamos. A partir de estos resultados consideramos que es probable que la actividad de los sNHE's de humano (productos de los genes *SLC9C1* y *SLC9C2*) presente una regulación distinta en comparación con la vía de activación voltaje dependiente que presentan los intercambiadores sNHE de los espermatozoides de erizo de mar y de ratón.

6.4 La dependencia del voltaje del VSD del sNHE de humano podría ser diferente a la que presentan los espermatozoides de erizo de mar y ratón.

A través de un análisis bioinformático, comparamos las secuencias de aminoácidos que conforman al VSD del sNHE de los espermatozoides de erizo de mar, ratón y humano (Figura 13). Los resultados de este análisis muestran que el S4 del VSD del sNHE de erizo de mar está compuesto por 5 residuos de aminoácidos con carga positiva ininterrumpidos, es decir una arginina (R) o una lisina (K) cada 3 aminoácidos hidrofóbicos que conforman la alfa hélice de la membrana plasmática (RRRRK, respectivamente). Por otra parte, el S4 del VSD del espermatozoide de ratón presenta 4 aminoácidos con carga positiva ininterrumpidos (RRRK). Interesantemente encontramos que en el caso del S4 del VSD de humano este patrón de continuidad está interrumpido por la presencia de una glutamina (Q) y una prolina (P), para ambas proteínas de humano *SLC9CL1* y *SLC9C2* (QRRK, RRPK, respectivamente). Estas diferencias entre la composición de aminoácidos cargados que componen al S4 de humano y ratón podrían ser clave para la función del VSD del sNHE de ambas especies.

Por otra parte, también comparamos las secuencias de aminoácidos que conforman al VSD del sNHE de los espermatozoides de otras especies de mamíferos (73 especies totales) a través de un análisis bioinformático más extenso (Figura suplementaria 2). En donde describimos dos grandes grupos de animales que mantiene similitudes en la conformación de aminoácidos que componen al S4 del VSD del sNHE. Los clasificamos en dos categorías: especies tipo ratón y especies tipo humano. Consideramos que esta observación podría ser importante para describir la activación y función del sNHE en otras especies de mamíferos.

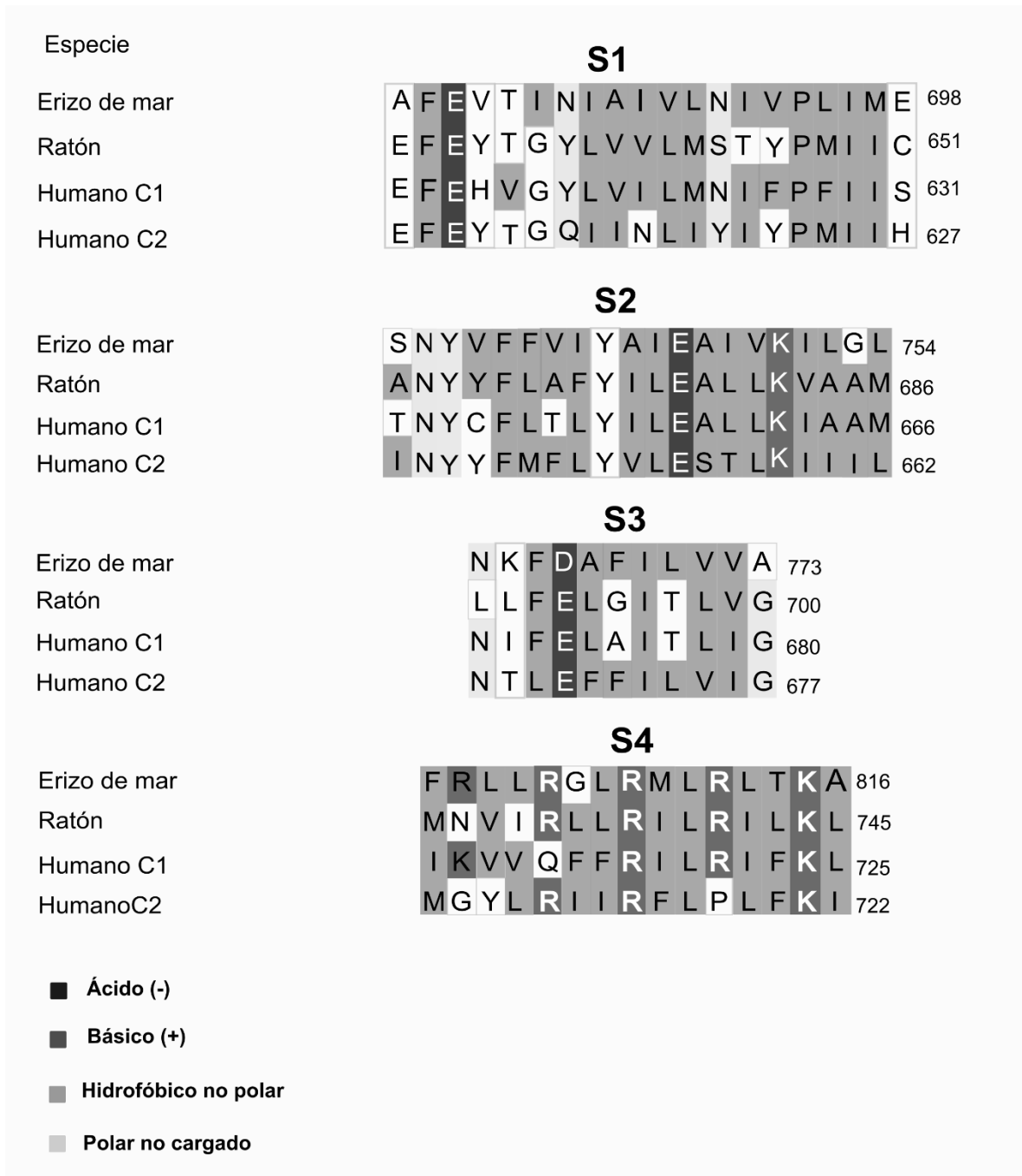


Figura 13. Comparación de los 4 segmentos transmembranales del VSD del sNHE de erizo de mar, ratón y humano. Se ilustra la secuencia de aminoácidos de los segmentos transmembrana predichos del VSD (S1-S4) del sNHE (SLC9C1 de tres especies y SLC9C2 de humano). Las secuencias de aminoácidos de cada segmento se clasificaron según sus propiedades químicas: ácidas (carga negativa, sombra gris oscura), básicas (carga positiva, sombra gris), hidrofóbicas no polares (sombra gris media) y polares sin carga (sombra gris clara). El segmento transmembrana 4 del VSD del sNHE humano muestra un número menor de aminoácidos cargados positivamente que podrían alterar la sensibilidad del VSD al voltaje.

7. DISCUSIÓN

7.1 La hiperpolarización del Vm en la fisiología del sNHE

Es ampliamente conocido que la hiperpolarización del Vm es un evento clave en la capacitación de los espermatozoides de mamíferos. De hecho, dicha hiperpolarización se ha correlacionado con eventos fisiológicos de gran relevancia para el espermatozoide como: el incremento en las concentraciones de calcio intracelular y la reacción acrosomal (Arnoult *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2001; De La Vega-Beltran *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2017; Balestrini *et al.*, 2020). Diversas investigaciones sugieren que la ocurrencia de este fenómeno también se encuentra correlacionado con la regulación de la movilidad de los espermatozoides de algunos invertebrados marinos como el erizo de mar, la ascidiacea y el pez salmón (Boitano & Omoto 1991; Harumi *et al.*, 1992; Izumi *et al.*, 1999). Estudios sobre la coevolución de sNHE y otras proteínas de relevancia fisiológica para el espermatozoide señalan que estas especies y los mamíferos expresan el gen que codifica para el sNHE (*SLC9C1*) (Romero & Nishigaki 2019; Darszon *et al.*, 2020). En contraste con algunas especies como el pez cebra, la rana africana, la mosca de la fruta y los nemátodos que no conservan el gen que codifica para el sNHE, en las que además se ha descrito que la hiperpolarización del Vm no resulta relevante para la movilidad hiperactivada (Inoda & Morisawa 1987; Takai & Masaaki 1995).

