



**Cinvestav**  
Biología Celular

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

Caracterización bioquímica y fisiológica de las NADPH oxidasas presentes en el  
espermatozoide de cobayo

TESIS

Que presenta:

**M. en C. César Ismael Ortiz García**

para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA CELULAR**

Director de Tesis:

**Dr. Enrique Othón Hernández González**

Ciudad de México

Junio, 2023

# Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 51 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Bajo la Dirección del Dr. Enrique Othón Hernández González. Los sinodales del comité tutorial fueron: Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado, Dra. María Betzabet Quintanilla Vega, Dr. Ricardo Félix Grijalva y el Dr. José de Jesús Serrano Luna.

Durante la realización del presente trabajo, el M. en C. César Ismael Ortiz García estuvo becado por parte del Consejo Nacional de Ciencias y Humanidades (CONAHCYT) con el número de becario: 253910 y numero de beca de doctorado: 367954. Asimismo, se agradece el apoyo al presente trabajo mediante el proyecto CB-284183 otorgado al Dr. Enrique Othón Hernandez González.

También agradezco la valiosa ayuda a la Dra. Ana Lilia Roa Espitia, Auxiliar de Investigación. Por el apoyo técnico que me proporciono a lo largo del desarrollo del presente trabajo. Que incluye adiestramiento en el manejo de los animales de estudio y en el uso de las técnicas utilizadas durante mi estancia en el laboratorio.



# Contenido

Resumen	IV
Summary	V
I. Introducción	1
1.1. Características morfológicas y función del espermatozoide	1
1.2. El espermatozoide y el proceso de capacitación	2
1.3. La motilidad del espermatozoide durante la maduración y la capacitación	4
1.4. Reacción acrosomal	5
1.5. Especies reactivas del oxígeno	6
1.6. Las especies reactivas del oxígeno como moléculas de señalización celular	7
1.1. Las especies reactivas del oxígeno y la vía de las MAPK cinasas	9
1.2. Las especies reactivas del oxígeno y su papel durante la capacitación espermática	11
1.3. Sistemas antioxidantes presentes en los espermatozoides de Cobayo	12
1.4. Las NADPH Oxidasas producen especies reactivas del oxígeno de forma regulada	13
1.5. Relación de NOX y las proteasas dependientes de calcio, calpainas	15
1.6. El papel de Rac1 en la fisiología espermática	16
II. Justificación	19
III. Hipótesis	20
IV. Objetivos	21
V. Materiales y métodos	22
5.1. Análisis bioinformático	22
5.2. Animales de experimentación	22
5.3. Conteo de espermatozoides de Cobayo	22
5.4. Ensayo de capacitación de espermatozoides de cobayo	23
5.5. Evaluación del consumo de NADPH.	23
5.6. Cuantificación de la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> extracelular	23
5.7. Ensayos de capacitación en presencia del inhibidor de Rac1	24
5.8. Ensayos de capacitación en presencia del inhibidor de flavoproteínas DPI	25
5.9. Obtención de extractos proteínicos de espermatozoides	25
5.10. Western blot para la identificación de NOX2, NOX4	25
5.11. Western blot para la identificación de residuos fosforilados de tirosinas (P-Tyr)	26
5.12. Western blot para la identificación de proteínas	26

5.13.	Ensayo de clortetraciclina para definir patrones fisiológicos de los espermatozoides	27
5.14.	Análisis de la motilidad espermática	27
5.15.	Evaluación intracelular del calcio	28
5.16.	Ensayos de inmunofluorescencia	28
5.17.	Ensayo de coinmunoprecipitación	29
5.18.	Análisis estadístico	30
VI.	Resultados	31
6.1.	El cobayo presenta en su genoma a todos los integrantes de la familia de las NADPH oxidasas, excepto a NOX5	31
6.2.	Efecto de los inhibidores utilizados durante el desarrollo experimental sobre la viabilidad de los espermatozoides	32
6.4.	La producción de ERO se incrementa durante la capacitación y es inhibida por los antagonistas de las NOX	35
6.5.	NOX2 y NOX4 están presentes en espermatozoides de cobayo y ratón	36
6.8.	Las NOX regula el influjo de calcio durante la capacitación	39
6.9.	La actividad de NOX es necesaria para el desarrollo normal de la motilidad progresiva y total durante la capacitación	40
6.10.	NOX2 y NOX4 cambian su localización subcelular durante la capacitación	41
6.11.	NOX2 y NOX4 se encuentran asociadas y su disociación depende de la actividad de calpaina	42
6.12.	La producción de ERO depende de la disociación de NOX2 y NOX4	43
6.13.	La capacitación depende de la activación de calpaina	44
VII.	Discusión	46
VIII.	Conclusiones	53
IX.	Perspectivas	54
X.	Bibliografía	55
	Anexo I (Medios, soluciones y reactivos)	63
	Anexo II (Artículo)	67
		84

## Índice de Ilustraciones

Figura 1 Esquema de un espermatozoide de mamífero.....	2
Figura 2. Eventos moleculares tempranos y tardíos de la capacitación espermática.....	4
Figura 3. Reacción acrosomal .....	6
Figura 4. Fuentes biológicas de especies reactivas del oxígeno. ....	7
Figura 5. Los residuos de cisteína son susceptibles de modificaciones por peróxido de hidrogeno.....	9
Figura 6. Vía de las MAPK cinasas .....	10
Figura 7. Componentes de las NOX de células fagocíticas.....	14
Figura 8. Estructura general y dominios que determinan a la superfamilia de las calpaínas .....	16
Figura 9. Arquitectura de los dominios de las NOX de células fagocíticas.....	16
Figura 10. Rac1 está presente en espermatozoides de cobayo y se relocaliza durante la capacitación.....	18
Figura 11.Árbol filogenético de los miembros de la familia NOX .....	31
Figura 12. Mecanismos y efecto sobre la viabilidad de los inhibidores utilizados .....	33
Figura 13. Consumo de NADPH en extractos nativos totales de proteínas de espermatozoides de cobayo.....	35
Figura 14. Producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno durante el proceso de capacitación en espermatozoides de cobayo.....	36
Figura 15. Detección de las NOX: NOX2 y NOX4 en extractos totales de espermatozoides de cobayo .....	37
Figura 16. La inhibición de las NOX adelanta la presentación de la capacitación y la reacción acrosomal .....	38
Figura 17. Evaluación de la fosforilación de residuos de tirosina durante la capacitación .....	39
Figura 18. Detección de calcio intracelular mediante FURA-3 AM. ....	40
Figura 19. Motilidad progresiva y total.....	41
Figura 20. Localización subcelular de NOX2 y NOX4 en espermatozoides.....	42
Figura 21. NOX2 y NOX4 interactúan solamente en condiciones no capacitantes y en presencia del inhibidor de calpaína.....	43
Figura 22. La producción de ERO es inhibida en presencia de calpeptina .....	44
Figura 23. Evaluación de PYP totales .....	45
Figura 24. Modelo propuesto para la interacción de NOX2 y NOX4.....	52

# Resumen

Los espermatozoides obtenidos de los conductos deferentes de mamíferos son células altamente polarizadas, condensadas y especializadas incapaces de crecer o dividirse. La única función de estas células es fertilizar al óvulo. Una vez que el espermatozoide es depositado en el tracto reproductor femenino deben ocurrir dos procesos secuenciales de maduración, la capacitación y la reacción acrosomal. Se ha demostrado que la producción regulada de especies reactivas del oxígeno (ERO) es necesaria para una correcta capacitación. En espermatozoides de seres humanos se ha descrito la presencia de la NADPH oxidasa (NOX) NOX5, ortólogo de NOX2 de células fagocíticas, cuya actividad es regulada por calcio y que solo produce anión superóxido ( $O_2^-$ ). La actividad de NOX5 está relacionada con el desarrollo de la motilidad del flagelo en estas células. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el gen que codifica para NOX5 no se encuentra en los espermatozoides del grupo de los roedores. Por esta razón se desconocen los mecanismos de producción y los blancos moleculares que tienen las ERO durante la capacitación y la reacción acrosomal en espermatozoides de los roedores, entre ellos el cobayo. En espermatozoides de ratón y ratas se ha descrito a NOX2 y NOX3 respectivamente; las cuales son reguladas por Rac1 y cuya principal ERO es  $O_2^-$ . El objetivo del presente trabajo fue determinar si las ERO en espermatozoides de cobayo son producidas por uno o más integrantes de la familia de las NOX y conocer los mecanismos de regulación. Asimismo, se enfocó en conocer el papel fisiológico de las NOX sobre la regulación de la motilidad, la capacitación y la reacción acrosomal. Para esto se utilizaron cobayos macho de la raza Dunkin-Hartley (*Cavia porcellus*) con un peso medio de 800-900 g de donde se aislaron testículos, epidídimos y conductos deferentes, regiones de donde se obtuvieron por perfusión los espermatozoides. En este trabajo se detectaron en extractos espermáticos totales mediante Western blot a NOX2 y NOX4. Mediante microscopia confocal e inmunodetección estas NOX se detectaron en la región acrosomal en espermatozoides no capacitados. Mientras que durante la capacitación estas NOX migran a la región apical del acrosoma. Nuestros resultados mostraron mediante co-inmunoprecipitación que NOX2 y NOX4 se encuentran asociadas en espermatozoides no capacitados y durante la capacitación se disocian, esta disociación ocurre independientemente del uso de inhibidores de la producción de ERO (VAS2870, 40 $\mu$ M) El uso de inhibidores específicos de la actividad de las NOX tuvo efectos directos sobre marcadores específicos de la capacitación: Disminuyó la fosforilación de residuos de tirosina. La reacción acrosomal ocurrió a tiempos cortos de capacitación (10 min), asociado a un incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y evitó el desarrollo de la motilidad progresiva (<15 %) y total de los espermatozoides (<15 %) con respecto a espermatozoides capacitados, 70 y 50 %, respectivamente. En conclusión, se observó que la disociación del complejo NOX2/NOX4 está subordinada a la proteasa dependiente de  $Ca^{2+}$ , calpaína y que la pérdida dicha interacción durante la capacitación conlleva a la activación de estas NOX, incrementando la producción de ERO. La producción de ERO por NOX2 y NOX4 es esencial para mantener la homeostasis del espermatozoide durante la capacitación, la reacción acrosomal y la motilidad sucedan normalmente.

# Summary

Sperm obtained from the mammalian vas deferens are highly polarized, condensed, and specialized cells incapable of growing or dividing. The sole function of these cells is to fertilize the egg. Once the spermatozoa are deposited in the female reproductive tract, two sequential maturation processes must occur, capacitation and the acrosomal reaction. It has been shown that the regulated production of reactive oxygen species is necessary for proper capacitation. NADPH oxidase (NOX) NOX5, an ortholog of NOX2 of phagocytic cells, whose activity is regulated by calcium and which only produces superoxide anion ( $O_2^-$ ), has been described in human spermatozoa. NOX5 activity is linked to the development of flagellum motility in these cells. However, it must be taken into account that the gene that codes for NOX5 is not found in the spermatozoa of the rodent group. For this reason, the production mechanisms and molecular targets of ROS during capacitation and the acrosomal reaction in rodent sperm, including guinea pigs, are unknown. NOX2 and NOX3 have been described in mouse and rat spermatozoa, respectively; NOXs are regulated by Rac1 and whose main ERO is  $O_2^-$ . This work aimed to determine whether the ROS in guinea pig spermatozoa is produced by one or more members of the NOXs family and to know the regulation mechanisms. Likewise, he focused on knowing the physiological role of NOXs in regulating motility, capacitation, and the acrosomal reaction. NOX2 and NOX4 were detected in total sperm extracts, and it was possible to show that they are found in the acrosomal region in non-capacitated spermatozoa. During capacitation, these NOXs migrate to the apical region of the acrosome. The results suggest that NOX2 and NOX4 are associated with non-capacitated spermatozoa and dissociate during capacitation. The use of specific inhibitors of NOXs has direct effects on specific markers of capacitation; the phosphorylation of tyrosine residues decreases. Likewise, the acrosomal reaction occurs at short capacitation times (10 min) since the intracellular concentration of  $Ca^{2+}$  increases early. The inhibition of NOXs also prevents the development of progressive and total sperm motility. The NOX2/NOX4 complex dissociation is subordinated to the  $Ca^{2+}$ -dependent protease calpain. The loss of the interaction between NOX2 and NOX4 during capacitation leads to their activation and, therefore, to the increase in ROS production. The production of ROS by NOX2 and NOX4 is essential for sperm processes such as capacitation, acrosomal reaction, and motility to occur usually.

# I. Introducción

## 1.1. Características morfológicas y función del espermatozoide

El espermatozoide es una célula altamente polarizada, especializada y cuyo ADN se encuentra altamente condensada, esto debido a que funciones como el transporte y la transcripción están apagadas en estas células. Los cromosomas se encuentran asociados a las protaminas (proteínas pequeñas de 27-65 aminoácidos) ricas en arginina y cisteína lo que les da un carácter básico. Esta célula es incapaz de crecer o dividirse, y cuya única función es fertilizar al ovulo. En general los espermatozoides están compuestos por una cabeza que contiene el ADN haploide y un flagelo que provee la motilidad a la célula (Figura 1).

En la cabeza del espermatozoide se encuentran el núcleo y el acrosoma asociado a componentes del citoesqueleto y citoplasma. El acrosoma es un organelo generado a partir del complejo de Golgi y contiene las enzimas necesarias para que el espermatozoide hidrolice las capas del ovocito para poder fertilizarlo. Por otro lado, el flagelo del espermatozoide puede dividirse en cuatro segmentos: la pieza conectora o cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza final.

A lo largo del flagelo se encuentra el axonema, conformado por microtúbulos con un arreglo típico de 9+2. En la pieza media se encuentra la vaina mitocondrial, región enriquecida en mitocondrias. La vaina mitocondrial es la región donde mayoritariamente se lleva a cabo el metabolismo oxidativo. En la pieza principal se encuentra las vainas fibrosas asociadas al axonema y en la pieza final se encuentran solo el axonema y la membrana citoplasmática (Toshimori 2003).

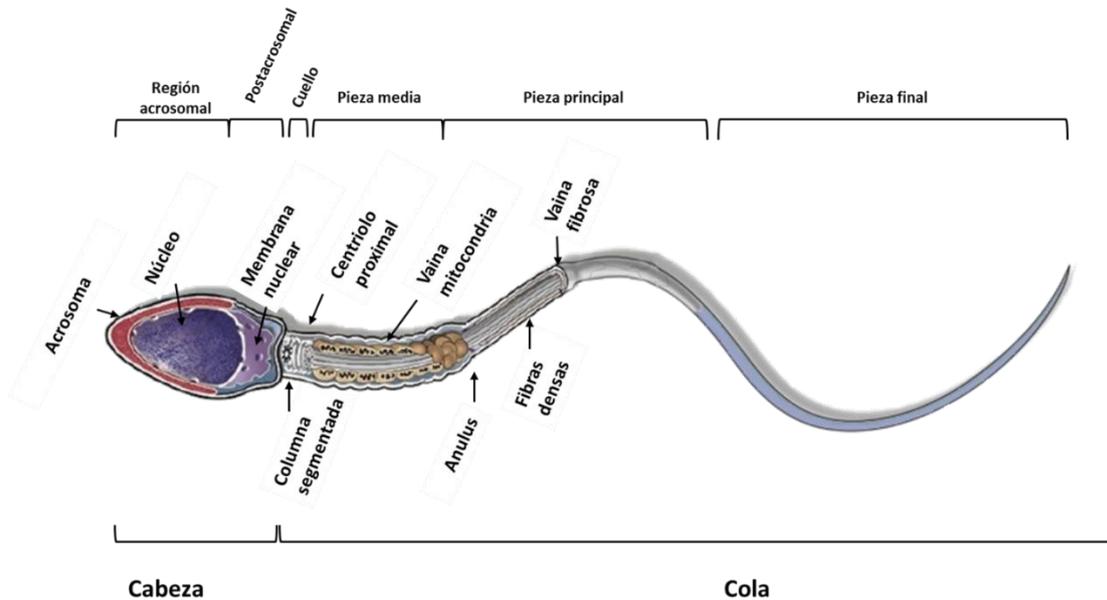


Figura 1 Esquema de un espermatozoide de mamífero. Se muestran los principales compartimentos y los organelos que lo conforman. Modificado de Armand Z. *et al.*, 2011.

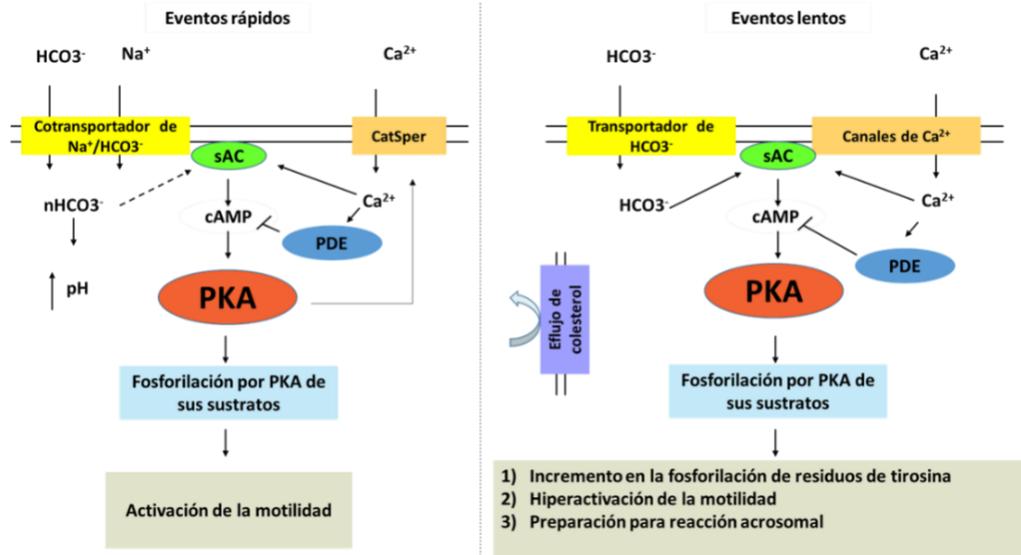
## 1.2.El espermatozoide y el proceso de capacitación

El espermatozoide es incapaz de fecundar al óvulo inmediatamente después de la eyaculación. Esta capacidad se adquiere una vez que es depositado en el tracto reproductivo femenino en donde es necesario que permanezca durante un periodo finito de tiempo que varía según la especie. Los procesos de maduración que ocurren se denominan capacitación y reacción acrosomal. Estos dos procesos incluyen cambios a nivel molecular y celular como son: incremento en el pH intracelular, la redistribución de los fosfolípidos de la membrana plasmática, la remoción del colesterol de la membrana plasmática y cambios en los patrones de motilidad. La capacitación finaliza con el inicio la reacción acrosomal (figura 2) (Visconti 2009, Stival, Puga Molina Ldel *et al.* 2016, Puga Molina, Luque *et al.* 2018). Actualmente es posible reproducir todos estos procesos fisiológicos *in vitro*, lo cual facilita y permite el uso del espermatozoide como modelo de estudio (Yanagimachi and Chang 1963).