Desde los 80s, se reportó que el espermatozoide de erizo de mar posee un NHE atípico, activado por la hiperpolarización del Vm (Lee 1984, 1985). En 2018 los resultados de experimentos de *patch clamp* en células ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) expresando el sNHE, confirmaron que dicho transportador corresponde al NHE atípico (Windler *et al.*, 2018). En este reporte se demostró que los dos dominios regulatorios (VSD y CNBD) del sNHE, son importantes para la regulación positiva del intercambiador, mediada por la hiperpolarización del Vm y por la unión de AMPc (Windler *et al.*, 2018). Debido a lo anterior, consideramos importante evaluar si el sNHE de mamíferos se regula de manera similar al sNHE de erizo de mar. Bajo este contexto nuestro estudio se enfocó en determinar la vía de activación del sNHE de mamíferos.

7.2 La hiperpolarización del Vm induce la actividad del sNHE en los espermatozoides de ratón

Para determinar que la hiperpolarización del Vm induce la alcalinización del pHi de los espermatozoides de ratón a través de la actividad del sNHE. Primero determinamos si la hiperpolarización del potencial de Vm favorecía la movilidad de los espermatozoides de ratones sNHE ^{+/+} (Figura suplementaria 3). Este experimento, se planteó en términos de recuperación de la movilidad, en donde los espermatozoides previamente acidificados con 100 mM de acetato de sodio (Wang *et al.* 2003), disminuyeron porcentualmente su movilidad. Bajo estos términos la adición de 1 μ M de valinomicina, recupero parcialmente la movilidad de los espermatozoides, de manera similar a los espermatozoides incubados con los tratamientos de monensina y NH₄Cl (Figura suplementaria 3). Debido a que es bien conocido que el batido flagelar es regulado a través de la actividad de las proteínas motoras dineínas ATPasas, las cuales son altamente pH dependientes (Christen *et al.*, 1993), estos resultados sugieren que valinomicina incrementó el pHi de los espermatozoides de ratón de manera semejante a los tratamientos de alcalinización del pH que utilizamos para este experimento.

Para demostrar que valinomicina induce la alcalinización del pHi, empleamos un sistema de imágenes utilizando un indicador fluorescente (de razón) del pHi, con la finalidad de minimizar los artefactos asociados al movimiento celular, alteraciones en el plano focal y la incorporación intracelular del colorante (Chávez *et al.*, 2020). Esta técnica nos permitió determinar el pHi absoluto de dos regiones del espermatozoide: la cabeza y la pieza media del flagelo. Nuestras observaciones muestran que la hiperpolarización del Vm producida por el ionóforo de K⁺, valinomicina, eleva el pHi del flagelo de los espermatozoides de ratones sNHE ^{+/+}, pero no de los ratones sNHE ^{-/-} (Figura 6). Para excluir la posibilidad de que valinomicina por sí misma indujera un cambio del pHi independientemente de la hiperpolarización del Vm, los espermatozoides se incubaron en un medio con alto potasio (40 mM KCl). Como esperábamos, el incremento del pHi inducido por valinomicina, se inhibió bajo esta condición experimental (Figura 6). Estos resultados sugieren que el sNHE de ratón es modulado de manera positiva por la hiperpolarización del Vm y no así por la valinomicina.

Aunque la función del CNBD del sNHE de ratón sigue siendo poco clara, es probable que la función del VSD de dicho intercambiador se regule de manera similar al sNHE de erizo de mar. De hecho, nosotros observamos la corriente de activación del VSD del sNHE

de ratón expresado en células HEK293 a un potencial hiperpolarizado (hallazgos no publicados). Este resultado apoya la probable similitud en la regulación de la actividad del sNHE en espermatozoides de ratón y de erizo de mar.

En el 2014 Chávez y colaboradores reportaron que la valinomicina inducía la alcalinización del pHi en la cabeza de los espermatozoides de ratón (Chávez *et al.*, 2014). Sin embargo, nosotros observamos que este evento ocurrió solo en el flagelo del espermatozoide. En este sentido nuestros resultados con SNARF-5F coinciden con la localización de sNHE a nivel de la pieza principal del flagelo del espermatozoide (Wang *et al.*, 2003). Aunque no podemos concluir a que se debe la discrepancia entre nuestros resultados con los obtenidos por Chávez y colaboradores en el 2014, consideramos que es posible que la sensibilidad del colorante BCECF sea mayor en comparación con el colorante SNARF-5F. De hecho, la concentración utilizada para la incorporación del colorante SNARF-5F (20 μM), es mayor en comparación con la concentración del colorante BCECF (0.5 μM) empleado por Chávez y colaboradores en el 2014. Por otra parte, no descartamos la posibilidad de que el colorante SNARF-5F produzca un efecto de amortiguación del pHi de las células evaluadas en esta investigación.

Durante nuestro análisis, observamos distintos patrones y cinéticas del aumento del pHi inducido por la hiperpolarización del Vm en los flagelos de los espermatozoides de ratón (Figura 7 y Figura suplementaria 1). Es importante destacar que el 29% de los espermatozoides sNHE ^{+/+}, no mostró aumento del pHi. Esta observación coincide con lo reportado por Chávez y colaboradores en 2014, en donde se analizó el pHi de espermatozoides de ratón con el colorante BCECF. Las observaciones de estos investigadores indican que el 50% de los espermatozoides no se alcalinizan por la adición de valinomicina (Chávez *et al.*, 2014). Nuestro análisis detallado de los valores del pHi en reposo reveló que las células que mantienen un pHi alto no son capaces de alcalinizar su pHi en respuesta al estímulo de hiperpolarización (Figura 4). Este resultado sugiere que la actividad del sNHE de ratón se ve afectada por el pHi del estado de reposo, es decir, el sNHE no cataliza el intercambio de Na^+/H^+ cuando el pHi basal es superior a 7.5. De hecho, para la mayoría de los NHE's somáticos la concentración citoplasmática de protones es crucial para favorecer el intercambio de Na^+/H^+ (Mahnensmith & Aronson 1985; Pedersen & Consejo 2019). Se ha propuesto que intracelularmente los protones se unen a un sitio alostérico de los intercambiadores para promover la actividad catalítica (Reshkin *et al.*, 2000; Cardone *et al.*, 2005). Por lo tanto, es probable que en los espermatozoides de ratón

que presentan un pHi basal alcalino, se encuentre reducida la actividad catalítica del sNHE para la salida de protones.

Inesperadamente, observamos que el pHi basal de los espermatozoides de ratón sNHE^{-/-} fue significativamente mayor que el de los espermatozoides silvestres (Figura 8). Se ha reportado que los espermatozoides nulos de NHE2, compensan la falta de su actividad para mantener la homeostasis del pHi en células somáticas (Guan *et al.*, 2006). Por lo tanto, es probable que otros transportadores de protones, incluidos otros NHE, estén sobre regulados en su función en los espermatozoides de ratones nulos de sNHE. En el espermatozoide de ratón se han descrito al menos seis isoformas de NHEs: NHE1, NHE5, NHE8, sNHE, NHA1 y NHA2 (Woo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Oberheide *et al.*, 2017; Muzzachi *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2021; Yeste *et al.*, 2021). Sin embargo, solo el NHA1 se localiza en la pieza principal del flagelo del espermatozoide (Chen *et al.*, 2016). Recientemente se describió en ratón, que la zona pelúcida provoca un aumento rápido del pHi mediado por el NHA1, que requiere de AMPc sintetizado por la adenilato ciclasa soluble (ACs) y un Vm suficientemente negativo establecido por el canal de K⁺ específico del espermatozoide, Slo3 (Balbach *et al.*, 2020). Sin embargo, se desconoce si este proceso está relacionado con la función del sNHE.