Los eventos que ocurren durante el proceso de capacitación espermática se dividen en dos (Figura 2): los **eventos rápidos** y los **eventos lentos**. Los eventos rápidos implican los procesos que inician la capacitación, los cuales incluyen el incremento del pH intracelular debido al ingreso de  $\text{HCO}_3^-$  a la célula mediante difusión simple o mediante un cotransportador de  $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ . Dicho incremento se ha relacionado con

la activación de la vía  $\text{HCO}_3^-/\text{Adenilato Ciclasa soluble (sAC)/PKA}$  y con el incremento de la actividad de la enzima "scramblase". Se ha propuesto que el aumento de actividad enzimática de la "scramblase" causa el colapso de la distribución asimétrica de fosfolípidos, proceso conocido como "scrambling", que presentan los espermatozoides no capacitados. En espermatozoides no capacitados la asimetría de fosfolípidos se mantiene, principalmente, por la acción enzimática de la "flipase", la "floppase" y la "scramblase". La "flipase" es una enzima que intercambia fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (FE) de la capa externa de la membrana plasmática a la capa interna (Paffenholz, Bergstrom et al. 2004). Asimismo, la "floppase" es una enzima que intercambia fosfolípidos de forma inespecífica del interior al exterior y la "scramblase" enzima que intercambia fosfatidilcolina y esfingomielina además de FS y FE. En eritrocitos y linfocitos, el colapso de la distribución asimétrica de los fosfolípidos se ha relacionado con la apoptosis. Sin embargo, en espermatozoides el "scrambling" no se ha relacionado con dicho proceso. Se ha observado que el uso de inhibidores de fosfatasa potencia este proceso sugiriendo que el "scrambling" es controlado directa o indirectamente por fosforilación o desfosforilación (Gadella and Harrison 2002).

La segunda parte (**eventos lentos** de la capacitación espermática) involucra los sucesos que son consecuencia de la primera etapa de capacitación espermática e incluyen el cambio en la distribución del colesterol de la región acrosomal a la región apical y su posterior remoción de la membrana plasmática por la albumina y el aumento de la fosforilación de residuos de tirosina (PYP, por sus siglas en inglés: protein tyrosine phosphorylation). Como consecuencia de la activación de cinasas (p. ej. PKA) y en complementación con el incremento del pH intracelular se promueven la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estimula la motilidad del espermatozoide, proceso denominado hiperactivación, proceso que consiste en un aumento en el bateo del flagelo, así como el cambio del batido flagelar de simétrico a asimétrico (Mortimer 1997). Adicionalmente el  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario en la reacción acrosomal y fertilización del ovocito (Visconti, Westbrook et al. 2002, Visconti 2009).



**Figura 2. Eventos moleculares tempranos y tardíos de la capacitación espermática.** Al incubar espermatozoides en una solución de  $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$  (eventos rápidos) se observa un bateo vigoroso del flagelo, el cual a nivel molecular es dependiente de la actividad de PKA. En estos eventos el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  están mediados por un cotransportador de  $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$  y por el canal de calcio CatSper. Después de una incubación prolongada en medio de capacitación el espermatozoide adquiere la capacidad de fertilizar al ovocito. Esta capacidad es presidida por cambios en el patrón de motilidad del flagelo (hipermotilidad) y por la preparación del acrosoma para realizar la exocitosis durante la reacción acrosomal. A nivel molecular esto correlaciona con un aumento en la PYP. (Modificado de Visconti, 2009).

### 1.3. La motilidad del espermatozoide durante la maduración y la capacitación

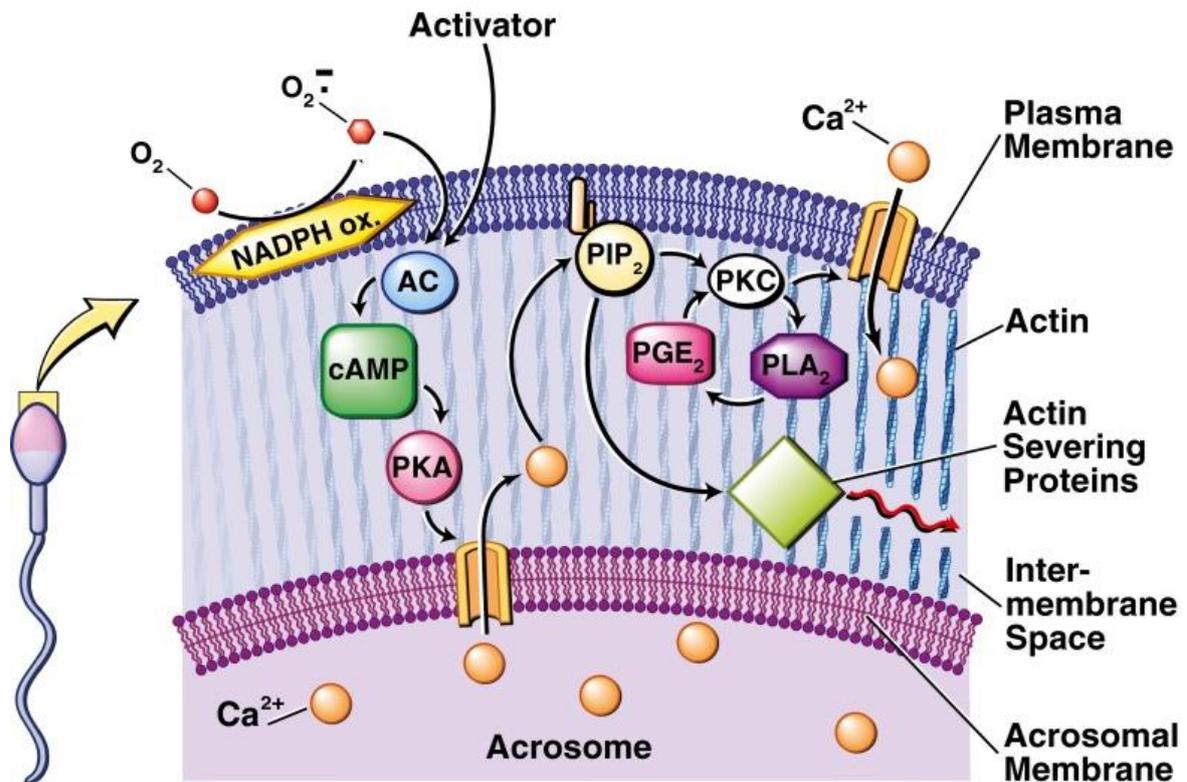
Los espermatozoides adquieren su motilidad en el epidídimo después de permanecer inmóviles durante su maduración en el testículo. Esta motilidad adquirida en el epidídimo se denomina progresiva (simétrica) y se caracteriza por tener una longitud de onda larga y una corta amplitud de onda lo que da como resultado un movimiento recto y progresivo. Una vez en el tracto reproductor femenino, los espermatozoides experimentan una hiperactivación (asimétrica) de la motilidad, un segundo tipo de motilidad también denominada hiperactivada. Este tipo de motilidad consiste en un aumento de la velocidad de bateo del flagelo y una disminución del desplazamiento progresivo debido a cambios en el patrón de bateo. Gracias a la hiperactivación, el espermatozoide es capaz tanto de desplazarse del istmo al ampulla en donde se encuentra el óvulo, como de atravesar las envolturas de este. Ambos tipos de motilidad (progresiva e hiperactivada) son esenciales para que el espermatozoide pueda recorrer el tracto reproductor femenino y fertilizar al óvulo (Suarez and Pacey 2006).

## 1.4.Reacción acrosomal

El acrosoma es un organelo derivado del aparato de Golgi que se desarrolla durante la espermatogénesis. En espermatozoides maduros este se encuentra en el ápice de la cabeza de los espermatozoides (Figura 1).

La reacción acrosomal es el último proceso de maduración bioquímica, en este punto se adquiere la capacidad de fertilizar al ovocito, por el que cursan los espermatozoides y consiste en la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana citoplasmática (Figura 3). Esta fusión da lugar a la exposición dominios de la membrana acrosomal interna del espermatozoide que son necesarios para degradar las capas que rodean el ovocito y que además permiten la fusión de los gametos. Los espermatozoides incapaces de llevar a cabo este proceso son incapaces de fertilizar ovocitos intactos. La reacción acrosomal es un proceso que depende de calcio, tanto de la liberación de este de los compartimentos intracelulares como del influjo de calcio extracelular (Brucker and Lipford 1995, Stival, Puga Molina Ldel et al. 2016).

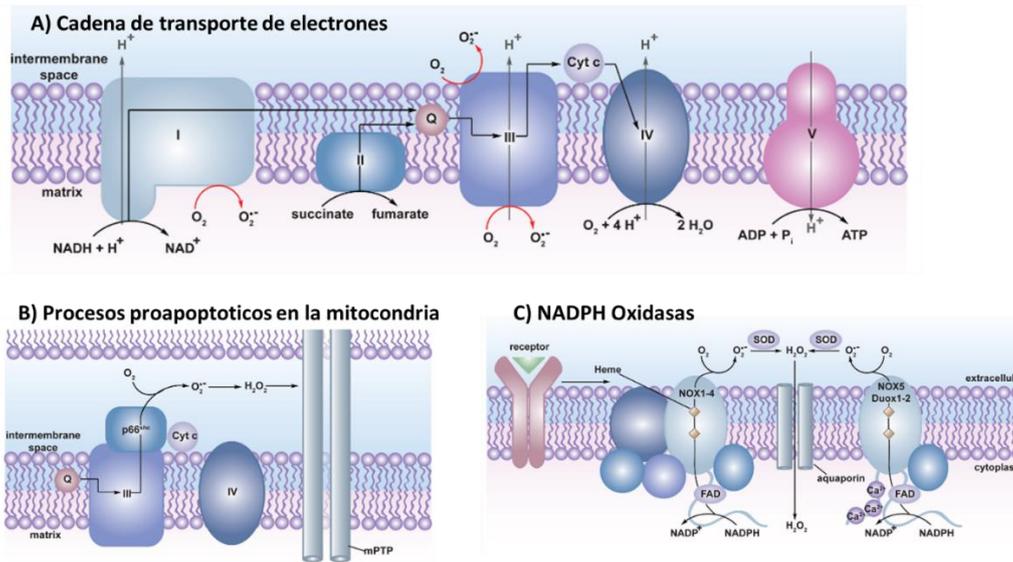
En cuanto a su regulación se ha descrito que la reacción acrosomal no se da en espermatozoides en los cuales se inhibe la activación de PKA, cinasa que es activada durante el proceso de capacitación. Adicionalmente la progesterona, la glicoproteína 3 (ZP3, proteína de la zona pelúcida) y también se ha descrito a las Especies reactivas del oxígeno como agentes que disparan este proceso de forma irreversible. Esto permite establecer la clasificación de activadores fisiológicos y no fisiológicos que activan la reacción acrosomal. Algunos estudios sugieren que la capacitación y la reacción acrosomal no son procesos independientes debido a que marcadores como cambios en el pH, así como en el influjo de calcio y el aumento de P-Tyr en ambos procesos coinciden. Pero, existen diferencias en la temporalidad de los eventos y los compartimentos en que las modificaciones se producen (Du Plessis, Agarwal et al. 2015).



**Figura 3. Reacción acrosomal.** Principales participantes en la reacción acrosomal y principales vías de señalización que permiten que la membrana citoplasmática y acrosomal externa se fusionen.

### 1.5. Especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son producidas durante procesos celulares como el metabolismo oxidativo mitocondrial, en respuesta a citosinas y en respuesta a invasión bacteriana en células fagocíticas, entre otros (Figura 4). Se ha propuesto que en condiciones fisiológicas la producción de ERO puede causar estrés oxidativo, que se refiere a un desequilibrio entre la cantidad de ERO producidas y la capacidad de la célula para montar una respuesta antioxidante. El estrés oxidativo produce daño molecular y se ha relacionado con patologías tales como arteriosclerosis, diabetes, cáncer, neurodegeneración y envejecimiento. Paradójicamente se ha demostrado que las ERO regulan vías de señalización y tienen participación en procesos celulares tales como proliferación y supervivencia a través de la regulación de vías de señalización como la de cinasas activadas por mitógenos (MAPK), en procesos proapoptóticos (Ray, Huang et al. 2012).



**Figura 4. Fuentes biológicas de especies reactivas del oxígeno.** **A)** Los electrones que no siguen el transporte canónico en la cadena de transporte de electrones pueden ser captados por el oxígeno molecular (fugas de electrones), estas fugas ocurren en los complejos I y III formando anión superóxido a ambos lados de la membrana interna mitocondrial. **B)** En el espacio intermembrana de la mitocondria se encuentra p66 (Shc), el cual en respuesta a radiación UV o falta de factores de crecimiento interactúa con el complejo III de la cadena de transporte de electrones y desvía electrones hacia oxígeno molecular y formar anión superóxido. **C)** La producción regulada de ERO por la familia de NADPH oxidasas que producen anión superóxido y peróxido de hidrogeno, el peróxido de hidrogeno es capaz de difundir por membranas o ser transportado al interior de la célula mediante acuaporinas. Modificado de Ray Huang, 2012.

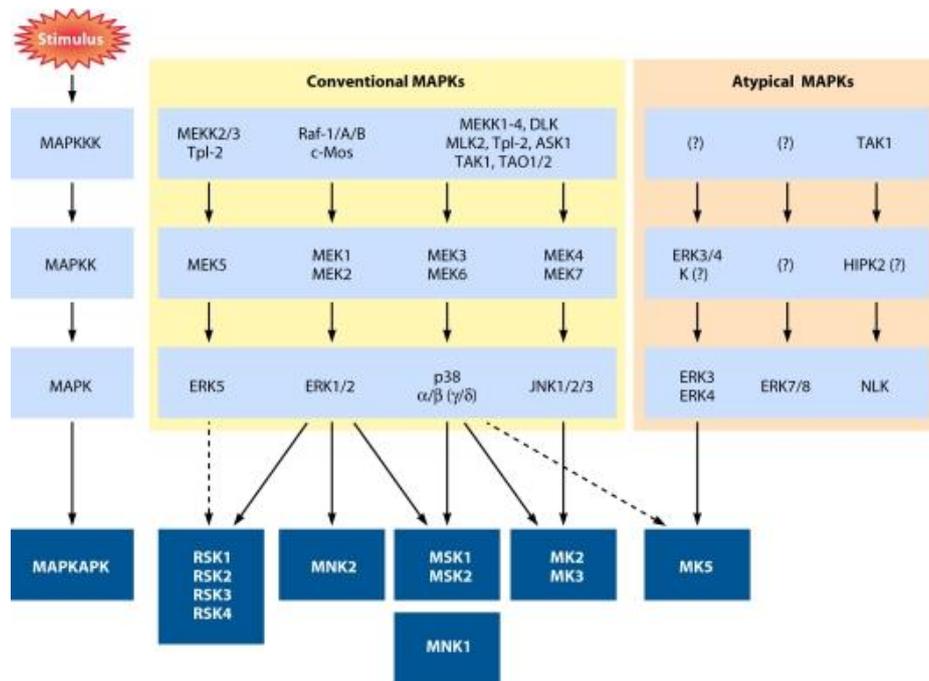
### 1.6. Las especies reactivas del oxígeno como moléculas de señalización celular

Las ERO incluyen a las especies químicas formadas a partir de la excitación o la reducción incompleta del oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ). Las ERO incluyen al oxígeno en singulete ( $^1\text{O}_2$ ), al radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\cdot}$ ), al anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), al peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y peróxidos orgánicos ( $\text{ROOH}$ ). En condiciones fisiológicas la célula mantiene un balance entre la generación y la eliminación de ERO gracias a los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que posee. Dentro de los sistemas antioxidantes enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa (el  $\text{O}_2^{\cdot -} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ ), la catalasa ( $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ) y las peroxidasas (degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante la oxidación de un co-sustrato), la enzima glutatión S-transferasa y las glutatión peroxidasas de selenio (Se-GPx). Dentro de los sistemas antioxidantes no enzimáticos se encuentra el glutatión (GSH), ácido úrico, fosfolípidos insaturados y las vitaminas C y E. Debido a las propiedades químicas intrínsecas de las ERO, éstas pueden interactuar de forma preferencial con moléculas biológicas. El radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\cdot}$ ),

con un tiempo de vida media de  $10^{-6}$  ms es altamente reactivo, lo cual limita sus efectos a los sitios en los que se produce. El anión superóxido ( $O_2^-$ ) el cual es producido durante la respiración celular y es producido de forma regulada por las NADPH oxidasas. Este presenta una alta afinidad por los grupos hierro-azufre ([Fe-S]), posee una difusión limitada a través de las membranas y no es capaz de reaccionar con grupos tiol (-SH) *in vivo*. Su carga negativa restringe a esta ERO a reaccionar en el compartimento celular donde es generada, no es permeable en las membranas biológicas (J.P. Kehrer 2010). Las concentraciones celulares reportadas son de aproximadamente  $10^{-11}$  M, lo que permite inferir que su tiempo de vida media en la célula es muy corto. Además, ya sea de forma espontánea o enzimática, rápidamente dismuta a  $H_2O_2$ , por estas razones se considera que esta ERO no tiene un papel importante como molécula señal en los procesos celulares. Por otro lado, el  $H_2O_2$  es menos reactivo que el  $O_2^-$ , tiene un tiempo de vida media de aproximado de 1 ms y una concentración aproximada de  $10^{-7}$  M. Se ha propuesto que esta ERO es permeable en las membranas y también que puede ser transportado del exterior de la célula al interior mediante acuaporinas específicas, actuando posiblemente como mensajero en procesos celulares (Bienert, Schjoerring et al. 2006, D'Autreaux and Toledano 2007, Winterbourn 2008, Vieceli Dalla Sega, Zambonin et al. 2014).

Para abordar la regulación de las vías de señalización mediada por ERO se deben conocer las modificaciones que causan las ERO en las proteínas susceptibles a regulación por oxido-reducción (redox). Este tipo de regulación se presenta en proteínas que contienen residuos de cisteína (Cys) susceptibles de óxido-reducción (Figura 5). La oxidación de estos residuos forma ácido sulfénico (R-SOH) el cual es reactivo y puede formar puentes disulfuro con Cys cercanas (R-S-S-R), oxidaciones adicionales en estos residuos producen ácido sulfínico (R-SO<sub>2</sub>H) o ácido sulfónico (R-SO<sub>3</sub>H). Exceptuando al ácido sulfónico y al ácido sulfínico las modificaciones son reversibles mediante la acción de sistemas antioxidantes tales como tioredoxinas y las peroxiredoxinas (Ray, Huang et al. 2012).





**Figura 6. Vía de las MAPK cinasas.** Se muestran los principales componentes de la vía de las MAPK, convencionales y no convencionales. Además, de los tres niveles de regulación de las vías: MAPKKK, MAPKK y MAPK (Cargnello and Roux 2011)

Algunos miembros de la vía de las MAPK cinasas se ha demostrado que se regulan por mecanismos RedOx. ASK1 es una MAPKKK cinasa que regula las vías de las MAPK cinasas JNK y p38. Se ha demostrado ASK1 en su forma reducida interactúa directamente con tioredoxinas lo cual inhibe directamente la actividad de cinasa y evita su oligomerización impidiendo así su activación. Por otro lado, ASK1 es activada cuando las ERO oxidan dos residuos de cisteína del centro redox de la tioredoxina lo que tiene como consecuencia la formación de un puente disulfuro, la disociación de la tioredoxina de ASK1 y la posterior activación de las vías JNK y p38, relacionadas tanto en apoptosis por estrés oxidativo (JNK) como en diferenciación celular (p38). Adicionalmente la cinasa dependiente de cGMP (PKG1 $\alpha$ ) es un sensor redox activado por ERO que en presencia de peróxido de hidrogeno forma un homodimero mediante puentes disulfuro intermoleculares regulando de esta forma la activación de la vía de las MAPK. Existen reportes de la regulación por ERO de las cinasas PKA y PKC mediante la formación de puentes disulfuro intramoleculares, estas cinasa también están implicadas en la señalización de las MAPK (Brennan, Bardswell et al. 2006, Giorgi, Agnoletto et al. 2010). La regulación de las MAPK cinasas no es solo a nivel de activación de proteínas cinasas, también existen mecanismos de regulación por

inhibición por oxidaciones reversibles de fosfatasas. La familia de fosfatasas de tirosina son las mayormente estudiadas y se ha demostrado que en el sitio activo de estas fosfatasas se encuentran cisteínas susceptibles de una oxidación reversible, dando como resultado la inactivación de estas proteínas. En células somáticas tanto el estado oxido/reducción de la célula como la producción de ERO estimulada por ligando pueden causar la oxidación de los integrantes de la familia de fosfatasas de tirosina (FFTy) *in vivo* (Ostman, Frijhoff et al. 2011, Ray, Huang et al. 2012).

### **1.2.Las especies reactivas del oxígeno y su papel durante la capacitación espermática**

Como se mencionó previamente, la PYP es un fenómeno tardío de la capacitación, el cual es dependiente de la vía cAMP/PKA, y que se ha relacionado con el desarrollo de la motilidad y con la capacitación de los espermatozoides (de Lamirande and O'Flaherty 2008). Se ha propuesto que la producción de ERO ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) de manera directa, activa el sistema de cinasas e inactiva a las fosfatasas de tirosina, estos cambios son responsables del incremento en PYP a de las proteínas, proceso característico de la capacitación en los espermatozoides de mamíferos (Lewis and Aitken 2001).

Las ERO en espermatozoides de mamíferos se han relacionado con procesos fisiológicos como: el aumento de la concentración de cAMP intracelular, la activación de las cinasas de tirosina y la inhibición de fosfatasas de tirosina (Ford 2004). Recientemente, se ha demostrado la presencia de las fosfatasas PTPRB y PTPN11, integrantes de las FFTyr, reguladas por oxido-reducción en la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo, caballo y perro. Mediante ensayos con ortovanadato, un inhibidor de las FFTyr, se observó que el espermatozoide pierde la motilidad y esta se restaura cuando el inhibidor es retirado del medio sin afectar la viabilidad de las células (Gonzalez-Fernandez, Ortega-Ferrusola et al. 2009).

Hasta el momento no se ha descrito ningún modelo para los espermatozoides de roedores, los cuales carecen del gen que codifica para NOX5, que explique la producción fisiológica de ERO y la presencia de ortólogos de las NOX. La PYP podría

ser el blanco en el que las ERO ejercerían su efecto, reflejándose directamente en el desarrollo de la motilidad, la capacitación y la pérdida del acrosoma.

Por otro lado, en espermatozoides de humano y equino se ha demostrado la presencia de NOX5 (Sabeur and Ball 2007, Musset, Clark et al. 2012), una NADPH oxidasa regulada por  $Ca^{2+}$ , donde la principal ERO producida es el  $O_2^-$ . El gen que codifica para la proteína NOX5 no se encuentra en el genoma de roedores (Bedard, Jaquet et al. 2012), pero si se han descrito ortólogos de las NOX en espermatozoides de roedores: en ratón a NOX2 (Shukla, Jha et al. 2005), en rata a NOX3 (Baker, Hetherington et al. 2008).

### **1.3.Sistemas antioxidantes presentes en los espermatozoides de Cobayo**

Fisiológicamente las células somáticas están expuestas a los efectos deletéreos de las ERO, la cuales se pueden provenir del metabolismo o fuentes externas a la célula. como medida de protección estas cuentan con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos capaces de evitar un estado de estrés oxidante. Estos sistemas pueden ser constitutivos o inducidos. Por otro lado, los espermatozoides morfológicamente maduros, localizados en el epidídimo, pierden la mayor cantidad de enzimas antioxidantes al eliminar su citoplasma en una vesícula denominada "droplet". Este proceso coincide con el inicio de la motilidad progresiva (Bauche, Fouchard et al. 1994, Tramer, Rocco et al. 1998).

En espermatozoides de cobayo las enzimas antioxidantes con mayor actividad catalítica son: las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y catalasa. La SOD espermática posee el doble de actividad enzimática comparada con la SOD hepática para la misma cantidad de proteína total. Asimismo, las actividades de GPx, GR y catalasa son 60, 5 y 300 veces menor respectivamente a los datos reportados para estas enzimas en extractos totales de hígado de cobayo (Bauche, Fouchard et al. 1994). Adicionalmente, se sabe que el espermatozoide tiene una concentración de GSH de  $35 \text{ pmoles}/10^6$  células.

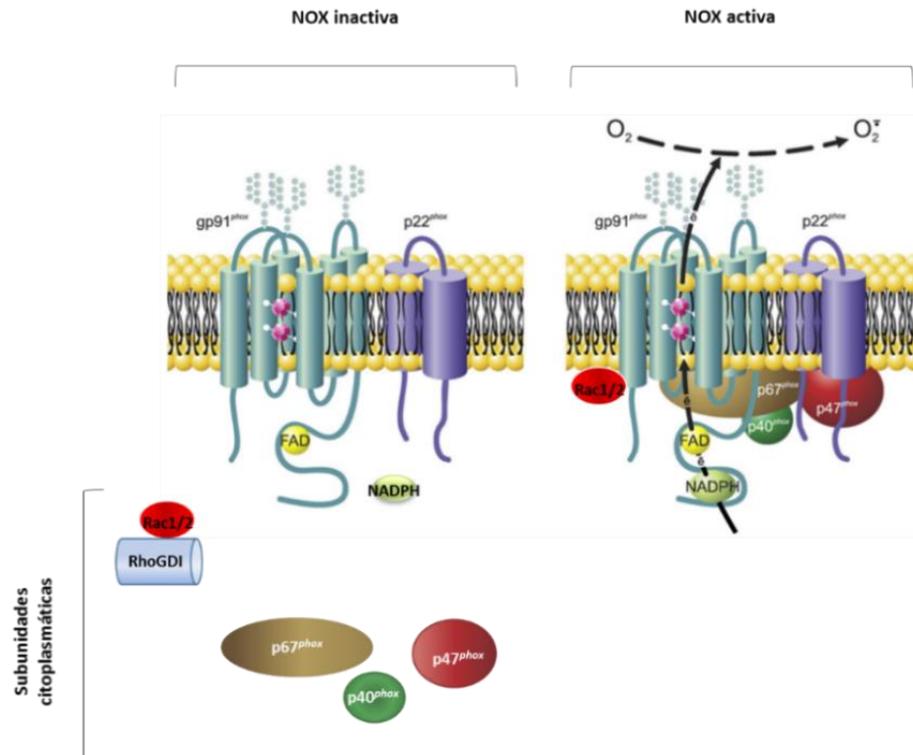
El espermatozoide también presenta la enzima selenio peroxidasa PHGPx que se encuentra en la cabeza y en la pieza media del espermatozoide la cual se ha relacionado con funciones antioxidantes y estructurales en la cabeza del

espermatozoide. La enzima selenio peroxidasa PHGPx utiliza los grupos tiol (-SH), de las protamínas, como sustrato promoviendo el entrecruzamiento de estas proteínas, permitiendo una mayor condensación de la cromatina del espermatozoide, evitando así el daño del DNA por las ERO. En la pieza media la PHGPx se encuentra asociada a la vaina mitocondrial y se ha propuesto que participa en la formación de puentes de disulfuro junto con las proteínas *sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein* (SMCP), cumpliendo una función estructural en esta región del espermatozoide, aunque no se descarta la interacción con otras proteínas en los procesos de señalización celular (Bauche, Fouchard et al. 1994, Tramer, Rocco et al. 1998).

#### **1.4.Las NADPH Oxidasas producen especies reactivas del oxígeno de forma regulada**

Las NADPH oxidasas (NOX) son enzimas asociadas a membranas que catalizan la producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) mediante la transferencia de electrones del NADPH al  $O_2$  o de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ). El complejo NOX de células fagocíticas está compuesta por varias subunidades (Figura 7), la subunidad catalítica denominada flavocitocromo *b<sub>558</sub>* que se encuentra localizada en la membrana plasmática y a su vez compuesta por las subunidades gp91<sup>phox</sup> (NOX2) y p22<sup>phox</sup>, y las proteínas reguladoras citosólicas p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> y la GTPasa Rac1 (Diebold and Bokoch 2001, Lambeth 2004).

Las NOX se encuentran presentes en organismos eucariontes desde amibas, hongos y plantas hasta mamíferos superiores. En seres humanos se han descrito 7 proteínas homologas a gp91<sup>phox</sup> (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, Duox1 y Duox2) y en ratones 6 (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, Duox1 y Duox2) y se pueden clasificar en dos grandes clases las NOX dependientes de p22<sup>phox</sup> (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4) y las NOX reguladas por  $Ca^{2+}$  (NOX5, Duox1, and Duox2).



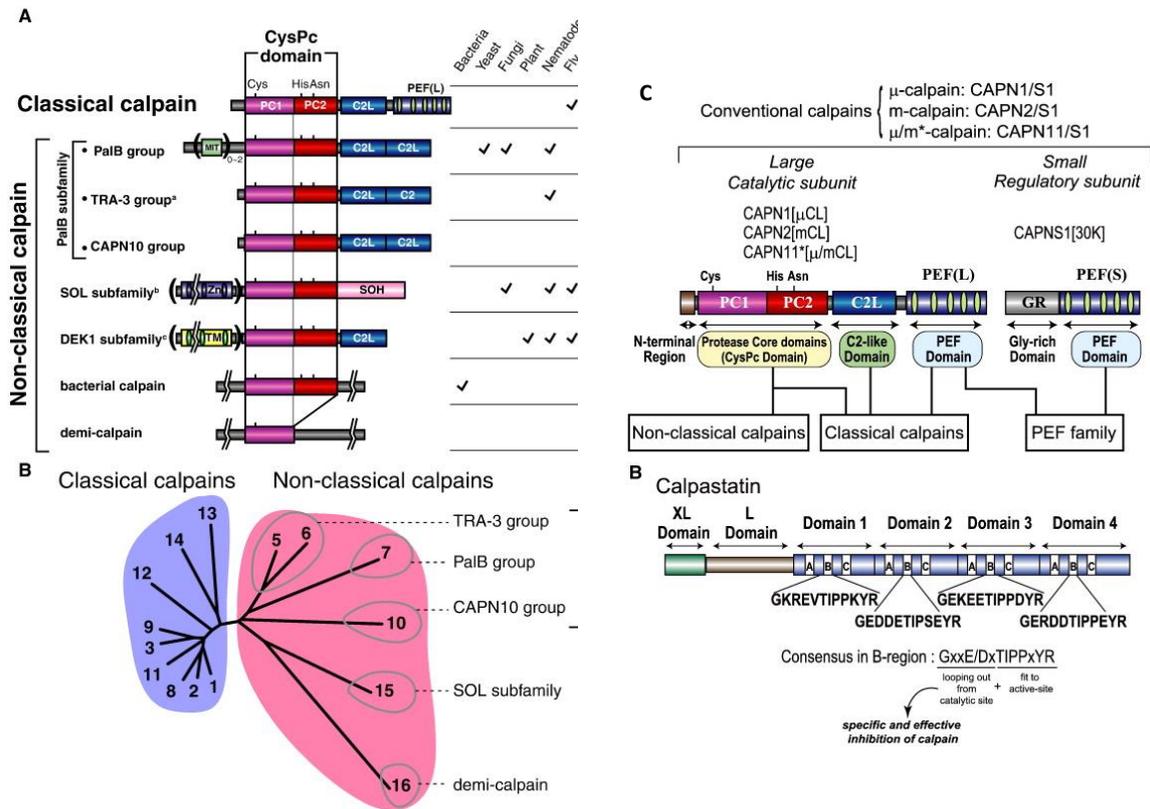
**Figura 7. Componentes de las NOX de células fagocíticas.** En reposo gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> se localizan en la membrana y las subunidades p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> y la GTPasa Rac se localizan en el citoplasma. La activación de las NOX implica el reclutamiento e interacción de las subunidades citoplasmáticas con el citocromo b<sub>558</sub>. Modificado de W.M. Nauseef, 2014.

Estas proteínas se expresan en diversos tejidos y su función es importante en procesos fisiológicos y patológicos (Aguirre and Lambeth 2010). En fagocitos NOX2 es responsable de la explosión oxidativa, lo que la relaciona directamente con la inmunidad innata. En ratones se ha observado que la producción de ERO en el oído interno (órgano de Corti y ganglio espiral) es 50 veces mayor que en otros tejidos donde se localiza esta proteína (riñón, cerebro y cráneo), ratones *knockout* del gen *NOX3* no desarrollan la otoconia ni los otolitos (agregados de calcio localizados dentro de la otoconia). La otoconia participa en la ubicación espacial de los individuos. Esto sugiere la participación de *NOX3* la diferenciación celular de este órgano (Banfi, Malgrange et al. 2004, Paffenholz, Bergstrom et al. 2004).

### **1.5.Relación de NOX y las proteasas dependientes de calcio, calpains**

La super familia de las calpaínas es un grupo de proteasas intracelulares cuya activación depende de la presencia de calcio. Pertenecen a la familia de las cistein-proteasas, estas se encuentran distribuidas en casi todos los eucariontes. Una de sus clasificaciones toma como base los dominios que poseen y se clasifican en calpaínas convencionales y no convencionales (Figura 7). En seres humanos se ha propuesto que la calpaína está involucrada en la fertilización del ovocito por parte del espermatozoide (Rojas and Moretti-Rojas 2000, Ono and Sorimachi 2012). Adicionalmente, la actividad de las calpaínas ha sido ampliamente estudiada en cardiomiocitos y se han relacionado con la inducción de la apoptosis en esta estirpe celular. La producción de ERO ha sido relacionada con la activación de esta familia de proteínas y se ha sugerido que las ERO producidas por las NOX son responsables de la activación y translocación de esta proteasa al núcleo, con la posterior inducción de la apoptosis (Chang, Sheng et al. 2015). En contraposición a estos estudios también se tiene evidencia de que es la calpaína la que activa a las NOX, mediante la vía de las MAPK cinasas (Liang, Li et al. 2020).

Cabe destacar que entre los efectores de las NOX y las calpaínas se encuentra la proteína Rac1, la cual se ha relacionado con la activación tanto de las NOX y de las calpaínas. En la bibliografía se reportan diferentes mecanismos en relación con los mecanismos de activación de calpaína por las NOX (Shan, Li et al. 2010).

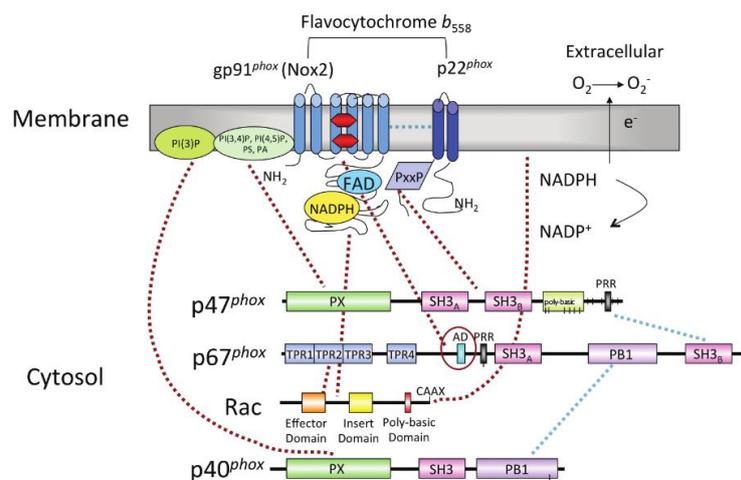


**Figura 8. Estructura general y dominios que determinan a la superfamilia de las calpaínas.** A) Se muestran los dominios de Cistein proteasas. B) Árbol filogenético de las calpaínas humanas. El árbol se ha trazado mediante el método del vecino más cercano. Cada homólogo de calpaína está representado por un número, es decir, 1, CAPN1; 2, CAPN2; etc. Se observa que las calpaínas clásicas y las calpaínas no clásicas se forman en dos grupos y que las calpaínas no clásicas tienden a divergir entre sí, como se detecta por la longitud desde los puntos de ramificación. C) Estructuras esquemáticas de los miembros de la superfamilia de las calpaínas. A. Las calpaínas convencionales se componen de subunidades catalíticas y pequeñas subunidades reguladoras. Las estructuras de dominio se definen según el texto. Se indican las estructuras clave para la subclasificación de las moléculas relacionadas con la calpaína. N, región N-terminal; PC1/PC2, dominios del núcleo de la proteasa 1/2; C2L, dominio similar a C2; PEF(L/S), dominio penta EF-hand en la subunidad grande(L)/pequeña(S); GR, dominio rico en glúcidos.