En nuestro estudio corroboramos que los espermatozoides nulos de sNHE que mantienen un pHi basal bajo, no responden al estímulo de hiperpolarización del Vm para favorecer la alcalinización de su pHi (Figura 9). Sin embargo, el hecho de que los espermatozoides sNHE^{-/-} generalmente mantengan un pHi alto en el estado de reposo (Figura 8) impide la comprensión completa sobre la relevancia del sNHE en la regulación del pHi espermático. Es decir, todavía hay posibilidad de que otra proteína como NHA1 pueda ser responsable del aumento del pHi inducido por valinomicina o de que exista un mecanismo del control del pHi acoplado a la función de sNHE.

Por otra parte, se sabe que la expresión de la sAC está alterada en ratones sNHE^{-/-} (Wang *et al.* 2007). Sabiendo que la cascada de señalización dependiente de AMPc es esencial en la fisiología de los espermatozoides de mamíferos (Esposito *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2004; Hess *et al.*, 2005), debe considerarse que a nivel celular pueden existir múltiples alteraciones metabólicas que contribuyan a los valores de pHi basal altos que encontramos en los espermatozoides de los ratones nulos del sNHE. Adicionalmente determinamos que el valor del Vm de los espermatozoides de ratones sNHE^{-/-} es más negativo (-59 mV) que el de los espermatozoides de ratones sNHE^{+/+} (-47 mV), asumiendo que no hay alguna alteración en la concentración de K⁺ intracelular (Figura Suplementaria 4). Esta diferencia

es una de las varias alteraciones que observamos en los espermatozoides de ratones nulos de sNHE.

Teniendo en cuenta que los espermatozoides sNHE ^{-/-} poseen alteraciones metabólicas importantes, consideramos que es necesario establecer un sistema de expresión heterólogo eficiente de esta proteína. De hecho, en nuestro laboratorio recientemente, adquirimos un plásmido que codifica para el sNHE completo de ratón con la inserción de un intrón, que reduce los problemas de toxicidad que conlleva la expresión de esta proteína en bacterias (Arcos-Hernández *et al.*, 2022). El uso de este plásmido podría ayudar a establecer un sistema de análisis relevante para el estudio del sNHE de ratón.

7.3 La hiperpolarización del V_m de los espermatozoides de humano no induce la actividad del sNHE

En contraste con lo observado en los espermatozoides de ratón, la hiperpolarización del V_m no indujo el incremento del pHi en los espermatozoides de humano. Sin embargo, debido a que las muestras de humano fueron obtenidas de eyaculados en presencia de líquido seminal, es necesario considerar que la comparación entre los resultados de ambas especies pudo verse influenciada por la previa exposición al bicarbonato (Okamura *et al.*, 1985), las prostaglandinas (Jeschke *et al.*, 2021) y activadores de la función de la sACs (Chen *et al.*, 2000), así como de CatSper (Lishko *et al.*, 2011). Es importante mencionar que nuestras determinaciones buscaron igualar las características no capacitantes que se tienen en los espermatozoides de ratón obtenidos del epidídimo, utilizando un medio libre de bicarbonato.

Los resultados de estudios recientes en espermatozoides de humano sugieren que, mutaciones en el gen *SLC9C1* producen infertilidad masculina, principalmente por defectos en la movilidad de los espermatozoides (Zhang *et al.*, 2017; Cavarocchi *et al.*, 2021). Este hallazgo podría indicar que en el humano el sNHE desempeña un rol importante para la fertilidad de esta especie. Sin embargo, es importante definir si la función de sNHE en el humano contribuye a la actividad catalítica del intercambio Na⁺/H⁺ o si por el contrario su función está asociada al metabolismo de la sACs como se ha descrito para los espermatozoides de ratón (Wang *et al.*, 2017).

Respecto a la hiperpolarización del potencial de V_m en los espermatozoides de humano, si bien se ha descrito que es esencial para el proceso de capacitación espermática (Baro *et al.* 2019; Puga-Molina *et al.*, 2020), aún no está claro el papel que desempeña este fenómeno en el espermatozoide de humano. Por lo tanto, es importante describir su

relevancia fisiológica en las vías de señalización importantes para la fertilidad de esta especie.

Por otra parte, en el espermatozoide de humano, se propone que el canal de protones activado por voltaje (Hv1), es el principal candidato que favorece la alcalinización del pHi del flagelo. De hecho, algunas investigaciones sugieren que su actividad se incrementa durante el proceso de capacitación del espermatozoide de esta especie (Lishko *et al.*, 2010; Matamoros-Volante & Treviño 2020). El canal Hv1 está conformado por un homodímero, que mantiene 2 poros que regulan la salida de protones a través de la membrana plasmática, además posee 4 segmentos transmembranales que estructuralmente conforman al dominio sensor a voltaje. Su actividad se ha estudiado a través de la despolarización del potencial de membrana y en ambientes de pHi ácido, condiciones que por lo menos en el espermatozoide de humano producen grandes corrientes de H⁺ (100 pA/pF a +100 mV) y que en el caso de los espermatozoides de ratón se ven reflejadas en pequeñas corrientes de H⁺ (<10 pA/pF) (Lishko *et al.*, 2010). De manera interesante los espermatozoides de ratones nulos de Hv1 no son infértiles (Ramsey *et al.*, 2009; Lishko *et al.*, 2010). Estos apoyan la teoría de que el pHi de los espermatozoides de ambas especies se regula de manera distinta (Lishko *et al.*, 2010; Nishigaki *et al.*, 2014).

7.4 La dependencia del voltaje del VSD del sNHE de humano podría ser diferente a la que presentan los espermatozoides de erizo de mar y ratón

En el desarrollo de este trabajo comparamos el S4 del VSD de sNHE de erizo de mar, de ratón y de humano. Esta comparación nos permitió describir que el S4 del VSD de humano presenta una reducción en el número de aminoácidos con carga positiva, regularmente presentes en los canales activados por voltaje. De hecho, en comparación con los VSD's de erizo de mar y de ratón, el VSD de humano presenta sustituciones de los aminoácidos arginina (R) y lisina (K) por una prolina (P) o glutamina (Q) para los genes *SLC9C1* y *SLC9C2* respectivamente (Figuras 13 y Suplementaria 2). Nosotros consideramos que esta sustitución de aminoácidos con carga positiva podría repercutir en la sensibilidad al voltaje que mantiene el VSD de humano. De hecho, la evidencia sugiere que la sustitución de una arginina por una glutamina en el S4 del VSD del sNHE de erizo de mar, cambia el V_{1/2} de activación de la corriente de compuerta de este intercambiador a voltajes de hiperpolarización más negativos (Windler *et al.*, 2018). Para confirmar esta hipótesis es necesaria la caracterización biofísica del VSD del sNHE a través de un sistema de expresión heterólogo efectivo.