## 1.6.El papel de Rac1 en la fisiología espermática

Rac1 es una proteína G pequeña que pertenece a la familia Rho. Esta familia está formada por proteínas monoméricas de un peso de 20 a 40 kDa que unen GTP. Estas proteínas funcionan como reguladores de múltiples vías de señalización. Por ejemplo, algunos miembros de estas GTPasas juegan papeles fundamentales en la reorganización del citoesqueleto y la producción de superóxido. En los seres humanos Rac presenta 3 isoformas Rac1, Rac2 y Rac3 (Rac1/2/3) que se expresan de forma ubicua y existen en dos conformaciones: una inactiva, unida a GDP y otra activa, unida a GTP. El paso del estado activo al estado inactivo ocurre vía factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), mientras que las proteínas que promueven la actividad intrínseca de GTPasa de Rac (GAP) la inactivan mediante la hidrólisis de GTP a GDP. Otro punto de regulación de Rac es el mediado por los inhibidores de disociación de guanina (GDI) los cuales reconocen un motivo de geranil-geranilación que permite que Rac1 interactúe con las membranas. Los GDI regulan la interacción de Rac1 con las membranas pero permiten que Rac1 interactúe con proteínas citoplasmáticas (Diebold and Bokoch 2001).

La interacción de Rac1 con NOX1, NOX2 y NOX3 (figura 9) es esencial para la producción de ERO mientras que la interacción de NOX4, NOX5, Duox1 y Duox2 esta interacción no es necesaria para la producción de ERO (Ueyama, Geiszt et al. 2006, Aguirre and Lambeth 2010, Nunes, Demaurex et al. 2013).



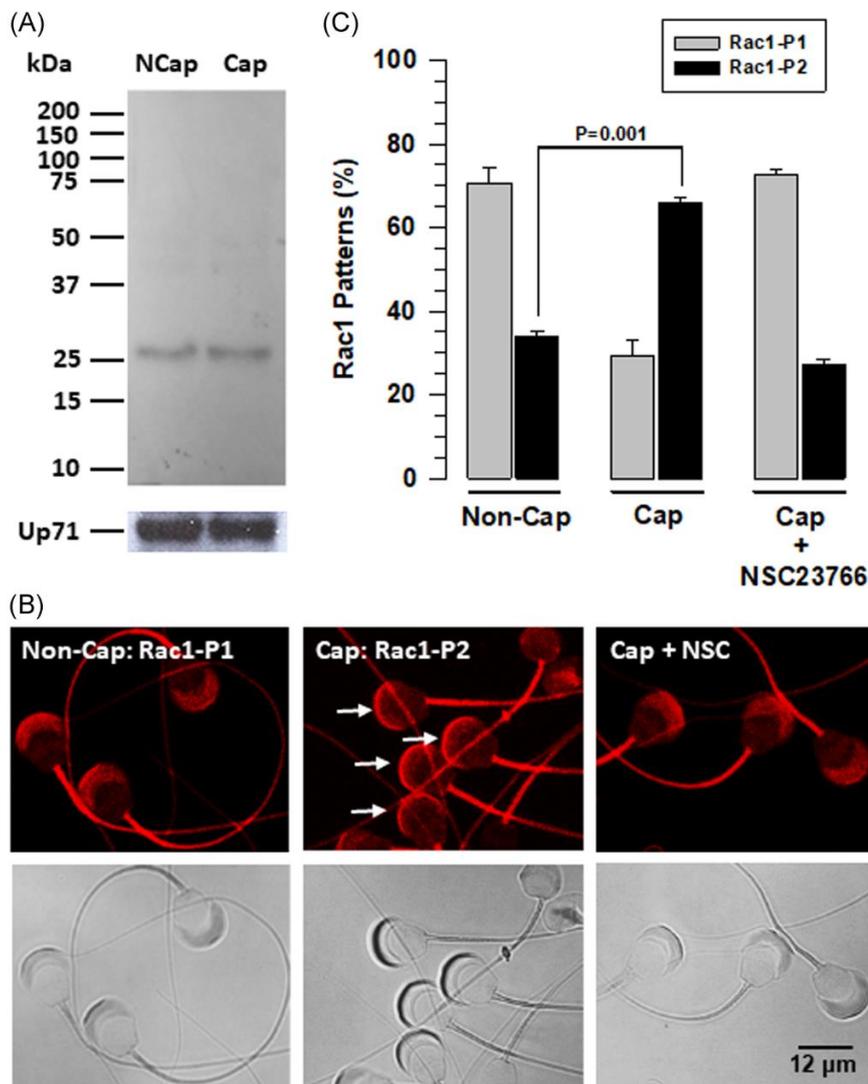
**Figura 9. Arquitectura de los dominios de las NOX de células fagocíticas.** Se muestran los dominios en los que Rac1 interactúa con p67<sup>phox</sup> y con gp91<sup>phox</sup> del complejo NADPH oxidasa (Nunes, Demaurex et al. 2013)

En nuestro grupo se identificó a un ortólogo de Rac1 del ser humano en el espermatozoide de cobayo, mediante una búsqueda usando la herramienta del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) pblast se encontró que el cobayo, presenta una proteína con un 91% de identidad con la proteína Rac1 de seres humanos (número de acceso XP\_0050037699) Con base en estos resultados se utilizó un anticuerpo policlonal para detectar la proteína por Western blot y por inmunofluorescencia indirecta. Adicionalmente se realizaron ensayos de inhibición de Rac1 con NSC23766 (inhibidor específico de Rac1). En el Western blot se detectó una banda con una migración relativa de 28 kD, para Rac1 de seres humanos se reporta un peso de 25 kD. Mediante la inmunofluorescencia, Rac1 fue localizada en la región acrosomal y en el flagelo de los espermatozoides de cobayo (Figura 10). La inhibición de Rac1 (NSC23766 100 $\mu$ M) durante la capacitación produjo dos importantes efectos sobre los espermatozoides:

1) Inmovilización y alteración de la morfología del flagelo, el cual muestra una fuerte e inusual curvatura (Figura 9); 2) la polimerización de actina en la región apical del acrosoma que se da durante la capacitación no sucedió y como consecuencia la reacción acrosomal se vio afectada; y 3) la inhibición de Rac1 no afecta la polimerización de actina en el flagelo. Los datos sugieren la posible participación de Rac1 en la reacción acrosomal y motilidad; en el primero a través de la polimerización de actina en la región apical del acrosoma y en el caso de la motilidad, mediante de un mecanismo que altera la morfología del flagelo (Ramirez-Ramirez, Salgado-Lucio et al. 2020)

Además, se ha demostrado que en espermatozoides de cobayo se encuentran Arp2/3, WASP y WAVE, proteínas responsables de la organización del citoesqueleto de actina (Delgado-Buenrostro, Hernandez-Gonzalez et al. 2005). En células somáticas se ha sugerido que el citoesqueleto de actina interactúa de forma directa con el citoesqueleto de septinas, proteínas relacionadas con la formación septos y barreras de difusión. Las septinas a su vez han sido propuestas como proteínas que proporcionan la estructura mecánica que organiza al citoesqueleto de actina. Cabe mencionar además que todas las septinas presentan un dominio central que consiste

de una región polibásica que se une directamente a fosfoinosítidos en la membrana plasmática (Zhang, Kong et al. 1999, Mostowy and Cossart 2012).



**Figura 10. Rac1 está presente en espermatozoides de cobayo y se relocaliza durante la capacitación**  
**A)** mediante Western blot se detectó Rac1 en extractos totales de espermatozoides de cobayo. La utrofina de 71 kDa (Up71) se utilizó como indicador de carga. **B)** Patrones de fluorescencia de espermatozoides capacitados en ausencia o presencia del inhibidor específico de Rac1 NSC23766 (100 μM) y teñidos con el anticuerpo anti-Rac1. Los paneles superiores muestran la localización de Rac1. Los paneles inferiores muestran el campo brillante. Estas imágenes representan tres experimentos independientes. **C,** El gráfico muestra la cuantificación de los patrones de tinción para Rac1. Media ± SEM, n = 3 experimentos independientes. Se contaron 300 espermatozoides por experimento. Cap: capacitado; NCap: no capacitado; Non-Cap, no capacitado; NSC, NSC23766; Rac1, proteína C3 sustrato 1 de la toxina botulínica relacionada con Ras; Rac1-P1, patrón de tinción 1 para Rac1; Rac1-P2, patrón de tinción 2 para Rac1.

## II. Justificación

La producción de ERO en los espermatozoides de los mamíferos ha sido involucrada en la regulación del proceso de capacitación, especialmente con la fosforilación de proteínas en los residuos de tirosina, evento que es esencial para la maduración bioquímica de los espermatozoides de mamíferos que permite fertilizar al ovocito. Aunque se sabe de la presencia de NOX5 en espermatozoides del ser humano y equino, esta proteína no está presente en el genoma de los roedores, pero se han descrito a NOX2 y NOX3 en espermatozoides de ratón (*mus musculus*) y rata (*rattus norvegicus*). En espermatozoides de cobayo (*Cavia porcellus*) se desconoce cuáles son las proteínas encargadas de la producción de ERO. La presencia de Rac1 en los espermatozoides de cobayo sugiere la posibilidad de que alguna NOX regulada por esta proteína Rho sea la encargada de la regulación de la producción de ERO en los espermatozoides. Por otro lado, aunque la producción de ERO ha sido involucrada en la capacitación a través de activar las vías de señalización que llevan a la fosforilación de proteínas en tirosina (PKA/TK) y que este proceso es muy importante para la activación de la motilidad progresiva, se desconoce si las ERO participan en la regulación de la motilidad espermática. Es posible que las ERO regulen la motilidad de dos formas: la primera a través de activar la vía PKA/TK y la segunda posibilidad, que no excluye a la primera, es mediante la regulación del citoesqueleto de septinas, el cual podría estar involucrado en mantener la estabilidad del annulus y posiblemente de la pieza media.

### III. Hipótesis

Debido a la ausencia del gen codificante para NOX5 en el grupo de los roedores y a la relación que existe entre las NOX reguladas por proteínas citoplasmáticas, incluidos la GTPasa pequeña Rac1 y que en los espermatozoides de cobayo la producción de ERO es importante en los dos procesos fisiológicos terminales del espermatozoide. Entonces la producción de las ERO podrían ser producidas por un integrante diferente de la familia de las NOX y cuya activación requiera de la activación de Rac1 y eliminar la producción fisiológica de ERO permitiría conocer los mecanismos que regulan las ERO, mediante la evaluación de la PYP, el desarrollo de la motilidad y la reacción acrosomal.

Dicho esto, en el presente proyecto se proponen el siguiente objetivo general y objetivos particulares:

## IV. Objetivos

### Objetivo general

Determinar si las especies reactivas del oxígeno en espermatozoides de cobayo son producidas por las NADPH oxidasas, definir el papel fisiológico de las NADPH oxidasas sobre la regulación de la motilidad, la capacitación y la reacción acrosomal y proponer un posible mecanismo de regulación de las NADPH oxidasas durante la capacitación.

### Objetivos particulares

- Determinar cuál o cuáles NADPH oxidasas están presentes en los espermatozoides de cobayo y si ellas son responsables de la producción de especies reactivas de oxígeno durante la capacitación.
- Definir los efectos de las NADPH oxidasas presentes en los espermatozoides del cobayo sobre los procesos fisiológicos de los espermatozoides: capacitación, motilidad y reacción acrosomal.
- Investigar la participación de Rac1 en la activación de NADPH oxidasas.
- Determinar el papel de NADPH oxidasas en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ .

# V. Materiales y métodos

## 5.1. Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático se utilizaron los siguientes genomas reportados en el NCBI: *Mus musculus* (taxid:10090), *Rattus norvegicus* (taxid:10116), *Cavia porcellus* (taxid:10141), *Equus caballus* (taxid:9796), *Ovis aries* (taxid:9940). Se tomó como referencia la secuencia de los ortólogos reportados para *homo sapiens*:

**NOX1:** gi|148536873|ref|NP\_008983.2| NADPH oxidase 1 isoform 1

**NOX2:** gi|6996021|ref|NP\_000388.2| cytochrome b-245 heavy chain

**NOX3:** gi|11136626|ref|NP\_056533.1| NADPH oxidase 3

**NOX4:** gi|8393843|ref|NP\_058627.1| NADPH oxidase 4 isoform a

**NOX5:** gi|11245490|gb|AAG33638.1|AF317889\_1 NOX5

**Duox1:** gi|74719102|sp|Q9NRD9.1|DUOX1\_HUMAN RecName: Full=Dual oxidase 1

**Duox2:** gi|296434485|sp|Q9NRD8.2|DUOX2\_HUMAN RecName: Full=Dual oxidase 2.

## 5.2. Animales de experimentación

Se utilizaron cobayos macho Dunkin-Hartley (*Cavia porcellus*) con un peso medio de 800-900 g para aislar los testículos, epidídimos y conductos deferentes. Los animales de experimentación fueron manejados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y los protocolos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Cinvestav-IPN (CICUAL No. 321-02), siguiendo los lineamientos de la Medical Association Guidelines (MAG).

## 5.3. Conteo de espermatozoides de Cobayo

Una vez obtenidos los espermatozoides se realizó un conteo espermático, para esto se tomaron 25  $\mu$ L de la muestra se obtuvo y 475  $\mu$ L de PBS-Tritón X100 al 0.1%, de esta manera obtenemos una dilución 1:20 de la muestra original, de esta dilución se tomarán 10  $\mu$ L y se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo celular. El resultado de la cuenta fue multiplicado por  $1 \times 10^6$  para obtener el número

de espermatozoides presentes en los 2 mL de muestra obtenidos de la perfusión. Una vez conocido el número de espermatozoides por muestra se realizará los cálculos necesarios para ajustar el recuento celular y ajustar el volumen para obtener una concentración de  $3.5 \times 10^7$  células/mL de regulador de fosfatos (PBS, pH 7,4) o en medio mínimo capacitante suplementado con piruvato sódico y ácido láctico (MCM-PL (NaCl 105,8 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25,1 mM, ácido láctico 20 mM, piruvato sódico 0,25 mM y HEPES 2,5 mM, pH 7,8))

#### **5.4. Ensayo de capacitación de espermatozoides de cobayo**

Las células se ajustaron  $3.5 \times 10^7$  células/mL y se incubaron a 37 °C durante y hasta la capacitación. Se utilizó un MCM-PL para inducir la capacitación. En condiciones no capacitantes, la suspensión celular ( $3.5 \times 10^7$  células/mL) se incubó en MCM-PL sin CaCl<sub>2</sub> ni NaHCO<sub>3</sub> a 37

#### **5.5. Evaluación del consumo de NADPH.**

El consumo de NADPH (18 nM) se evaluó mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 10 min. Se utilizaron extractos nativos totales obtenidos de espermatozoides en condiciones capacitantes con o sin inhibidores específicos de las NOX. La disminución de la absorbancia se midió a 340 nm durante 10 min, y la diferencia entre la absorbancia inicial y final fueron utilizadas para calcular la actividad enzimática (mol/min/mg-proteína) (Andrade-Pavon, Cuevas-Hernandez et al. 2017).

#### **5.6. Cuantificación de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular**

Para cuantificar la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por los espermatozoides de cobayo durante la capacitación se utilizará Amplex Ultra Red®, AUR (Nunes, Demareux et al.) un compuesto que reacciona de forma equimolar con el peróxido de hidrogeno en presencia de un exceso de peroxidasa de rábano (HRP) para formar resorufina un compuesto fluorescente cuya emisión se detecta entre 530-590 nm. Debido a que la HRP es una proteína incapaz de difundir a través de membranas biológicas esta prueba solo permite determinar la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se encuentra en el medio extracelular.

La cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por los espermatozoides a una concentración de  $3.5 \times 10^7$  espermatozoides/mL se realizó utilizando AUR. Para 1 mL de medio de capacitación (MCM-PL o MT) o 1 mL de solución salina (154 mM) se agregó 5 µL de

una solución 10 mM de AUR y 10  $\mu\text{L}$  de una solución de 10 mU/ $\mu\text{L}$  de HRP para obtener una concentración final de 50  $\mu\text{M}$  de AUR y 0.1 mM de HRP. Por cada 100  $\mu\text{L}$  de muestra se adicionarán 20  $\mu\text{L}$  del *Stop Solution Reagen*<sup>®</sup> las muestras se colocarán a 25 °C durante 10 min y se realizarán las lecturas de absorbancia a 540 nm.

Para conocer la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se realizará una curva tipo en la que se conocerá la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1, 2, 3, 4, 5, 10  $\mu\text{M}$ ). La cuantificación de ERO se realizará mediante un ensayo de fluorescencia en un lector de placas de 96 pozos (Bio-Rad modelo 550 microplate reader) a una longitud de onda de 540 nm. En este ensayo la concentración de resorufina es directamente proporcional a la concentración de peróxido de hidrogeno presente en el sistema, el volumen de muestra para este ensayo es de 100  $\mu\text{L}$ .

### **5.7. Ensayos de capacitación en presencia del inhibidor de Rac1**

En los ensayos de inhibición de Rac1 se utilizará el compuesto NSC23766 a una concentración de 0.1 mM. Este inhibidor es permeable en membranas biológicas y su mecanismo de acción consiste en impedir la interacción de Rac1 con los GEF TrioN y Tiam1 esto evita el intercambio de GDP/GTP, paso necesario para la activación de Rac1. Este inhibidor no tiene efecto sobre las GTPasas Cdc42 y Rho, por lo que permite el estudio de procesos en los que Rac1 es esencial.

La concentración de espermatozoides utilizada por ensayo será de  $3.5 \times 10^7$  espermatozoides/mL. El volumen total de la muestra obtenida se dividió en tres tratamientos (espermatozoides no capacitados, capacitados y capacitados + inhibidor), cada tratamiento tendrá una concentración de 50 mM de AUR y 0.1 mU de HRP. Una vez dividida la muestra, cada hora se tomaron alícuotas de 300  $\mu\text{L}$  que fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 2 min para obtener un paquete celular, del sobrenadante se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  y se colocaron en placas de 96 pozos. Ya en el pozo se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de *Stop Solution Reagen*<sup>®</sup> para detener la reacción.

### **5.8. Ensayos de capacitación en presencia del inhibidor de flavoproteínas DPI**

En los ensayos de inhibición de flavoproteínas se utilizó el inhibidor difeniliodonio (DPI) a una concentración de 10  $\mu$ M. Este inhibidor captura los electrones liberados. El número de células utilizadas por ensayo fue de  $3.5 \times 10^7$  espermatozoides/mL. De cada uno de los tratamientos se tomaron muestras cada hora y fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 2 min, del sobrenadante se tomaron 100  $\mu$ L que se colocaron en placas de 96 pozos, también se adicionaron 20  $\mu$ L de solución de paro, para evitar que el AUR siga reaccionando.

### **5.9. Obtención de extractos proteínicos de espermatozoides**

Espermatozoides no capacitados y capacitados fueron centrifugados a 3,000 rpm por 3 min y se les colocó en amortiguador de lisis para proteínas fosforiladas (ver anexo) por 20 min a 4 °C. Pasado el tiempo se centrifugaron a 14,000 rpm por 30 min y se recuperó el sobrenadante, se cuantificó el contenido de proteínas mediante el método de Bradford y después se hicieron alícuotas, mismas que fueron conservadas a -70 °C hasta su uso.

### **5.10. Western blot para la identificación de NOX2, NOX4**

Se obtuvieron espermatozoides del conducto deferente, se lavaron en solución de NaCl 154 mM y se capacitaron. Las muestras se centrifugaron (5000 g) durante 3 min y se suspendieron en tampón RIPA (25 mM TRIS HCl 25 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, NP-40 1%, desoxicolato sódico 1%, SDS 0,1%), suplementado con inhibidores de proteasas (5 mg/mL de inhibidor de tripsina de soja, 100 mg/mL de benzamidina, 30 mg/mL de pepstatina A, 30 mg/mL de leupeptina, 30 mg/mL de aprotinina, 1 mM de PMSF diluido en dimetilsulfóxido, 20 mg/mL de yodoacetamida, 1 mM de ortovanadato sódico, 10 mM de fluoruro sódico, 10% de glicerol y 2,5% de inhibidor de proteasas completo, Mini, sin EDTA. completo, sin EDTA [1 comprimido diluido en 1 ml de H<sub>2</sub>O]). A continuación, las muestras fueron incubadas durante 20 min en hielo y se centrifugaron a 20,000 g durante 20 min a 4 °C. Se recolectaron los sobrenadantes y se determinó su concentración de proteínas. Para reducir los enlaces disulfuro de proteínas, alícuotas de sobrenadante se hirvieron durante 5 min en tampón Laemmli 3X (720 mM TRIS-base, 6% SDS (p/v), 30% glicerol, 2-mercaptoetanol y 0,03% azul de bromofenol (p/v), pH 10). A continuación, las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-acrilamida). Poliacrilamida (SDS-PAGE) en geles

no gradientes de poliacrilamida al 10%, posteriormente las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche descremada al 5% en tritón X-100 (pH 7.4).

### **5.11. Western blot para la identificación de residuos fosforilados de tirosinas (P-Tyr)**

Primeramente, se analizaron 500 g de extracto de proteína espermática total en geles de SDS-PAGE. geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante la noche a 4 °C. Las membranas se lavaron una vez con PBS-Tween 20 (0,1%) y se bloquearon con leche en polvo desgrasada al 5% en PBSTween 20 (0,1%) durante dos horas a temperatura ambiente con agitación constante. Las membranas se incubaron con una dilución 1:500 de antifosfotirosina (*Cell Signaling*, APY03, (Danvers, MA, EE. UU.) diluido en PBS-Tween 20 (0,1%) y se incubaron durante toda la noche a 4.5 °C. con agitación constante, seguido de tres lavados con PBS-Tween 20 (concentración final del 0,1%). El anticuerpo secundario de ratón IgG conjugado con HRP (Jackson Labs, 115-035-068) se diluyó 1:10.000 en PBS añadido con leche descremada (concentración final al 3%) y se incubó con las membranas durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas fueron lavadas tres veces en PBS durante 10 min cada una. Para la detección de NOX4 y NOX2 mediante SDS-PAGE, se cargaron 300 g de extracto de proteína espermática y las proteínas se separaron y transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

### **5.12. Western blot para la identificación de proteínas**

Se realizó en las mismas condiciones utilizadas para la detección de fosfotirosina. Los anticuerpos utilizados fueron anti-NOX2/gp91<sup>phox</sup> (EPR6991) (Abcam, ab129068) para la detección de NOX2 y anticuerpo anti-NADPH oxidasa 4 (UOTR1B492) (Abcam, ab109225, Cambridge, Reino Unido) para la detección de NOX4. En ambos ensayos, las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia, que se desarrolló con el reactivo *Amersham Biosciences ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* y se visualizaron en un Odyssey en un Odyssey<sup>®</sup>Fc Imaging System de LI-COR Biosciences, o mediante el uso de placas de Rayos X (Omat X). El análisis densitométrico se realizó utilizando el software ImageJ

### **5.13. Ensayo de clortetraciclina para definir patrones fisiológicos de los espermatozoides**

La solución de tinción se preparó disolviendo 250 mM de clortetraciclina (CTC)-HCl en tampón TN (20 mM Tris, 130 mM NaCl y 5 mM cisteína a pH 7.8). Se preparó diariamente una reserva fresca de CTC. En el momento del ensayo, se tomó 20  $\mu$ L de espermatozoides no capacitados y capacitados incubados en la presencia o ausencia de VAS2879 (Poner concentración final), se mezclaron con 20  $\mu$ L de solución madre de CTC precalentada y se incubaron durante 20 s en un baño de agua a 37 °C. Inmediatamente después de la incubación, la suspensión de CTC y espermatozoides se fijó añadiendo 3.5  $\mu$ L de glutaraldehído al 12,5% en Tris 1,25 M (pH 7.5), mezclando completamente por inversión. Las muestras fijadas se mantuvieron en una cámara oscura durante 1-4 h. Después de la fijación se prepararon las laminillas y se examinaron al microscopio de fluorescencia (Ex330-380/Em420 nm). Todas las imágenes se obtuvieron con el microscopio de Olympus BX500. En cada muestra se contabilizaron 100 espermatozoides. que expresan uno de los tres patrones de tinción de CTC.

**Patrón F**, una tenue fluorescencia en la región acrosomal, característica de las células no capacitadas.

**Patrón B**, una fluorescencia brillante en la región acrosomal con una banda a lo largo del segmento ecuatorial, que es típica de las células capacitadas, acrosomas intactos.

**Patrón AR**, una fluorescencia en el segmento ecuatorial y/o en la región post-acrosomal, característico de las células fisiológicamente capacitadas. La presencia o ausencia del acrosoma en cada célula se verificó mediante iluminación de contraste de fase (Ver figura 16.A).

### **5.14. Análisis de la motilidad espermática**

Se capacitaron espermatozoides de cobayo durante 60 min en ausencia o presencia de VAS2870 (40  $\mu$ M). Durante la incubación, se utilizaron alícuotas para valorar la motilidad espermática, y los parámetros cuantitativos fueron registrados en un instrumento CASA (TOX IVOS, software versión 12.3: Hamilton Thorne Bioscience, Beverly, MA, EE. UU.) usando una cámara de recuento de muestras, con platina

precalentada a 37°C (MicroCell 20 Micron). La motilidad espermática se registró a 60 fotogramas/s (fps) durante un segundo; Se analizaron la distribución de la velocidad y otros parámetros cinemáticos de la motilidad (VAP, VSL, VCL, ALH, y BCF). Los experimentos se realizaron por triplicado.

### **5.15. Evaluación intracelular del calcio**

Los espermatozoides se capacitaron durante 15, 30, 60 y 90 min en ausencia o presencia de VAS2870 (40 M), y a continuación se capacitaron espermatozoides (alícuotas de  $3.5 \times 10^7$  células/mL) se cargaron con 2  $\mu$ L de la sonda intracelular para de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fluo-3-pentaacetoximetil éster, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) resuspendido en dimetilsulfóxido (DMSO, 1 mM). Los ensayos se prepararon a una concentración final de 2 M de Fluo-3AM durante 15 min a 37°C en MCM-PL. Las células se lavaron por centrifugación a 5000 g con MCM-PL. Después del tratamiento, los cambios en la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) se registraron como relaciones de fondo de sustrato de la longitud de onda de excitación correspondiente (Ex490/Em520 nm). El  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  fue evaluado durante 200 s de forma continua, con o sin inhibidores farmacológicos. La fluorescencia se registró en un espectrómetro de fluorescencia LS-55 (Perkin Elmer, Waltham MA, EE. UU.).

### **5.16. Ensayos de inmunofluorescencia**

Los espermatozoides capacitados o no capacitados, tratados o no con calpeptina, se fijaron en formaldehído (concentración final de 1,5%) en PBS. Después de una hora, se recogieron los espermatozoides por centrifugación. Los espermatozoides precipitados (600 g durante 3 min) se incubaron en 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 10 min, se enjuagaron dos veces con PBS y, a continuación, con agua bidestilada. Se prepararon con esta suspensión, se secaron al aire a temperatura ambiente durante la noche y se almacenaron a 4 °C. Los espermatozoides se permeabilizaron en acetona durante 7 min a 20 °C y se lavaron con PBS. El anticuerpo NOX2 o NOX4 (1:100) se diluyó en PBS adicionado con 1% de BSA (solución de bloqueo) y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con PBS y se incubaron durante dos horas a 37 °C con el anticuerpo secundario conjugado con TRITC diluido en solución de bloqueo. Las muestras se montaron utilizando Gelvatol, los cubreobjetos fueron sellados usando barniz de uñas

y una vez sellados se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se realizaron las observaciones. Las células teñidas se visualizaron con un microscopio confocal de barrido láser (Leica TCS SP8, Wetzlar, Alemania) y se analizaron utilizando el software de obtención de imágenes LAS AF Lite (versión 2.6.3).

### **5.17. Ensayo de coimmunoprecipitación**

Los experimentos de coimmunoprecipitación se realizaron utilizando el *Crosslink Immunoprecipitation Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, EE.UU, catálogo, 26147). Este método consiste en capturar 20  $\mu\text{g}$  de anticuerpo en resina de agarosa con cuentas de proteína A/G e inmovilizarlo covalentemente en el soporte mediante reticulación con 2.5 mM de suberato de disuccinimidilo (DSS). A continuación, la resina de anticuerpos se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 12 h con 500  $\mu\text{g}$  de extracto proteico de espermatozoides de cobayo previamente depurados, lo que permitió la formación del complejo anticuerpo-antígeno. Las proteínas unidas a los anticuerpos respectivos se eluyeron y se recuperaron por centrifugación a una velocidad baja. Durante el procedimiento sólo se eluyó el antígeno, lo que permitió identificarlo y analizarlo con una interferencia mínima de los fragmentos de anticuerpos. Para la reducción de puentes disulfuro proteico, se hirvieron alícuotas del sobrenadante durante 5 min en solución de Laemmli 3X (pH 10) que contenía 2-mercaptoetanol, y las proteínas se separaron por SDS-PAGE.

A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para su inmunodetección. Las proteínas recuperadas se analizaron por WB utilizando los anticuerpos adecuados. El control negativo se realizó asociando 20  $\mu\text{g}$  de una IgG no relacionada con NOX2 o NOX4 con las perlas de agarosa-proteína A/G. Las microesferas se incubaron con 500  $\mu\text{g}$  de extracto proteico de esperma de la misma forma en que se hizo anteriormente. El WB realizado con el anticuerpo anti-NOX2 no mostró la presencia de esta proteína, ni de otra.

Utilizando el algoritmo p-blast de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y las secuencias de las isoformas de la familia NOX reportadas para *Homom sapiens*, se realizó la búsqueda de ortólogos en el genoma de cobayo

## **5.18. Análisis estadístico**

Los datos se expresan como la media y error estándar (E.S). Las medias se compararon mediante ANOVA de una vía o en algunos casos de dos vías, según procediera. Se empleó SigmaPlot 14 para realizar el análisis estadístico. Se consideró significancia estadística entre las muestras cuando  $p < 0.05$ .



**NOX1:** gi|348570420|ref|XP\_003470995.1| PREDICTED: NADPH oxidase 1 isoform X1.

**NOX2:** gi|348567272|ref|XP\_003469424.1| PREDICTED: cytochrome b-245 heavy chain.

**NOX3:** gi|514458574|ref|XP\_003468542.2| PREDICTED: NADPH oxidase 3.

**NOX4:** gi|348565667|ref|XP\_003468624.1| PREDICTED: NADPH oxidase 4.

**NOX5:** No reportado en la base de datos del NCBI.

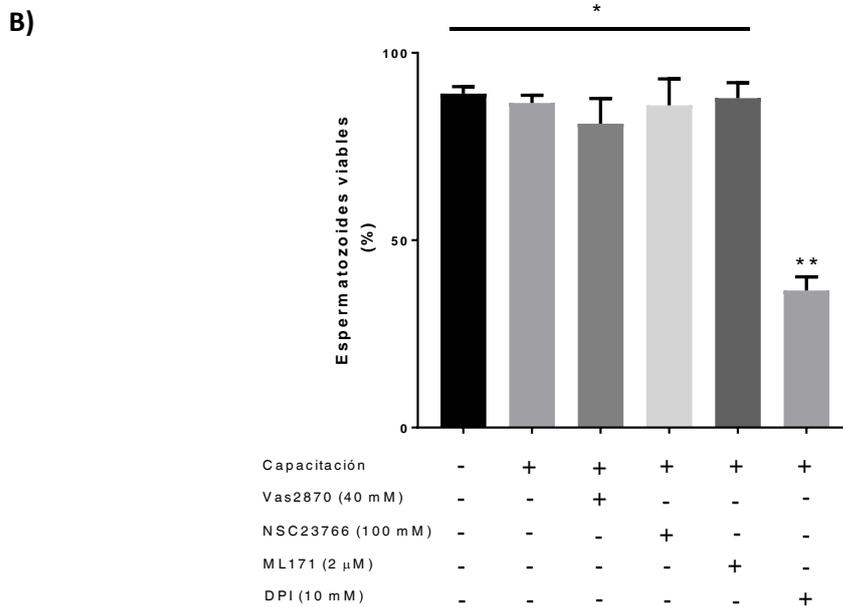
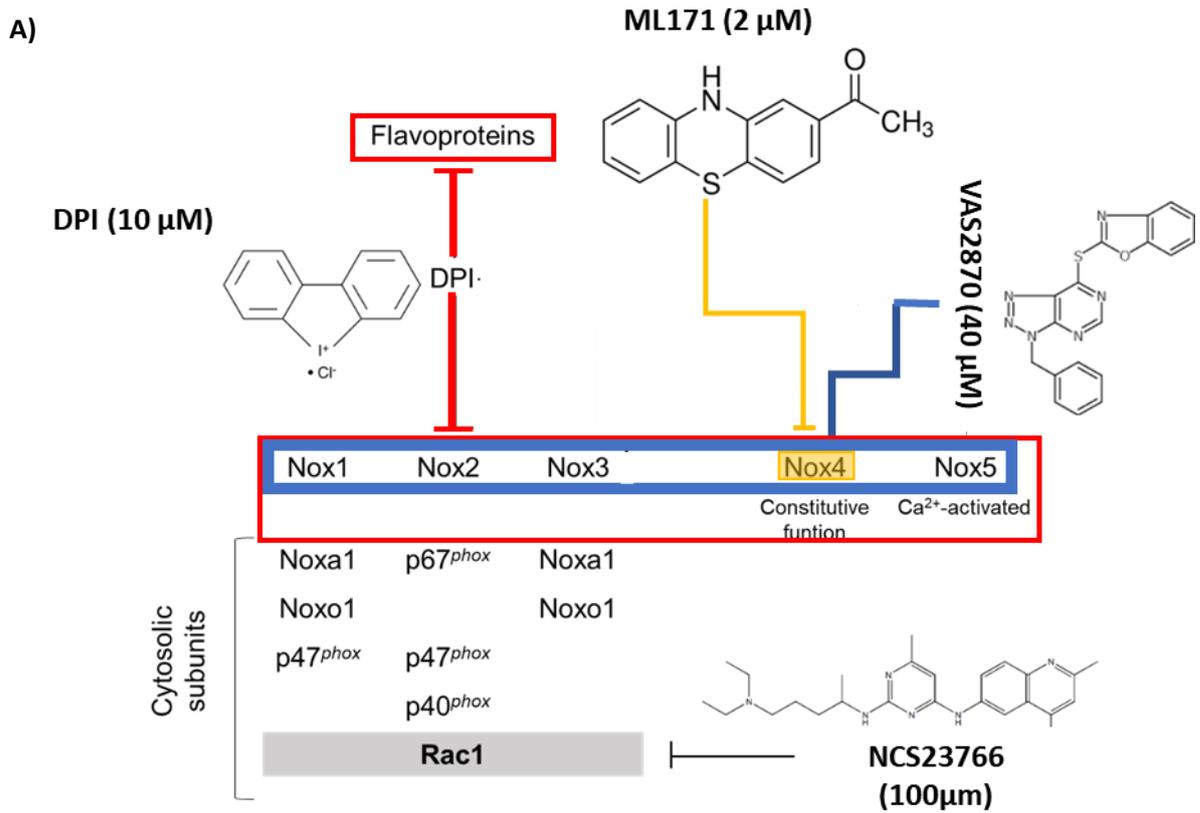
**Duox1:** gi|348572223|ref|XP\_003471893.1| PREDICTED: dual oxidase 1.

**Duox2:** gi|348572217|ref|XP\_003471890.1| PREDICTED: dual oxidase 2.

Una vez detectados los genes dentro del genoma de cobayo, se procedió a realizar extractos proteicos nativos de espermatozoides, para evaluar si en condiciones capacitantes y en presencia de inhibidores de las NOX, el NADPH es oxidado. Lo que sugeriría la presencia de una NADPH oxidasa. Es necesario notar que el gen que codifica para la proteína NOX5 no se detecta en cobayo.

## **6.2. Efecto de los inhibidores utilizados durante el desarrollo experimental sobre la viabilidad de los espermatozoides**

Durante el desarrollo experimental se utilizaron los inhibidores: NSC23766 (100  $\mu$ M), inhibidor de la GTPasa pequeña Rac1, VAS2870 (40mM) inhibidor general de la familia de las NOX, ML171 (2  $\mu$ M) inhibidor específico de NOX1 y NOX4, y difenilyodonio (DPI, 10  $\mu$ M) inhibidor general de flavoproteínas (Figura 12. A yB).



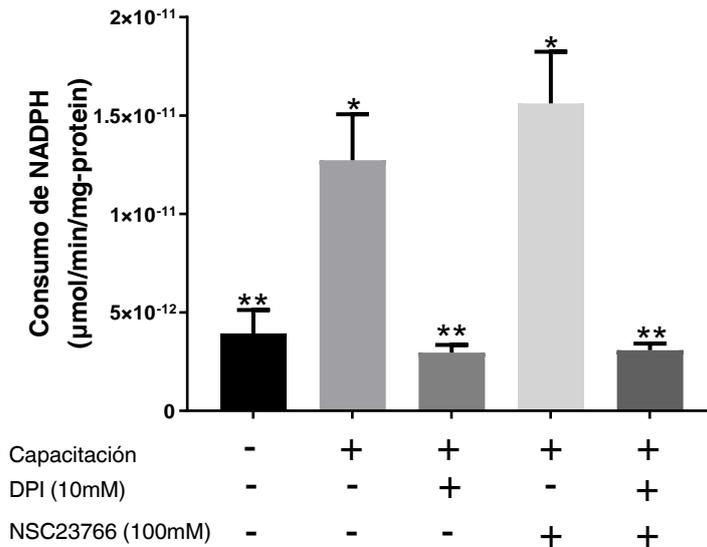
**Figura 12. Mecanismos y efecto sobre la viabilidad de los inhibidores utilizados. A) Blancos moleculares de los inhibidores utilizados.** Se hace énfasis en los integrantes de la familia NOX sobre los que actúan los inhibidores, ● DPI: inhibidor general de flavoproteínas, ● VAS2870: inhibidor general de las NOX, ● ML171: Inhibidor de nox4 y ● NCS23766: inhibidor de Rac-1. **B) Efecto de los inhibidores sobre la viabilidad de los espermatozoides de cobayo.** Se muestra que solo el DPI tiene un efecto

negativo sobre la viabilidad de las células. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0,05$ , comparando (\*) respecto a (\*\*).