8. CONCLUSIONES

Mostramos que la hiperpolarización del V_m producida por el ionóforo de K^+ valinomicina, induce la alcalinización del pH_i del flagelo de los espermatozoides de ratones silvestres. Además, determinamos que este fenómeno depende exclusivamente del gradiente de K^+ y no así de la adición de valinomicina, ya que al incrementar las concentraciones de K^+ externo (40 mM KCl) observamos que la alcalinización del pH_i de los espermatozoides silvestres se inhibe. Este resultado apoya la idea de que la hiperpolarización del V_m produce una alcalinización del espermatozoide que podría contribuir a los múltiples procesos de regulación del pH_i de esta especie.

Por otra parte, demostramos que, la alcalinización del pH_i depende de la presencia del sNHE, ya que los espermatozoides de ratones nulos de sNHE, no se alcalinizaron, independientemente del valor del pH_i basal. Nuestros resultados sugieren que la hiperpolarización del espermatozoide regula al sNHE, lo cual podría contribuir a la activación de CatSper, como ocurre en el caso de los espermatozoides de erizo de mar.

El análisis del pH_i de los espermatozoides, reveló que su alcalinización depende del valor de pH_i basal, ya que las células que no se alcalinizaron presentaron un pH_i basal superior a 7.5. El pH_i basal que presentaron los espermatozoides de ratones que si respondieron al estímulo fue en promedio, de 7.04 ± 0.05 . Por otra parte, demostramos que el pH_i basal de los espermatozoides de ratones nulos de sNHE es más elevado en el estado de reposo 7.78 ± 0.05 , lo cual sugiere que existen otro mecanismo, aparte del sNHE, que desempeña un papel relevante como regulador del pH_i de los espermatozoides de esta especie.

Nuestros resultados demuestran que la hiperpolarización del V_m no induce la alcalinización del pH_i de los espermatozoides de humano, lo cual sugiere que el mecanismo de regulación y activación de la función de sNHE es distinto al que presentan los espermatozoides de ratón y erizo de mar.

9. PERSPECTIVAS

Es necesario determinar si la activación del sNHE de ratón puede ser regulada por la presencia de nucleótidos cíclicos (uso de análogos permeables), como se observó en el caso de los espermatozoides de erizo de mar. Por consiguiente, se requiere establecer un sistema de expresión heterólogo del sNHE de ratón para completar la caracterización funcional de este intercambiador.

Un resultado preliminar con espermatozoides sNHE ^{+/+} capacitados (medio TYH con 15 mM de bicarbonato) sugiere que el incremento del pHi inducido por la hiperpolarización del Vm presenta un nivel de alcalinización aparentemente mayor al observado en un medio no capacitante (Figura suplementaria 5). Si bien estos resultados apuntan a la descripción de la actividad del intercambiador a través de la vía de señalización regulada por sAC, se requieren un mayor número de observaciones que permitan describir este fenómeno en espermatozoides capacitados.

Dado que el valor de pHi basal de los espermatozoides nulos de sNHE es elevado, es necesario determinar si la ausencia del sNHE induce la sobre regulación funcional de otros intercambiadores como NHA1, por ejemplo.

Debido a que el estímulo de hiperpolarización del Vm no indujo un aumento del pHi de los espermatozoides de humano, se requiere determinar si el sNHE de humano contribuye a la regulación del pHi de los espermatozoides de esta especie, por tal motivo es necesario establecer un sistema de expresión heterólogo efectivo para caracterizar su función.

Es necesario determinar si la sensibilidad al voltaje del VSD del sNHE depende de la composición de los aminoácidos con carga positiva que forman al S4, para ello sería importante analizar otras especies de espermatozoides con características semejantes al VSD de tipo humano (cobayo) y de tipo ratón (bovinos, ovinos, porcinos) considerando que en el caso de ratón existe la ausencia de una lisina (K) que si presentan otra clase de mamíferos.

10. REFERENCIAS

1. **Arcos-Hernández C., Suárez-Delgado E., D. Islas L., Romero F., López-González I, Ai H., Nishigaki T.** 2022. How to study a highly toxic protein to bacteria: A case of voltage sensor domain of mouse sperm-specific sodium/proton exchanger. *Protein Expression and Purification*. 201: 106172
2. **Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M., Florman HM.** 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *PNAS* **96**:6757–6762.
3. **Austin CR** 1951 Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Biological Sciences* 4: 581–596.
4. **Balbach M, Hamzeh H, Jikeli JF, Brenker C, Schiffer C, Hansen JN, Neugebauer P, Trötschel C, Jovine L, Han L et al.** 2020. Molecular mechanism underlying the action of zona-pellucida glycoproteins on mouse sperm. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 572–735.
5. **Balestrini PA, Sánchez-Cárdenas C, Luque GM, Baro GC, Sierra JM, Hernández-Cruz A, Visconti PE, Krapf D, Darszon A & Buffone MG.** 2020. Membrane hyperpolarization abolishes calcium oscillations that prevent induced acrosomal exocytosis in human sperm. *FASEB Journal* 35: 1–14.
6. **Baro GC, Ritagliati C, Stival C, Balestrini PA, Buffone MG & Krapf D.** 2019. Determination of a robust assay for human sperm membrane potential analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7: 1–9.
7. **Berger TK, Fußhüller DM, Goodwin N, Bönigk W, Müller A, Khesroshahi ND, Brenker C, Wachten D, Krause E, Kaupp UB.** 2017. Post-translational cleavage of Hv1 in human sperm tunes pH- and voltage-dependent gating. *Journal of Physiology* 595: 1–14.
8. **Breitbart H.** 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol*. 49(3):321-7.
9. **Brett CL., Donowitz M. y Rao R.** 2005. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C223–C239.
10. **Boitano S & Omoto CK.** 1991. Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH. *Journal of Cell Science* 98: 343–349.

11. **Cai X., Clapham DE.** 2008. Evolutionary Genomics Reveals Lineage-Specific Gene Loss and Rapid Evolution of a Sperm-Specific Ion Channel Complex: CatSpers and CatSperb. *PLoS ONE*. 3 (10) 1-10.
12. **Cardone RA, Casavola V & Reshkin SJ.** 2005. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nature Reviews: Cancer* 5: 786–795.
13. **Cavarocchi E, Whitfield M, Chargui A, Stouvenel L, Lorés P, Coutton C, Arnout C, Santulli P, Patrat C, Thierry-Mieg N et al.** 2021. The sodium/ proton exchanger SLC9C1 (sNHE) is essential for human sperm motility and fertility. *Clinical Genetics* 99: 684–693.
14. **Chang M. C.** 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.
15. **Chávez JC, De la Vega-Beltrán JL, Escoffier J, Visconti PE, Treviño CL, Darszon A, Salkoff L & Santi CM.** 2013. Ion Permeabilities in Mouse Sperm Reveal an External Trigger for SLO₃-Dependent Hyperpolarization. *PLoS ONE*. 8 (4): 1–13.
16. **Chávez JC, Ferreira JJ, Butler A, De La Vega Beltrán JL, Treviño CL, Darszon A, Salkoff L & Santi CM.** 2014. SLO₃ K⁺ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *Journal of Biological Chemistry*. 289 (46). 32266–32275.
17. **Chávez JC, Darszon A, Treviño CL & Nishigaki T.** 2020. Quantitative Intracellular pH Determinations in Single Live Mammalian Spermatozoa Using the Ratiometric Dye SNARF-5F. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 7. 1–13.
18. **Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Lourgenko V, Sinclair ML, Levin LR & Buck J.** 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*. 289: 625-627.
19. **Chen S.R, Chen M, Deng SL, Hao XX, Wang XX & Liu YX.** 2016. Sodium-hydrogen exchanger NHA1 and NHA2 control sperm motility and male fertility. *Cell Death Disease*. 7 e2152.
20. **Clapham DE. & Hulse RE.** 2021. Sperm ion channel swims into sharper focus. *Nature*. 595: 595.
21. **Darszon A, Nishigaki T, López-González I, Visconti PE & Treviño CL.** 2020. Differences and Similarities: The Richness of Comparative Sperm Physiology. 35: 196–208.
22. **De La Vega-Beltrán JL, Sánchez-Cárdenas C, Krapf D, Hernández-González EO, Wertheimer E, Treviño CL, Visconti PE & Darszon A.** 2012. Mouse sperm

- membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *Journal of Biological Chemistry*. 287 (53): 44384–44393.
- 23. Demarco IA., Espinosa F., Edwards J., Sosnik J., De la Vega-Beltrán JL, Hockensmith JW., Kopf GS., Darszon A. y Visconti PE.** 2003. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation. *The journal of biological chemistry*. 278 (9): 7001–7009.
- 24. Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MAM, Robben TJA, Strik AM, Kuil C, Philipsen RLA, Van Duin M, Conti M & Gossen JA.** 2004. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm motility defect. *PNAS*. 101 (9): 2993–2998.
- 25. Fraire-Zamora JJ, Marco & T. González-Martínez.** 2004. Effect of intracellular pH on depolarization-evoked calcium influx in human sperm. *American Journal of Physiology Cell Physiol*. 287: C1688–C1696.
- 26. Gadêlha H., Hernández-Herrera P., Montoya F., Darszon A., Corkidi G.** 2020. Human sperm uses asymmetric and anisotropic flagellar controls to regulate swimming symmetry and cell steering. *Biophysics*. 6: 1-15.
- 27. Garcia MA., Meizel S.** 1999. Progesterone-Mediated Calcium Influx and Acrosome Reaction of Human. *Biology of reproduction* 6: 102–109.
- 28. Garcia M., Meizel S.** 1999. Regulation of Intracellular pH in Capacitated Human Spermatozoa by a Na⁺/H⁺ Exchanger Spermatozoa: Pharmacological Investigation of T-Type Calcium Channels. *Molecular reproduction and development*. 52:189–195
- 29. Guan Y, Dong J, Tackett L, Meyer JW, Shull GE & Montrose MH.** 2006. NHE2 is the main apical NHE in mouse colonic crypts but an alternative Na⁺ dependent acid extrusion mechanism is upregulated in NHE2-null mice. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 291 (4): 689–699.
- 30. Harumi T, Hoshino K & Suzuki N.** 1992. Effects of Sperm-Activating Peptide I on *Hemicentrotus pufcberrius* Spermatozoa in High Potassium Sea Water. *Development Growth & Differentiation*. 34 (2): 163-172.
- 31. Hernández-González EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, López-González I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A & Visconti PE.** 2006. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (9): 5623–5633.

- 32. Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suárez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J & Moss SB.** 2005. The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental Cell*. **9**: 249–259.
- 33. Inoda T & Morisawa M.** 1987. Effect of osmolarity on the initiation of sperm motility in *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry and physiology*. **88A**: 539-542.
- 34. Izumi H, Tézé M, Inaba K, Oka Y & Morisawa M.** 1999. Membrane hyperpolarization by sperm-activating and attracting factor increases cAMP level and activates sperm motility in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Developmental Biology* **213**: 246–256.
- 35. Jeschke JK, Biagioni C, Schierling T, Wagner IV, Börgel F, Schepmann D, Schüring A, Kulle AE, Holterhus PM, von Wolff M, Wünsch B, Nordhoff V, Strünker T & Brenker C.** 2021. The action of reproductive fluids and contained steroids, prostaglandins, and Zn^{2+} on CatSper Ca^{2+} Channels in Human Sperm. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. **9**: 1-16.
- 36. Kang H, Liu, M, Zhang W, Huang RZ, Zhao N, Chen C & Zeng XH.** 2021. Na^+/H^+ Exchangers involve in regulating the pH-sensitive ion channels in mouse sperm. *International Journal of Molecular Science*. **22**: 1612.
- 37. Kirichok Y, Navarro B & Clapham DE.** 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature*. **439**: 737–740.
- 38. Lee HC.** 1984. A membrane potential-sensitive Na^+-H^+ exchange system in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*. **259** (24) 15315-15319.
- 39. Lee HC.** 1985. The voltage-sensitive Na^+/H^+ exchange in sea urchin spermatozoa flagellar membrane vesicles studied with an entrapped pH probe. *The Journal of biological chemistry*. **260** (19): 10794-10799.
- 40. Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A., Kirichok Y.** 2010. Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. *Cell*, **140** (3): 327–337.
- 41. Lishko PV., Kirichok Y.** 2010. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *Physiol* **588.23**: 4667–4672.

- 42. Linares-Hernández L., Guzmán-Grenfell A.M., Hicks-Gómez J.J., González-Martínez M.T.** 1998. Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochimica et Biophysica.* 1372 1–12
- 43. Lishko PV, Botchkina IL & Kirichok Y.** 2011. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature.* 471: 387-391.
- 44. Liu T, Huang JC, Zuo WL, Lu CL, Chen M, Zhang XS, Li YC, Cai H, Zhou WL & Hu ZY.** 2010. A novel testis-specific Na^+/H^+ exchanger is involved in sperm motility and fertility. *Frontiers Bioscience.* 2:566–581.
- 45. López-González I, Torres-Rodríguez P, Sánchez-Carranza O, Solís-López A, Santi CM, Darszon A & Treviño CL.** 2014. Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction.* 20 (7): 619–629.
- 46. Loyo-Celis V., Orta G., Beltrán C., Darszon A.** 2021. CatSper channels in sea urchin sperm. *Cell Calcium.* 9: 102466.
- 47. Mahnensmith RL & Aronson PS.** 1985. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circulation Research.* 56 (6): 773–788.
- 48. Martins AD, Bernardino RL, Neuhaus-Oliveira A, Sousa M, Sá R, Alves MG & Oliveira PF.** 2014. Physiology of Na^+/H^+ exchangers in the male reproductive tract: Relevance for male fertility. *Biology of Reproduction.* 91: 11.
- 49. Mata-Martínez E, José O, Torres-Rodríguez P, Solís-López, Sánchez-Tusie A, Sánchez-Guevara Y & Treviño CL.** 2013. Measuring intracellular Ca^{2+} changes in human sperm using four techniques: fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging. *Journal of Visualized Experiments.* 75: 50344.
- 50. Matamoros-Volante A & Trevino CL.** 2020. Capacitation-associated alkalization in human sperm is differentially controlled at the subcellular level. *Journal of Cell Science.* 133: (2).
- 51. Miller MR, Kenny SJ, Mannowetz N, Mansell SA, Wojcik M, Mendoza S, Zucker RS, Xu K & Lishko PV.** 2018. Asymmetrically positioned flagellar control units regulate human sperm rotation. *Cell Reports.* 24: 2606-2613.
- 52. Mishra AK, Kumar A, Swain DK, Yadav S & Nigam R.** 2018. Insights into pH regulatory mechanisms in mediating spermatozoa functions. *Veterinary World.* 11: 852-858.