Con el fin de conocer los efectos de los antagonistas de NOX en la viabilidad de los espermatozoides de cobayo, esto se evaluó mediante el ensayo de ioduro de propidio (IP), colorante fluorescente supravital. Los resultados del ensayo no muestran diferencias significativas entre los espermatozoides no capacitados, capacitados y capacitados en presencia de VAS2870, NSC23766 o ML171 (Figura 12B). Sin embargo, el DPI disminuyó drásticamente la viabilidad de los espermatozoides con respecto a los no tratados con este inhibidor (Figura 12B). Por este motivo, no se utilizó este inhibidor en las pruebas realizadas *in vivo*.

### **6.3. El consumo de NADPH sugiere la presencia de al menos dos NOX en los espermatozoides del cobayo**

El consumo de NADPH es llevado a cabo por diferentes flavoproteínas, entre ellas las NOX e indica la actividad de estas flavoproteínas. Por lo tanto, se calculó este consumo de NADPH en extractos proteicos obtenidos de espermatozoides no capacitados, capacitados y capacitados en la presencia de un pan-inhibidor de flavoproteínas, DPI (10 mM) o un inhibidor específico de Rac1, NSC23766 (100 mM). En condiciones capacitantes el consumo de NADPH aumentó con respecto al extracto incubado en condiciones no capacitantes. En presencia de DPI, el consumo de NADPH regreso al mostrado por los extractos de los espermatozoides no capacitados (Figura 13). Mientras que en la presencia de NCS23766, el consumo de NADPH no presenta diferencia estadística con respecto a los espermatozoides en condiciones capacitantes. (Figura 13). Finalmente, en extractos obtenidos de espermatozoides capacitados en la presencia de ambos inhibidores, el consumo fue similar a los extractos de los espermatozoides no capacitados (Figura 12).

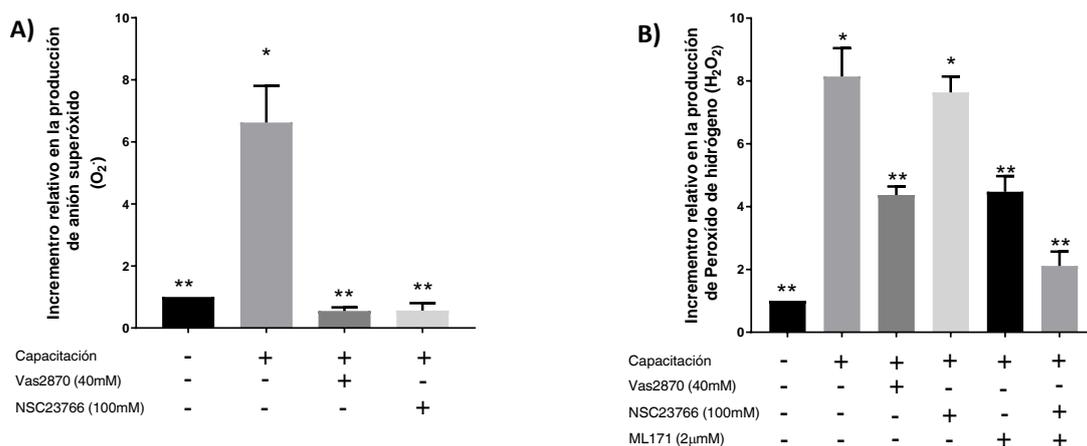


**Figura 13. Consumo de NADPH en extractos nativos totales de proteínas de espermatozoides de cobayo.** El consumo de NADPH fue medido en extractos nativos de espermatozoides en presencia del inhibidor general de flavoproteínas yoduro de difenilyodonio (DPI, 10 μM) y de NSC23766 (100 μM), inhibidor de la GTPasa pequeña Rac1. Los resultados se expresan como la media ± E.S. (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0,05$ , comparando (\*) respecto a (\*\*).

#### **6.4.La producción de ERO se incrementa durante la capacitación y es inhibida por los antagonistas de las NOX**

Para determinar si las ERO ( $O_2^-$  y  $H_2O_2$ ) se producen durante la capacitación, se capacitaron (60 min) espermatozoides y se analizaron las concentraciones de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . Los resultados mostraron que los espermatozoides no capacitados producen un nivel basal de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . Mientras que durante la capacitación los niveles de ERO aumentaron significativamente (Figura 14A). Para definir si los aumentos en la producción de ERO son consecuencia de la actividad de alguna NOX, se evaluaron los efectos de VAS2870, un inhibidor general de las NOX y el NSC23766, un inhibidor específico de Rac1 durante la capacitación. El incremento en la producción de  $O_2^-$  durante la capacitación fue inhibido en presencia de VAS2870 y NSC23766, igualando los niveles observados en espermatozoides no capacitados (Figura 14B). Estos resultados sugieren que NOX2 es activa en los espermatozoides de cobayo. En el caso del aumento de  $H_2O_2$ , la producción de esta ERO fue inhibida durante la capacitación en presencia de VAS2870. Mientras que, en presencia de NSC23766 no se inhibió la producción de este, lo que sugiere que una NOX no dependiente de Rac1 permanece activa (Figura 14B), posiblemente NOX4. Para confirmar que el aumento en la producción de  $H_2O_2$  es consecuencia de la actividad de NOX4, se realizó la capacitación

espermática en presencia de ML171 (2 mM), un inhibidor con mayor especificidad por NOX4 (Dao, Elbatreek et al. 2020). ML171 inhibió significativamente la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto a los espermatozoides capacitados en ausencia de este inhibidor (Figura 14B). Sin embargo, la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de ML171 es significativamente ( $p < 0,01$ ) mayor cuando con respecto a los espermatozoides no capacitados (Figura 14B). Posiblemente, este H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por NOX2, que no se ve afectado por ML171. Por lo cual, se ensayaron en conjunto NSC23766 y ML171 durante la capacitación, obteniéndose como resultado una reducción de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a niveles muy similares a los de los espermatozoides no capacitados (Figura 14B). En conjunto, estos resultados indican que NOX2 y NOX4 son los principales productores de ERO en los espermatozoides de cobayo.

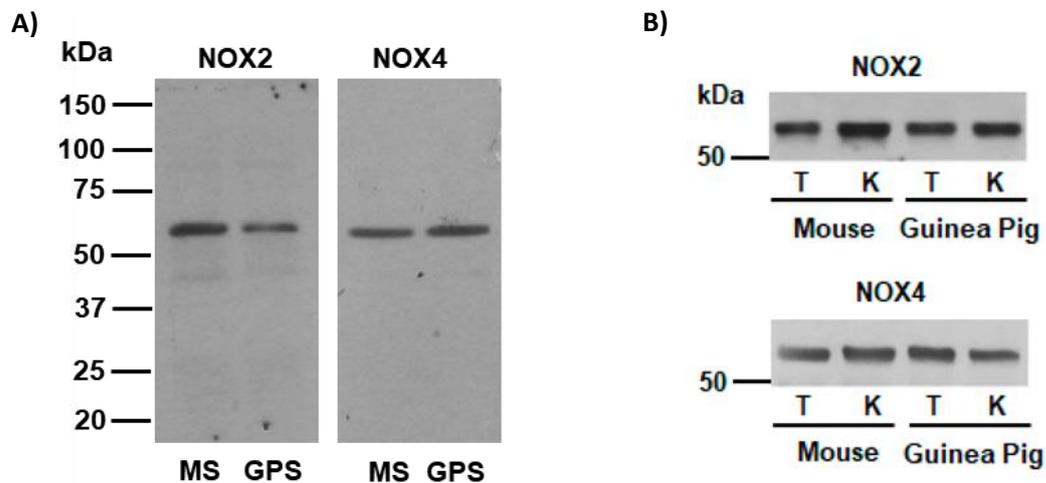


**Figura 14. Producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno durante el proceso de capacitación en espermatozoides de cobayo.** A) La producción de anión superóxido durante la capacitación. VAS2870 y NSC23766 son capaces de prevenir la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> durante la capacitación. B) La producción de peróxido de hidrógeno se inhibe drásticamente en presencia de NSC23766 y ML171. Sólo la acción conjunta de NSC23766 más ML171 fue capaz de disminuir la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a niveles similares a los espermatozoides no capacitados. Los resultados se expresan como la media ± E.S. (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0,01$ , comparando (\*) respecto a (\*\*).

### 6.5. NOX2 y NOX4 están presentes en espermatozoides de cobayo y ratón

Con los resultados anteriores se propuso la hipótesis de que NOX2 y NOX4 son las dos NOX que están relacionadas con la producción de ERO en los espermatozoides de cobayo. Los argumentos tomados en cuenta fueron primero que NOX2 se ha encontrado en

espermatozoides de roedores (ratones y ratas). Adicionalmente, NOX4 produce constitutivamente  $H_2O_2$  y no está regulada por Rac1. Esta hipótesis se confirmó por Western blot utilizando anticuerpos específicos que reconocen NOX2 y NOX4, donde detectamos bandas de proteína de aproximadamente 65 kDa tanto para NOX2 como para NOX4 en espermatozoides de cobayo y ratón. Como control se utilizaron extractos totales de riñón y testículo tanto de cobayo como de ratón. Bandas proteicas similares a las detectadas en los espermatozoides fueron detectadas en estos tejidos (Figuras 15 A y B).

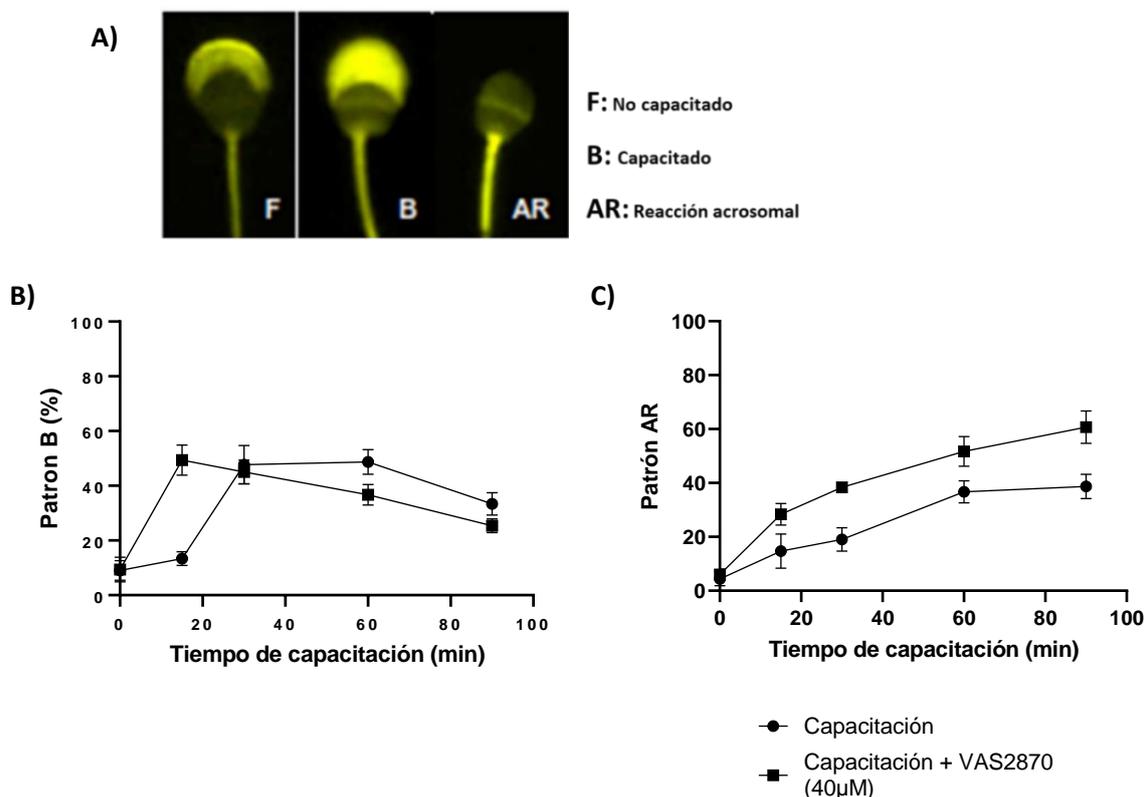


**Figura 15. Detección de las NOX: NOX2 y NOX4 en extractos totales de espermatozoides de cobayo.** A) Western-blot para detección de NOX2 y NOX4 en extractos totales de espermatozoides de ratón y cobayo (GPS). Se observan las bandas correspondientes al peso reportado para las isoformas de NOX2 y NOX4 en las dos especies analizadas. B) Controles de detección de NOX2 y NOX4. Se muestran los controles para los anticuerpos anti-NOX2 y anti-NOX4. Fueron utilizados tejidos donde se ha reportado la presencia de las isoformas de NOX2 y NOX4. T=Testículo, K= Riñón, en ratón y en cobayo. Las imágenes representan a tres experimentos independientes.

Durante la capacitación, el incremento en los niveles de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  es necesario para que este proceso se lleve a cabo correctamente. Por otro lado, si se inhibe la generación de estas ERO, se perjudica la capacitación y otros procesos espermáticos, como la reacción acrosomal y la hipermotilidad. Para definir si la generación de ERO por NOX2 y NOX4 en espermatozoides de cobayo es esencial para la capacitación, reacción acrosómica espontánea (sAR) y la motilidad, estos parámetros fisiológicos se valoraron en espermatozoides de cobayo, los cuales fueron capacitados en ausencia o presencia de VAS2870 (40  $\mu$ M).

## 6.6. La inhibición de NOX acelera la capacitación y la pérdida del acrosoma en espermatozoides de cobayo

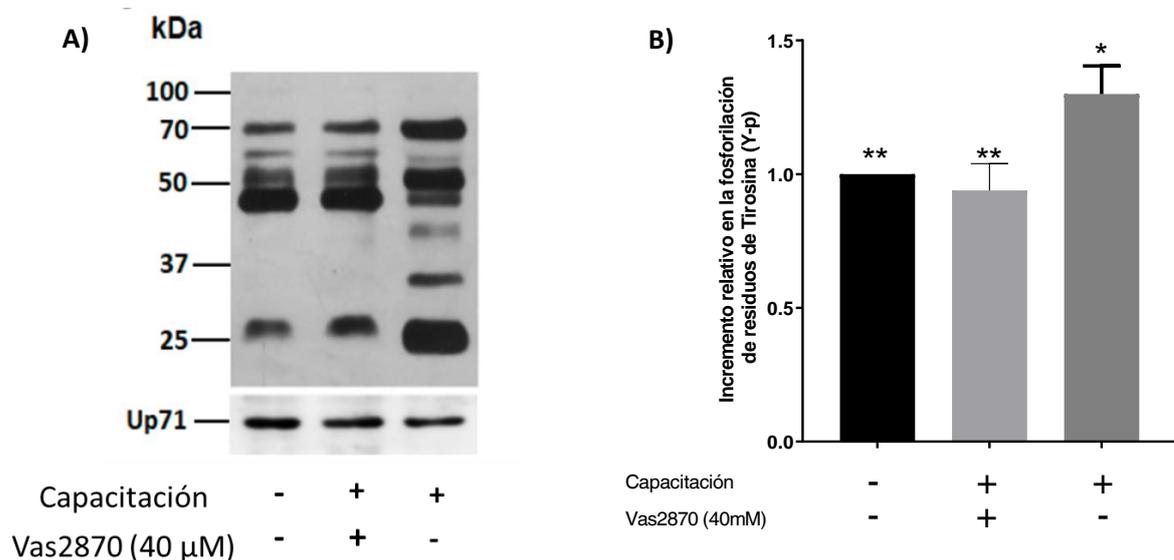
La evaluación mediante el ensayo CTC mostró que, en condiciones de capacitación, el patrón B aumentó lentamente durante los primeros minutos de incubación. Después de 15 min. de incubación, el porcentaje de espermatozoides que mostraron el patrón B aumentó a los 30 min de incubación (Figura 16B). Después de 60 min de capacitación, la tasa del patrón B disminuyó, probablemente como consecuencia del aumento en el número de espermatozoides con el patrón AR (Figura 16C). A diferencia del control, los espermatozoides capacitados en presencia de VAS2870 mostraron un rápido aumento del patrón B, alcanzando su máximo a los 15 min de incubación. Después, el porcentaje del patrón B disminuyó rápidamente (Figura 16B), quizás debido al rápido aumento del patrón AR (Figura 16C). Estos resultados sugieren que la inhibición de NOX2 y NOX4 acelera la capacitación.



**Figura 16.** La inhibición de las NOX adelanta la presentación de la capacitación y la reacción acrosomal. **A)** Patrones espermáticos obtenidos durante la capacitación mediante el ensayo de clortetraciclina (CTC). Se muestran la redistribución de la fluorescencia emitida por CTC durante el proceso de capacitación en espermatozoides capacitados durante 90 min. **B)** Distribución del patrón B a lo largo del tiempo de capacitación en presencia de VAS2870. **C)** Distribución del patrón AR a lo largo del tiempo de capacitación en presencia de VAS2870. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0,05$ , comparando (\*) respecto a (\*\*).

### 6.7. VAS2870 inhibe la fosforilación de residuos de tirosina durante la capacitación en espermatozoides de cobayo

El efecto de la inhibición de la producción de ERO sobre la capacitación suele evaluarse utilizando el ensayo PYP. Los resultados muestran que la inhibición de la generación de ERO durante la capacitación impide la PYP. Para determinar si se produce una correcta PYP durante la inhibición de NOX, se valoró la PYP totales. Así, los espermatozoides capacitados en presencia de VAS2870 (40  $\mu$ M) mostraron niveles de PYP similares a los espermatozoides no capacitados (Figura 17 A y B). Estos resultados confirman que la inhibición de la generación de ERO durante la capacitación inhibe la PYP.