- 53. Muñoz-Garay C., De la Vega-Beltán JL., Delgado R., Labarca P., Felix R. & Darszon A.** 2001. Inwardly Rectifying K1 Channels in Spermatogenic Cells: Functional Expression and Implication in Sperm Capacitation. *Developmental Biology* 234, 261–274.
- 54. Muzzachi S, Guerra L, Martino NA, Favia M, Punzi G, Silvestre F, Guaricci AC, Roscino MT, Pierri CL & Dell’Aquila ME.** 2018. Effect of cariporide on ram sperm pH regulation and motility: Possible role of NHE1. *Reproduction*. **15**: 433–445.
- 55. Navarro B, Kirichok Y & Clapham DE.** 2007. KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *PNAS*. 104: 7688-7692.
- 56. Nishigaki T, José O, González-Cota AL, Romero F, Treviño CL & Darszon A.** 2014. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 450 (3): 1149–1158.
- 57. Nolan MA, Babcock DF, Wennemuth G, Brown W, Burton KA & McKnight GS.** 2004. Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Cα2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *PNAS*. 101 (37): 13483–13488.
- 58. Oberheide K, Puchkov D & Jentsch TJ.** 2017. Loss of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE8 causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *Journal of Biological Chemistry*. 292: 10845–10854.
- 59. Okagaki T & Kamiya R.** 1986. Microtubule Sliding in Mutant Chlamydomonas Axonemes Devoid of Outer or Inner Dynein Arms. *The Journal of Cell Biology*. 103: 895-1902.
- 60. Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H & Sugita Y.** 1985. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *The journal of biological chemistry*. 260 (17): 9699-970.
- 61. Pedersen SF & Counillon L.** 2019. The slc9a-c mammalian Na⁺/H⁺ exchanger family: molecules, mechanisms, and physiology. *Physiology Reviews*. 99: 2015–2113.
- 62. Puga-Molina LCP, Gunderson S, Riley J, Lybaert P, Borrego-Alvarez A, Jungheim ES & Santi CM.** 2020. Membrane Potential Determined by Flow Cytometry Predicts Fertilizing Ability of Human Sperm. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 7: 387.

- 63. Qi H., Moran MM., Navarro B., Chong JA., Krapivinsky G., Krapivinsky L., Kirichok Y., Ramsey IS., Quill TA. y Clapham DE.** 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. PNAS. 104 (4): 1219–1223.
- 64. Quill TA, Wang D & Garbers DL.** 2006. Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSper. Molecular and Cellular Endocrinology. 250: 84–92.
- 65. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL & Clapham DE.** 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature. 413 (6856): 603–609.
- 66. Ramsey IS, Ruchti E, Kaczmarek JS & Clapham DE.** 2009. Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst. Proc Natl Acad Sci USA (106): 7642–7647.
- 67. Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, Alunni-Fabbroni M, Casavola V & Tommasino M.** 2000. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. The FASEB Journal. 14 (14): 2185–2197.
- 68. Romero F & Nishigaki T.** 2019. Comparative genomic analysis suggests that the sperm-specific sodium/proton exchanger and soluble adenylyl cyclase are key regulators of CatSper among the Metazoa. Zoological Letters. 5 (1).
- 69. Schackmann R.W., Chock P.B.** 1986. Alteration of Intracellular [Ca²⁺] in Sea Urchin Sperm by the Egg Peptide Speract. The journal of biological chemistry. 261 (19) 8719-8728.
- 70. Santi CM, Martínez-López P, De la Vega-Beltrán JL, Butler A, Darszon A & Salkoff L.** 2010. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. NIH Public Access. 584 (5): 1041-1046.
- 71. Schreiber M., Wei A., Yuan A., Gaut J, Saito M. y Salkoff L.** 1998. Slo3, a Novel Ph sensitive K⁺ Channel from Mammalian. The journal of biological chemistry. Spermatoocytes. 273 (6) 3509–3516.
- 72. Seifert R., Flick M., Bönigk W., Alvarez L., Trötschel C., Poetsch A., Müller A., Goodwin N., Pelzer P., Kashikar ND., Kremmer E., Jikeli J., Timmermann B., Kuhl H., Fridman D., Windler F., Kaupp UB & Strünker T.** 2015. The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm. The EMBO Journal. 34 (3) 379-392.

- 73. Suárez Susan S.** 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*. 4 (6): 647-657.
- 74. Takai H & Masaaki M.** 1995. Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. *Journal of Cell Science* 108: 1175-1181.
- 75. Visconti PE., Moore GD., Bailey JL., Leclerc P., Connors SA., Pan D., Olds-Clarke P & Kopf GS.** 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. *Development* 121, 1139-1150.
- 76. Wang D, King SM, Quill TA, Doolittle LK & Garbers DL.** 2003. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature Cell Biology*. 5 (12): 1117–1122
- 77. Wang D, Hu J, Bobulescu IA, Quill TA, McLeroy P, Moe OW & Garbers DL.** 2007. A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (22.): 9325–9330.
- 78. Woo A.L., James P.F., Lingrel J.B.** 2002. Roles of the Na,K-ATPase α 4 Isoform and the Na⁺/H⁺ Exchanger in Sperm Motility. *Molecular reproduction and development*. 62:348–356.
- 79. World Health Organization.** 2021. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. WHO press sixth edit, 276.
- 80. Wickham H.** 2009. Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. 2nd Edition, Springer, New York.
- 81. Windler F, Bönigk W, Körschen HG, Grahn E, Strünker T, Seifert R & Kaupp UB.** 2018. The solute carrier SLC9C1 is a Na⁺/H⁺-exchanger gated by an S4-type voltage-sensor and cyclic-nucleotide binding. *Nature Communications*. 9 (1): 1–13.
- 82. Woo AL, James PF & Lingrel JB.** 2002. Roles of the Na, K-ATPase alpha4 isoform and the Na⁺/H⁺ exchanger in sperm motility. *Molecular Reproduction and Development*. 62: 348–356.
- 83. Yagi T., Minoura I., Fujiwara A., Saito R., Yasunaga T., Hirono M. y Kamiya R.** 2005. An Axonemal Dynein Particularly Important for Flagellar Movement at High Viscosity. *The journal of biological chemistry*. 280: 41412–41420.
- 84. Yang Y., Cochran DA., Gargano MD., King I., Samhat NK., Burger BP., Sabourin KR., Hou Y., Awata Y., Parry DA.D., Marshall WF., Witman GB. y Lu X.** 2011.

Regulation of flagellar motility by the conserved flagellar protein CG34110/Ccdc135/FAP50. *Molecular Biology of the Cell*. 22: 976-987.

- 85. Yeste M, Recuero S, Maside C, Salas-Huetos A, Bonet S & Pinart E.** 2021. Blocking NHE Channels Reduces the Ability of In Vitro Capacitated Mammalian Sperm to Respond to Progesterone Stimulus. *International Journal of Molecular Science*. 22: 12646.
- 86. Zeng Y, Clark EN & Florman HM.** 1995. Sperm membrane potential: Hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Developmental Biology* 171: 554–563.
- 87. Zeng y, Oberdorf JA. & Florman HM.** 1996. pH Regulation in Mouse Sperm: Identification of Na⁻, ClO⁻, and HCO₃⁻ Dependent and Arylamino benzoate-Dependent Regulatory Mechanisms and Characterization of Their Roles in Sperm Capacitation. *Developmental Biology* 173: 510–520.
- 88. Zeng H, Navarro B, Xia X, Clapham DE, Christopher J & Lingle CJ.** 2013. Simultaneous knockout of Slo3 and CatSper1 abolishes all alkalization- and voltage-activated current in mouse spermatozoa. *Journal of General Physiology*. 142 (3): 305–313.
- 89. Zhang Z, Yang Y, Wu H, Zhang H, Mao J, Liu D, Zhao L, Lin H, Tang W, Hong & Jiang H.** 2017. Sodium-hydrogen-exchanger expression in human sperm and its relationship with semen parameters. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*. 34: 795-801.

11. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

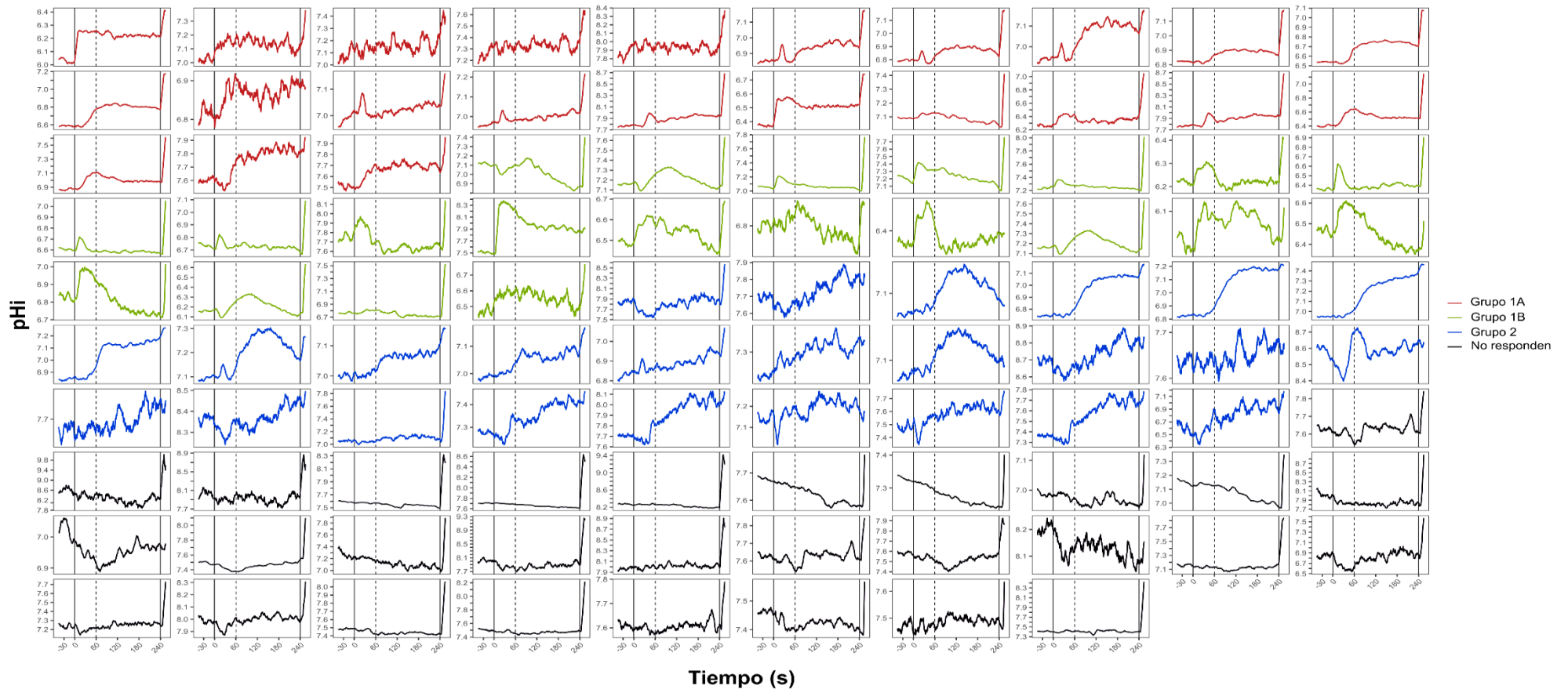


Figura Suplementaria 1. Respuestas individuales del pH_i de los flagelos del $sNHE^{+/+}$ después del estímulo de hiperpolarización del V_m . En el tiempo 0 del registro se adiciona 1 μM de valinomicina (primera línea). Después de los 240 s, se agregó NH_4Cl (segunda línea). Las células se clasificaron en grupos de 3 tipos: Grupo 1A, denominado "sostenido", Grupo 1B, denominado "transitorio", y Grupo 2, denominado "gradual". El número de células clasificadas en cada grupo: Group1A (23 células), Group1B (21 células), Group2 (25 células) y células que no responden (29 células). Estos resultados se obtuvieron analizándolos espermatozoides de 9 ratones $sNHE^{+/+}$



Especies tipo primate

Table with 4 columns of amino acid alignments for species including Homo sapiens, Aotus nancymae, Saimiri boliviensis, and Rhinopithecus roseilana. Positive charges are in red, negative charges in blue.

Especies tipo ratón

Table with 4 columns of amino acid alignments for species including Mus musculus, Sorcus arizonae, Dipodomys ordii, and Tupia chianensis. Positive charges are in red, negative charges in blue.

Figura Suplementaria 2. Alineamiento comparativo de los aminoácidos que componen a los segmentos del VSD de sNHE. Se muestran los 4 segmentos del VSD de 73 especies de mamíferos. Los aminoácidos con carga positiva (básicos) marcados con color azul y los aminoácidos con carga negativa (ácidos) en color rojo.

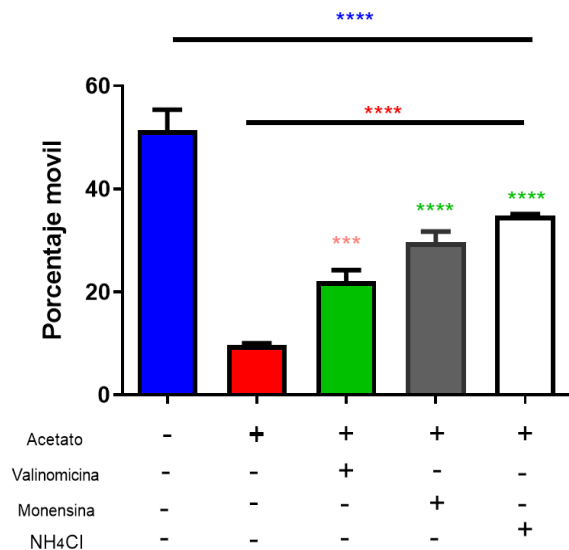
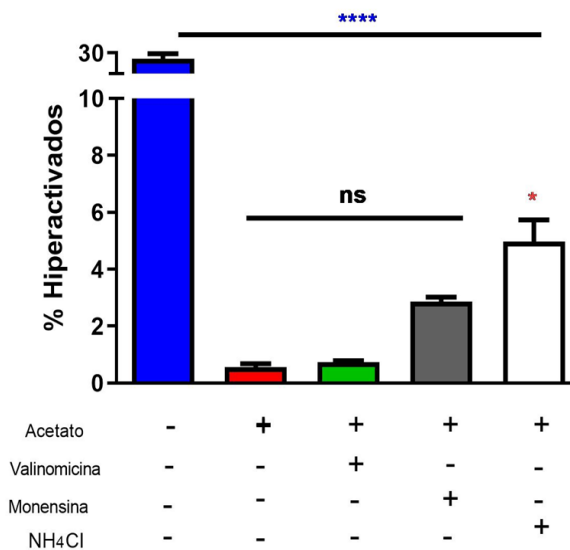
A**B**

Figura Suplementaria 3. La hiperpolarización del Vm rescata la movilidad de espermatozoides *sNHE*^{+/+}. (A) Porcentaje de espermatozoides móviles. Los espermatozoides fueron previamente acidificados con acetato de sodio (100 mM), lo cual redujo la tasa de espermatozoides móviles. La adición de 1 μ M de valinomicina, monensina y 10 mM NH₄Cl, rescato el porcentaje de espermatozoides móviles. (B) Porcentaje de espermatozoides hiperactivados después de la adición de los tratamientos. Solo los espermatozoides incubados con NH₄Cl incrementaron la tasa de hiperactividad. Los asteriscos indican diferencias estadísticas **** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.0004$, ** $p \leq 0.0003$, * $p \leq 0.0128$, de acuerdo con la prueba de una vía ANOVA, seguida de una prueba de Tukey. Las barras indican el error estándar de la media \pm SD. Las líneas negras indican los grupos que mostraron diferencias estadísticas. Se analizaron 3 ratones (100 células por ratón).