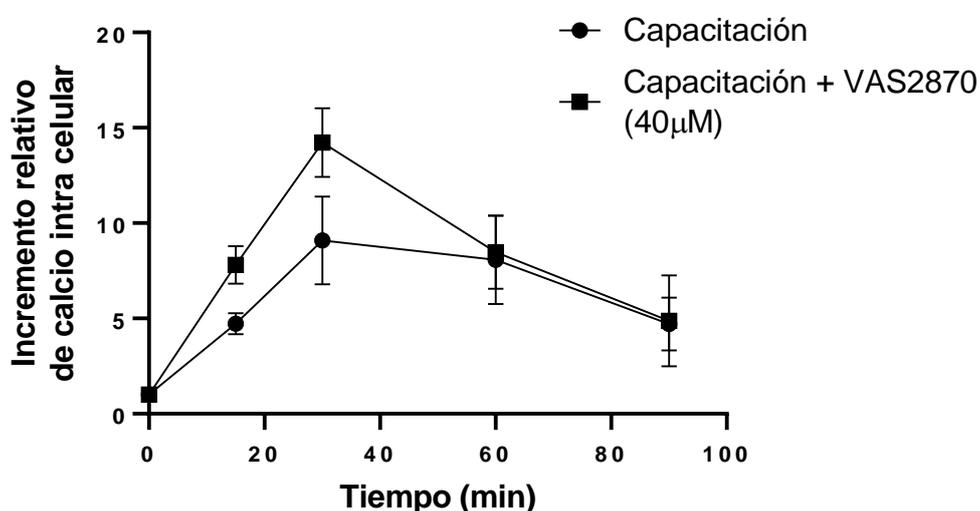


**Figura 17. Evaluación de la fosforilación de residuos de tirosina durante la capacitación. A)** Western blot donde se muestra la fosforilación de tirosinas en espermatozoides no capacitados, capacitados y en presencia de VAS2870 **B) Densitograma donde que muestra el incremento de la PYP durante 60 min de capacitación.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0,05$ , comparando (\*) respecto a (\*\*).

### 6.8. Las NOX regula el influjo de calcio durante la capacitación

Los resultados de PYP (Figura 17) sugieren que la capacitación se inhibe cuando los espermatozoides se incuban en presencia de VAS2870. A pesar de ello, la sAR (reacción acrosomal espontánea) se incrementa tempranamente (Figura 16), lo que sugiere que el influjo de calcio no se ve alterado por la inhibición de NOX. Para confirmar esta hipótesis, la  $[Ca^{2+}]_i$  durante la capacitación, se evaluó en presencia o ausencia de VAS2870 (40  $\mu$ M). Los resultados muestran que la  $[Ca^{2+}]_i$  aumentó gradualmente en los espermatozoides

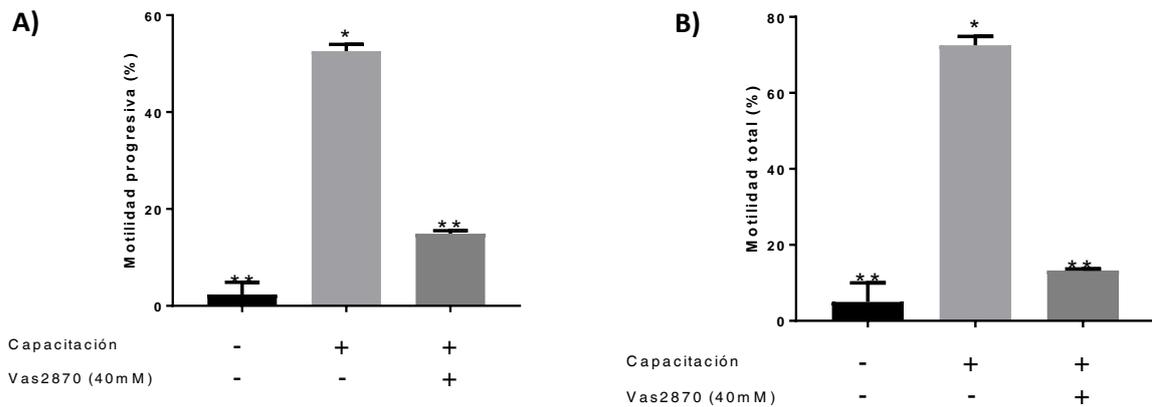
capacitados. Alcanzó su máximo a los 30 min de incubación y se mantuvo en estos niveles hasta los 60 min de capacitación (Figura 18). Después de 60 min, la  $[Ca^{2+}]_i$  disminuyó rápidamente debido a la sAR, mientras que la  $[Ca^{2+}]_i$  aumentó rápidamente en los espermatozoides capacitados en presencia de VAS2870; alcanzó un máximo a los 30 min de incubación y disminuyendo rápidamente después de este tiempo (Figura 18). El  $[Ca^{2+}]_i$  a los 15 y 30 min de capacitación en presencia de VAS2870 fue significativamente superior a la  $[Ca^{2+}]_i$  en ausencia de VAS2870 (Figura 18). En conclusión, los espermatozoides en presencia de VAS2870 muestran parámetros que indican que experimentan tanto la capacitación como la sAR temprana.



**Figura 18. Detección de calcio intracelular mediante FURA-3 AM.** Se observaron los cambios de fluorescencia durante 90 min de capacitación en presencia y ausencia de VAS2870. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. ( $n = 3$ ). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0,05$ , comparando (\*) respecto a (\*\*).

### 6.9. La actividad de NOX es necesaria para el desarrollo normal de la motilidad progresiva y total durante la capacitación

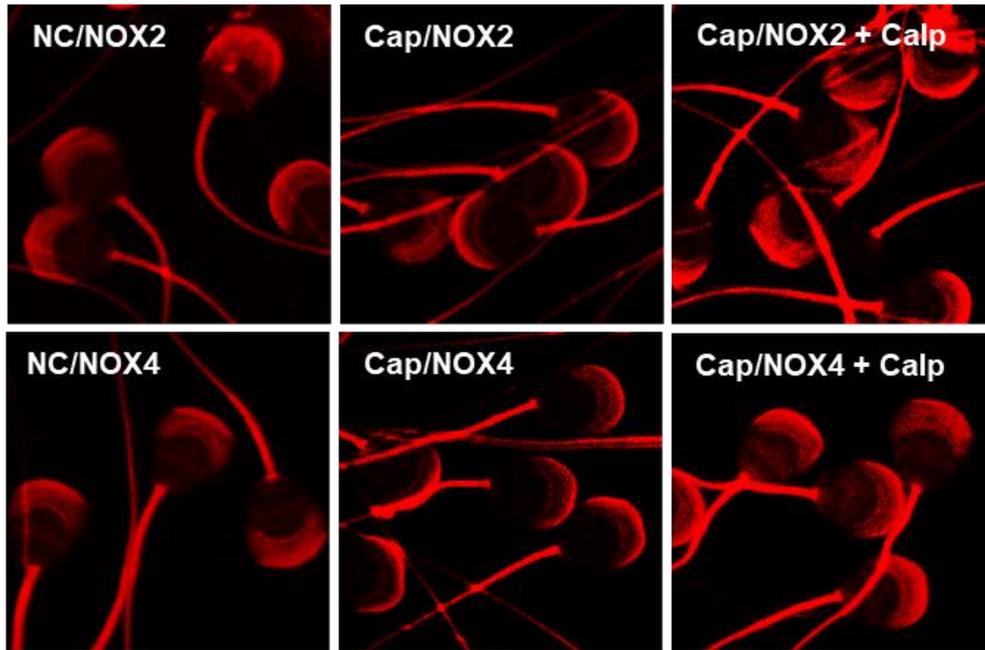
Los espermatozoides obtenidos de la cabeza del epidídimo de cobayos son morfológicamente maduros y son capaces de desarrollar motilidad progresiva, debida al bateo sincrónico del flagelo. Durante la capacitación esta motilidad se mantiene; sin embargo, el desarrollo de la hipermotilidad marca el término de la capacitación. De esta manera, mediante el equipo CASA (Dao, Elbatreek et al.) se evaluó la motilidad total y progresiva en espermatozoides capacitados por 60 min (Figura 19).



**Figura 19. A) Motilidad progresiva.** En presencia de VAS2870 las células pierden la capacidad de desplazamiento debido a que el flagelo deja de batir. **B) Motilidad total.** En presencia de VAS2870 los espermatozoides pierden la capacidad de realizar cualquier tipo de movimiento, tanto en el flagelo como en la cabeza. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0,05$ , comparando (\*) respecto a (\*\*).

## 6.10. NOX2 y NOX4 cambian su localización subcelular durante la capacitación

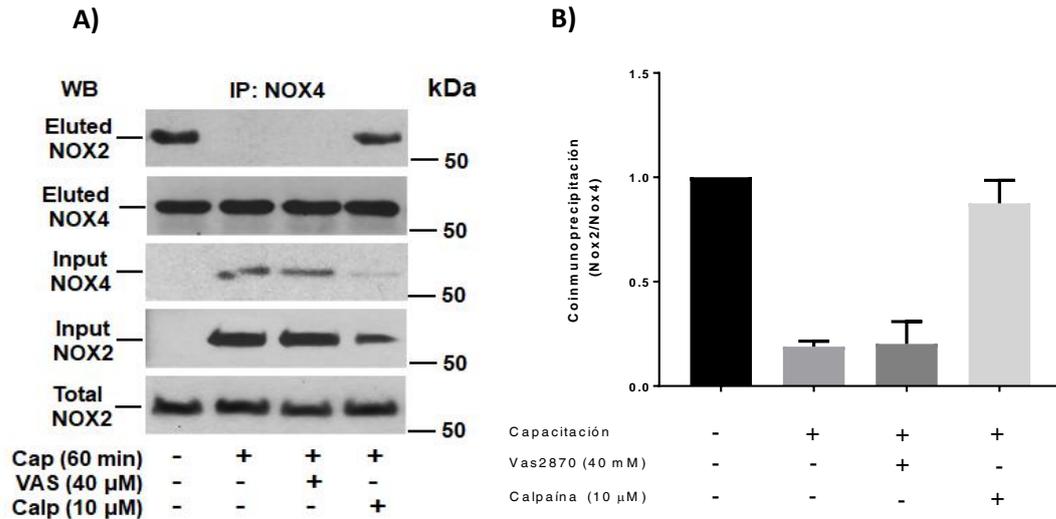
Evaluados los principales parámetros de la capacitación, PYP, patrones de capacitación con CTC, influjo de calcio y evaluación de la motilidad, se procedió a evaluar la localización celular de las proteínas NOX2 y NOX4 mediante inmunofluorescencia en espermatozoides no capacitados y capacitados. Adicionalmente, se utilizó calpeptina, un inhibidor de la proteasa dependiente de  $Ca^{2+}$ , calpaína. Esto debido a que la cuantificación de  $[Ca^{2+}]_i$  mostró que la internalización de calcio es promovida en ausencia de ERO, y calpaína es un blanco de regulación por calcio. Los resultados muestran que en los espermatozoides no capacitados NOX2 y NOX4 se encuentran dispersas por toda la región acrosomal y a lo largo del flagelo en los espermatozoides no capacitados (Figura 20). En espermatozoides capacitados (60 min) ambas NOX experimentaron un cambio de localización en el acrosoma, localizándose después de la capacitación localizadas en la región apical del acrosoma (Figura 20). Este cambio de localización es inhibido cuando los espermatozoides fueron capacitados en la presencia de calpeptina (Figura 20). En el caso del flagelo, NOX2 o NOX4 no experimentaron cambios aparentes en su localización (Figura 20).



**Figura 20. Localización subcelular de NOX2 y NOX4 en espermatozoides.** Se observa que en espermatozoides no capacitados y en presencia de calpeptina en condiciones capacitantes NOX2 y NOX4 se localizan en la región acrosomal y en el flagelo. Sin embargo, en condiciones capacitantes ambas proteínas se relocalizan en la región apical del acrosoma, manteniéndose en el flagelo.

### **6.11. NOX2 y NOX4 se encuentran asociadas y su disociación depende de la actividad de calpaína**

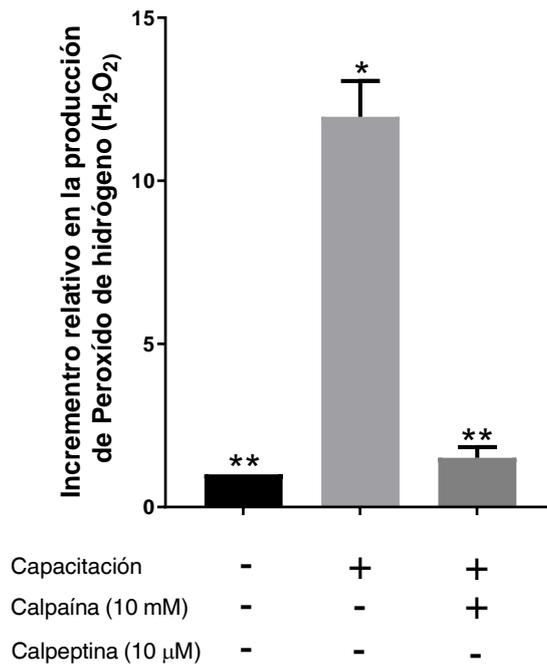
Los anteriores resultados sugieren que NOX2 y NOX4 se encuentran asociadas en los espermatozoides. Para corroborar la anterior hipótesis, mediante coimmunoprecipitación se evaluó si NOX2 y NOX4 presentaban algún tipo de interacción proteína-proteína. Los resultados mostraron que NOX2 coimmunoprecipitó con NOX4 cuando se usaron para el ensayo extractos proteicos de espermatozoides no capacitados, pero esto no sucedió cuando se utilizaron extractos de espermatozoides capacitados o capacitados en la presencia de VAS2870 (Figura 21). Sin embargo, cuando se usaron extractos proteicos de espermatozoides capacitados en la presencia del inhibidor de calpaína (calpeptina), NOX2 coimmunoprecipitó con NOX4 (Figura 21). Estos resultados sugieren que NOX2 y NOX4 se encuentran asociadas físicamente en espermatozoides no capacitados, dicha asociación se pierde durante la capacitación, aun cuando las NOX se encuentren inactivas.



**Figura 21. NOX2 y NOX4 interactúan solamente en condiciones no capacitantes y en presencia del inhibidor de calpaína. A) Co-Inmunoprecipitación en una columna sensibilizada con anticuerpos anti NOX4.** En condiciones capacitantes y en presencia de calpeptina en condiciones capacitantes NOX2 es detectado en una columna acoplada con anticuerpos contra NOX4. Se muestran las de NOX2 y NOX4 en los eluatos de la columna agarosa-poteína A/G-anti-NOX4, los inputs y el western blot de NOX2 total. **B) Densitograma de la Co-inmunofluorescencia de NOX2/NOX4.** Se muestra que la interacción de NOX2 con NOX4 solo se mantiene en espermatozoides no capacitados y en presencia de calpeptina en condiciones capacitantes. No así en condiciones capacitantes incluso en presencia de VAS2870 (40 μM). Los resultados se expresan como la media ± E.S. (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0,05$ , comparando (\*) respecto a (\*\*).

## 6.12. La producción de ERO depende de la disociación de NOX2 y NOX4

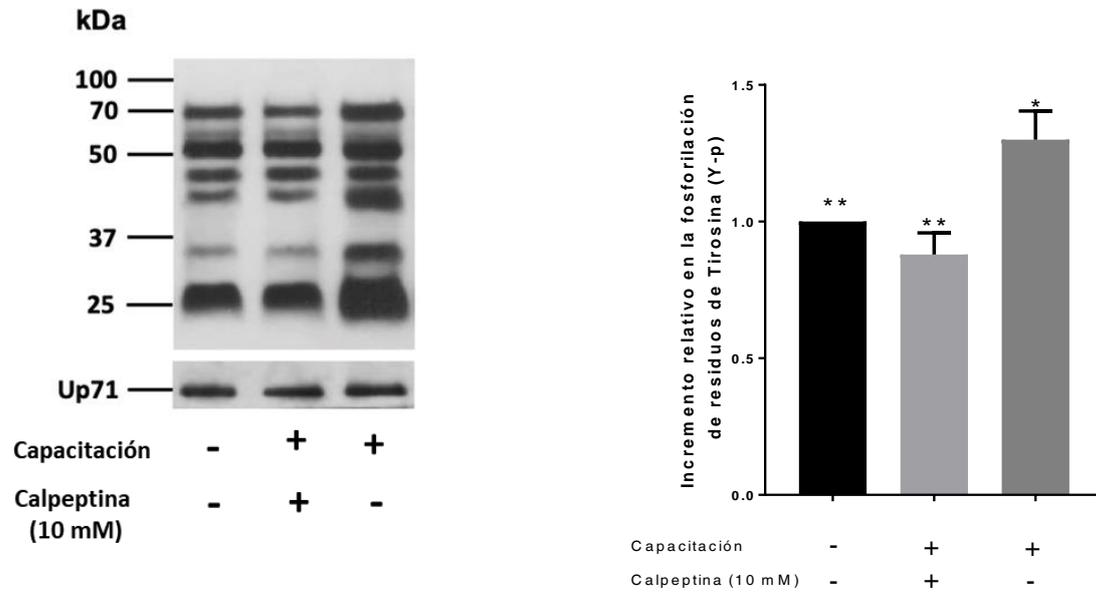
Debido a que NOX2 y NOX4 solo mantienen su interacción en condiciones no capacitantes y en presencia de calpeptina, se realizó la evaluación de la producción de ERO después de 60 min de capacitación. Los resultados mostraron que un incremento significativo en la producción de  $H_2O_2$  en los espermatozoides capacitados con respecto a los no capacitados. Dicho incremento se vio inhibido cuando los espermatozoides fueron capacitados en la presencia de calpeptina (Figura 22). Los resultados anteriores sugieren que la producción de ERO solo se presenta después de que la interacción entre NOX2 y NOX4 se pierde por acción de calpaína.



**Figura 22. La producción de ERO es inhibida en presencia de calpeptina.** Espermatozoides incubados durante 60 min en presencia de calpeptina no producen ERO, comportamiento similar a espermatozoides incubados en PBS. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0,05$ , comparando (\*) respecto a (\*\*).

### 6.13. La capacitación depende de la activación de calpaína

Una vez evaluada la producción de ERO en presencia de calpeptina y de observar que la interacción de NOX2 y NOX4 se pierde en condiciones capacitantes de manera dependiente de calpaína, se procedió a evaluar la PYP en espermatozoides capacitados en presencia de calpeptina. Los resultados mostraron un incremento significativo en PYP de espermatozoides capacitados con respecto a los no capacitados (Figuras 23A y B). Cuando los espermatozoides fueron capacitados en la presencia de calpeptina, los valores de PYP fueron similares a los obtenidos en espermatozoides no capacitados (Figura 23A y B). Los datos anteriores sugieren que calpaína podría regular la capacitación a través de la disociación de NOX2 y NOX4.



**Figura 23. Evaluación de la fosforilación de residuos de ti**

**ina durante 60 min de capacitación en presencia de calpeptina. A)** Wester blot que muestra la PYP no capacitados, capacitados y en presencia de calpeptina. **B)** Densitograma que muestra que en presencia de calpeptina no hay incremento en la PYP después de 60 min de capacitación en espermatozoides en MCM-PL. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0,05$ , comparando (\*) respecto a (\*\*).