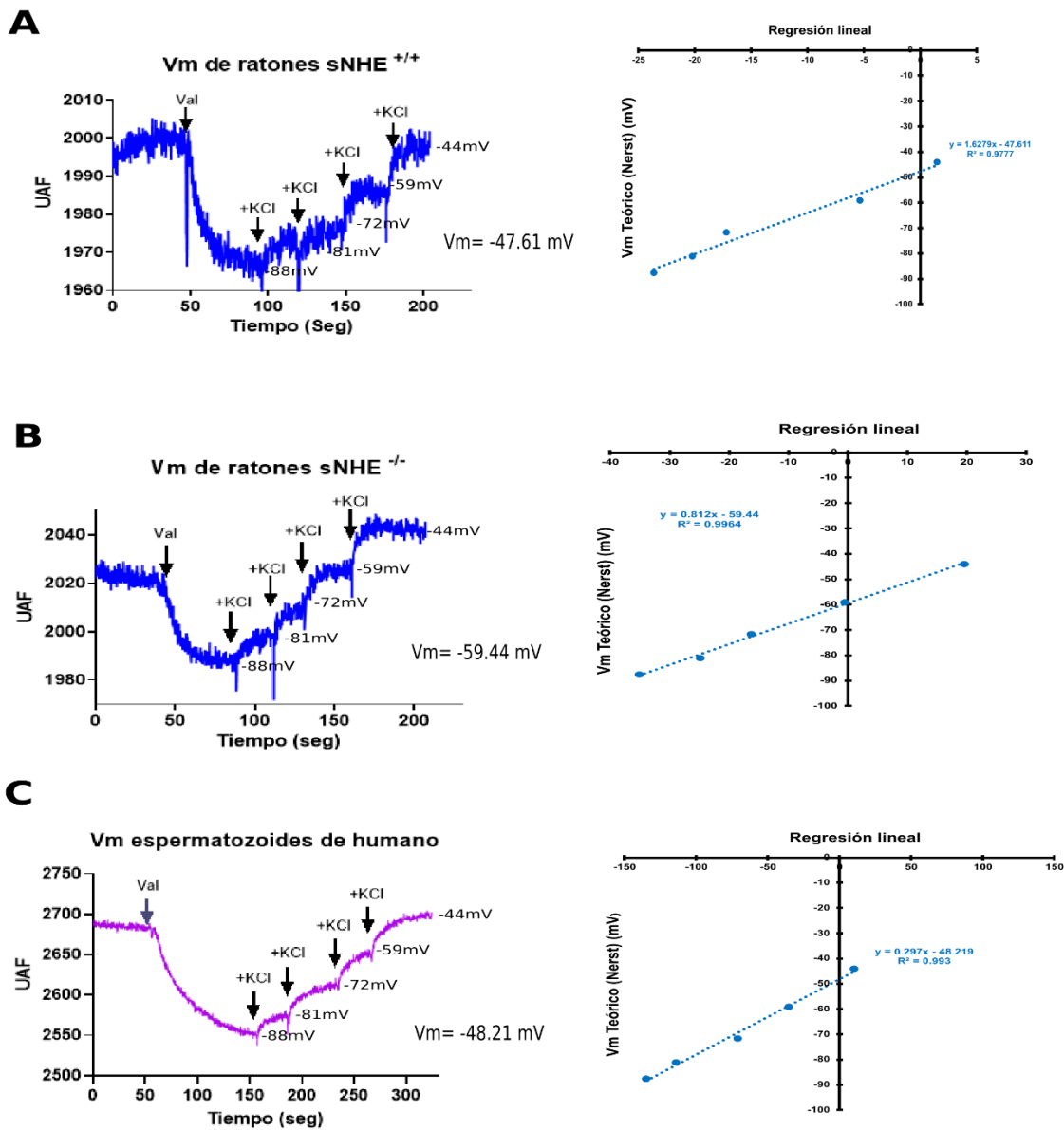


Figura Suplementaria 4. Determinación del potencial de membrana (V_m) en población de los espermatozoides de ratones sNHE +/+, sNHE -/- y humano. Evaluación del potencial del V_m de los espermatozoides de ratones (A) sNHE +/+, (B) sNHE -/- y (C) humano. El panel de la izquierda muestra un trazo representativo indicando las adiciones de valinomicina y KCl. El panel de la derecha indica el resultado del cálculo del potencial de V_m por cada valor experimental de fluorescencia usando la ecuación de Nerst. El potencial de reposo es resultado del valor de fluorescencia inicial que se interpola según la ecuación de la recta $y = mx + b$. Para este análisis se usaron 3 ratones por cada genotipo con un promedio de 10×10^6 células por evaluación y 3 donadores con un promedio de 12×10^6 células por cada evaluación.

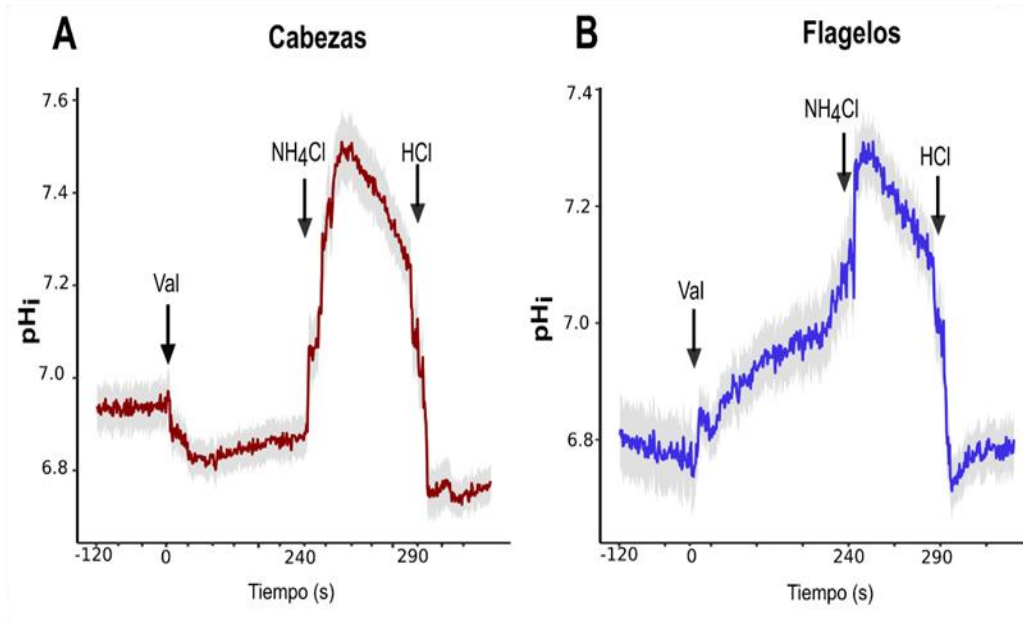


Figura Suplementaria 5. La hiperpolarización del V_m alcaliniza los flagelos de los espermatozoides capacitados de ratones sNHE^{+/+} a través de la actividad de sNHE. Se muestran los registros promedio del pH_i de la cabeza (A) y el flagelo (B) de los espermatozoides de ratones silvestres (sNHE^{+/+}) capacitados. Las flechas indicaron el momento de adición de: 1 μM de valinomicina (Val) y 20 mM de cloruro de amonio (NH₄Cl) y 3 mM de ácido clorhídrico (HCl). El sombreado gris de cada trazo representa el ± S.E.M de cada tratamiento. Estos resultados se obtuvieron de analizar 54 células de 5 ratones sNHE^{+/+}.