## VII. Discusión

### **Papel fisiológico de NOX2 y NOX4 durante la capacitación en espermatozoides de cobayo**

La producción de ERO en los espermatozoides de mamíferos es consecuencia de las diferentes vías de señalización de estas células. Las ERO activan diferentes vías de señalización relacionadas en procesos como la capacitación, la reacción acrosomal y la motilidad (Rivlin, Mendel et al. 2004, Aitken 2017, O'Flaherty and Matsushita-Fournier 2017). A pesar de la evidencia fisiológica y patológica de los efectos de las ERO en los espermatozoides, la identidad de las NOX responsables de la producción de ERO sigue siendo incierta, aun cuando dos NOX diferentes, NOX2 y NOX5, están presentes en los espermatozoides de mamíferos (Shukla, Jha et al. 2005, Shoeb, Laloraya et al. 2010, Musset, Clark et al. 2012, Vatannejad, Tavilani et al. 2019). El presente trabajo mostró claramente la presencia de dos NOX diferentes en espermatozoides de ratón y cobaya, NOX2 y NOX4, que aumentan los niveles de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  durante la capacitación.

Los resultados presentados aquí relacionan directamente NOX2 y NOX4 con procesos espermáticos, como la capacitación, la reacción acrosomal espontánea (sAR) y la motilidad. En particular, nuestros resultados revelaron un mecanismo que no ha sido aún estudiado, el cual, relaciona durante la capacitación a la proteasa calpaína, dependiente de  $Ca^{2+}$ , con la activación integrantes de la familia NOX, en concreto NOX2 y NOX4.

Diferentes informes sugieren que la producción de ERO en espermatozoides de mamíferos podría ser consecuencia de un único miembro de la familia NOX. NOX5 la cual ha sido detectada en espermatozoides de seres humanos, de caballos y caninos (Sabeur and Ball 2007, Musset, Clark et al. 2012, Setyawan, Kim et al. 2016, Aparnak and Saberivand 2019). Mientras que NOX2 se ha detectado en espermatozoides de ratón, rata y cabra (Shoeb, Laloraya et al. 2010, Chandrasekhar, Laloraya et al. 2011, Vatannejad, Tavilani et al. 2019). Esta sugerencia está respaldada por el estudio de Musset et al., quienes demostraron que los espermatozoides de seres humanos no expresan NOX1, NOX2 ni NOX4 (Musset, Clark et al. 2012). Nuestros resultados

mostrarón que, al igual que en otros roedores (Shukla, Jha et al. 2005), NOX2 también se expresa en los espermatozoides de cobayo (Figura 14A). Al mismo tiempo, el análisis del consumo de NADPH reveló la presencia de otro miembro de la familia NOX en los espermatozoides de cobaya, la NOX4. La producción de ERO por NOX2 requiere Rac1 activo (Acevedo and Gonzalez-Billault 2018); por lo tanto, el aumento en el consumo de NADPH que ocurre durante la capacitación (Figura 12) y que no fue suprimido por NSC23766, inhibidor específico de Rac1. Por el contrario, el consumo de NADPH aumentó (Figura 12) esto es indicativo de la presencia de al menos otro integrante de las NOX el cual no es regulado por Rac1. El candidato que cumple con las características mencionadas anteriormente es NOX4, lo cual fue corroborado por WB (Figura 14) y la coinmunolocalización (Figura 20). Adicionalmente, se ha demostrado que existen células que expresan varios miembros de la familia de las NOX, como son los eritrocitos (Dei Zotti, Verdoy et al. 2020) por estos motivos es posible que en los espermatozoides de cobayo no solo se encuentren NOX2 y NOX4 sino también NOX1 y NOX3. No obstante, en el presente trabajo solo nos enfocamos en NOX2 y NOX4, dejando como perspectivas el análisis de los demás integrantes de la familia de las NOX.

Nuestros resultados mostraron la presencia de al menos NOX2 y NOX4 en los espermatozoides de cobayo y ratón (Figura 14). La evaluación de la producción de ERO también sugieren que NOX2 y NOX4 se activan solo durante el proceso de capacitación en los espermatozoides de cobayo (Figura 13). En el caso de NOX2, sabemos que el principal producto de esta enzima es el  $O_2^-$ , ERO que dismuta de forma espontánea o enzimática a  $H_2O_2$  (Buvelot, Jaquet et al. 2019). El NSC23766 y el VAS2870 inhiben la producción del radical superóxido (Figura 13 B). La producción del  $O_2^-$  se bloquea al utilizar un inhibidor de la GTPasa pequeña Rac1 (NSC23766), lo que sugiere que esta ERO es producida por una NOX dependiente de Rac1, posiblemente NOX2. Sin embargo, la inhibición de Rac1 no redujo los niveles de  $H_2O_2$ ; ERO que solo se redujo en presencia de ML171 (Figura 10 A), un inhibidor específico para NOX4 a concentración (2  $\mu$ M), que no afecta a la actividad de NOX2 (Dao, Elbatreek et al. 2020). Por lo tanto, sugerimos que la producción de  $H_2O_2$  en estas condiciones debe deberse a una NOX no dependiente de Rac1, como NOX4. El hecho

de que la inhibición de NOX2 no reduzca los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la capacitación no descarta la dismutación espontánea o enzimática por la SOD de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones normales. Es esencial considerar que la reducción de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con los observados en espermatozoides no capacitados sólo se consigue cuando NSC23766 y ML171 se ensayaron conjuntamente (Figura 13 B). En conclusión, nuestros datos muestran claramente que NOX2 y NOX4 son responsables de la producción de ERO durante la capacitación.

El uso de ML171 (2 µM) en este trabajo implica la posibilidad de que la actividad de NOX1, NOX4 y NOX5 pueda verse afectada (Vatannejad, Tavilani et al. 2019). En primer lugar, se sabe que NOX5 es una NOX exclusiva de los seres humanos (Musset, Clark et al. 2012) y dado que el gen no existe en organismos del orden de los roedores (Buvelot, Jaquet et al. 2019), no hay interferencia en la producción de ERO en los espermatozoides de roedores como cobayos y ratones. En el caso de NOX1, concentraciones de ML171 inferiores a 0,5 µM inhiben específicamente NOX1 (Gavazzi, Banfi et al. 2006). Sin embargo, en este trabajo a esta concentración, la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no mostró cambios en relación con los espermatozoides capacitados en ausencia de ML171. Si NOX1 está presente en los espermatozoides de roedores, no estaría implicada en los diferentes procesos fisiológicos que experimentan los espermatozoides antes de fecundar el óvulo. Esto se ve corroborado por el hecho de que los ratones deficientes en NOX1 son fértiles (Gavazzi, Banfi et al. 2006). Por último, la actividad de NOX2 no podría haber sido alterada por ML171, ya que sólo se ve afectada a concentraciones superiores a 10 µM (Gavazzi, Banfi et al. 2006, Dao, Elbatreek et al. 2020).

Durante la capacitación, los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentan debido a la activación de las enzimas responsables de la producción de éstas (Aitken 2017, O'Flaherty and Matsushita-Fournier 2017, Serafini and O'Flaherty 2022). Se han caracterizado varias rutas enzimáticas responsables de la producción de ERO y su participación en procesos como la capacitación, la reacción acrosomal y la motilidad (Serafini and O'Flaherty 2022). Sin embargo, a excepción de NOX5 (Musset, Clark et al. 2012), se sabe poco sobre la participación de NOX2 y NOX4 en la producción de ERO y el papel fisiológico

que estas proteínas tienen. Nuestros resultados mostrarán que la inhibición de NOX2 y NOX4 mediante un inhibidor de ambas NOX, VAS2879 (Dao, Elbatreek et al. 2020), previene la producción de ERO, específicamente abate la producción de  $O_2^-$  y reduce los niveles de  $H_2O_2$  (Figuras 13 A y B) ocasionando que la capacitación de las células no llegue a término (Figura 15) y que se vean afectados directamente los procesos espermáticos posteriores a la capacitación como: son la reacción acrosomal y la activación de la motilidad progresiva e hiperactivada. Por lo tanto, la inhibición de la producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  por parte de NOX2 y NOX4 durante la capacitación está relacionada directamente con procesos fisiológicos como la capacitación y la motilidad, que requieren un nivel adecuado de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  para que estos procesos espermáticos se desarrollen correctamente. En este sentido, es bien conocido que el  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  están relacionados con la capacitación, la reacción acrosomal y la motilidad mediante la activación de cinasas, como PKA, PKC y MEK, que están directamente relacionadas en la fisiología de las células espermáticas (de Lamirande and O'Flaherty 2008, Serafini and O'Flaherty 2022).

El aumento temprano de los patrones B y AR que experimentan los espermatozoides cuando VAS2870 inhibe la producción de  $H_2O_2$  sugiere que los espermatozoides carecen del tiempo suficiente que permitirá una capacitación adecuada, fenómeno que propicia que el acrosoma se pierda de forma prematura (Figura 15). Estos datos parecen contradictorios con respecto a la fosforilación de los residuos de tirosina baja, marcador clásico del proceso de capacitación, observada en presencia de VAS2870 y sugieren que los espermatozoides no son capaces de llevar a cabo una correcta capacitación (Figura 15). La evaluación de los patrones B y AR (Figura 15), la cual se fundamenta en que la CTC interacciona con proteínas de membrana en presencia de calcio, evidencia que el patrón B se presenta de forma temprana en ausencia de ERO (Ward and Storey 1984). Por otro lado, se ha demostrado que la adecuada producción de  $H_2O_2$  durante la capacitación está relacionada con la activación de diferentes quinasas, como PKC y PKA, las cuales muestran una baja actividad cuando la capacitación se realiza en un ambiente con niveles bajos de  $H_2O_2$  (Serafini and O'Flaherty 2022).

Ambos resultados sugieren que la migración de proteínas de membrana que interactúan con calcio y la PYP son procesos independientes que suceden durante la capacitación. Esto es, a pesar de la producción baja de  $H_2O_2$  cuando NOX2 y NOX4 son inhibidas, se produce un influjo continuo de  $Ca^{2+}$  al espermatozoide (Figura 17) con la subsecuente asociación entre CTC y proteínas de membrana. En este sentido, un estudio reciente reportó que, durante la capacitación en espermatozoides de seres humanos, durante la capacitación, la progesterona incrementa el influjo de  $Ca^{2+}$  y la producción de ERO por NOX5. Sin embargo, la inhibición de NOX5 por DPI, tanto en presencia como en ausencia de progesterona, reduce la producción de ERO pero no el influjo de  $Ca^{2+}$  (Ghanbari, Keshtgar et al. 2019). Por tanto, sugerimos que la producción normal de  $H_2O_2$  es necesaria para que la capacitación y los eventos de la reacción acrosomal ocurran normalmente. Una producción baja de  $H_2O_2$  durante la capacitación induce un influjo mayor de  $Ca^{2+}$ , lo que conduce a la aparición temprana de estos eventos.

#### **La actividad proteolítica de la calpaína es esencial para la producción de ERO durante la capacitación**

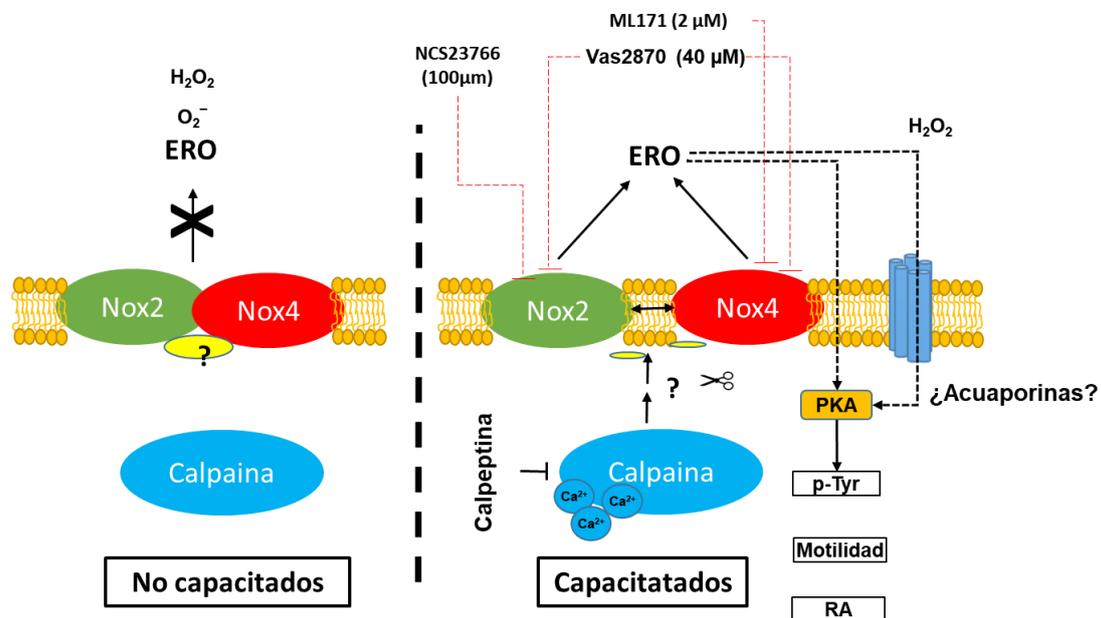
Los resultados presentados revelan un mecanismo novedoso para la activación de las NOX, en el que la calpaína-1, la calpaína expresada en los espermatozoides de cobayo (Bastian, Roa-Espitia et al. 2010), juega un papel predominante en los espermatozoides no capacitados. Previo a la capacitación NOX2 y NOX4 están físicamente asociadas. En este estado fisiológico, la producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  es deficiente (Figura 13). Por lo tanto, sugerimos que la interacción entre NOX2 y NOX4 mantiene a estas dos NADPH oxidasas inactivas o con niveles de actividad muy bajos (Figura 21). La interacción entre NOX2 y NOX4 cambia cuando los espermatozoides entran en estado de capacitación, separándose y aumentando su actividad (Figura 13). La interacción NOX2-NOX4 se produce independientemente de su actividad ya que, incluso en presencia de VAS2870, las NOX se separan (Figura 19). Además, como la producción de  $H_2O_2$  sólo aumenta en el estado de capacitación espermática (Figura 13), proponemos que la separación de NOX2 y NOX4 es un punto crucial en la activación de estas dos NOX, y también sugerimos que el aumento de ERO hace que la capacitación y la hipermotilidad se produzcan sin alteraciones.

Adicionalmente, la calpaína-1 es conocida por su importancia en los procesos espermáticos, incluyendo la capacitación, la reacción acrosomal y la motilidad, en espermatozoides de diferentes mamíferos (Rojas and Moretti-Rojas 2000, Aoyama, Ozaki et al. 2001, Ozaki, Blomgren et al. 2001, Ashizawa, Wishart et al. 2006, Bastian, Roa-Espitia et al. 2010). Aunque se han descrito diferentes relaciones entre las NOX y calpaína, en las que NOX2 y NOX4 regulan la actividad de la calpaína en procesos neuropatológicos (Guemez-Gamboa, Estrada-Sanchez et al. 2011, Paramo, Montiel et al. 2013, Wang, Bai et al. 2018), no se ha descrito previamente un mecanismo en el que la calpaína-1 esté relacionada con la activación de NOX2 y NOX4. Nuestros resultados sugieren que la activación de la calpaína-1 es un requisito esencial y crítico para que se produzcan la capacitación y la motilidad a través de la disociación del complejo NOX2-NOX4, lo que conduce a un aumento de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , que están directamente relacionados con la capacitación y la motilidad espermática (Aitken, Krausz et al. 1994, O'Flaherty and Matsushita-Fournier 2017, Serafini and O'Flaherty 2022).

Desconocemos si la interacción NOX2-NOX4 es directa o si intervienen otras proteínas. Se ha caracterizado la interacción entre NOX2 y NOX5 y caveolina-1, y se ha sugerido que caveolina-1 es un regulador negativo de estas dos NOX (Cheng, Cao et al. 2001, Huo, Liu et al. 2021). Además, la interacción entre caveolina-1 y NOX2 se observó en espermatozoides de cabra, y la actividad de NOX2 está estrechamente relacionada con la reorganización de las balsas lipídicas que se produce durante la capacitación (Shoeb, Laloraya et al. 2010). La reubicación experimentada por NOX2 y NOX4 durante la capacitación (Figura 19) es similar a la experimentada por las balsas lipídicas en espermatozoides de cobayo (Maldonado-García, Salgado-Lucio et al. 2017). Aunque ni las caveolinas ni las flotillinas son el objetivo de las calpaínas, sugerimos que estas proteínas, que están relacionadas con las balsas lipídicas, podrían estar asociadas con la reorganización de estas dos NOX que ocurre después de su separación. Recientemente se describió en cardiomiocitos que la actividad de NOX2 y NOX4 depende de su interacción con LRRC8A a través de su dominio LRRD (Huo, Liu et al. 2021). Sin embargo, al igual que las proteínas de la balsa lipídica, LRRC8A no es blanco de la calpaína. Es importante señalar que, en el trabajo de Huo et al. de

2021 igual que en este trabajo, las NADPH oxidasas implicadas son NOX2 y NOX4, lo que sugiere que estas dos NOX podrían tener una relación importante en múltiples procesos celulares y fisiológicos. Por lo tanto, queda por dilucidar si la interacción NOX2-NOX4 es directa o está mediada por otras proteínas.

En conclusión, nuestros resultados indican que la producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  durante la capacitación está relacionada con al menos dos NOX: NOX2 y NOX4. La inhibición de estas dos NOX implica una producción baja de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  durante la capacitación y, como consecuencia, se ven afectadas la capacitación, la reacción acrosómica y la motilidad se ven afectadas, relacionando directamente estas dos NOX con los procesos fisiológicos que permiten la fecundación de los espermatozoides. Por lo tanto, la producción normal de ERO por NOX2 y NOX4 durante la capacitación es esencial para que eventos como la capacitación, la reacción acrosomal y la motilidad ocurran con normalidad. Por último, presentamos un nuevo mecanismo regulador de las NOX, dirigido por la proteasa calpaína dependiente del calcio (Figura 24).



**Figura 24. Modelo propuesto para la interacción de NOX2 y NOX4.** Se esquematizan los fenómenos que ocurren en condiciones no capacitantes y capacitantes. En ausencia de los efectores de la capacitación y en presencia de calpeptina, NOX2 y NOX4 interactúan y no hay producción de ERO. Una vez que las células son colocadas en condiciones capacitantes, se puede inhibir la función de las NOX, pero no se evita la disociación del complejo NOX2-NOX4.

## VIII. Conclusiones

1. Los espermatozoides del cobayo expresan por lo menos dos NADH oxidadas: NOX2 y NOX4, las cuales son las principales productoras de ERO durante la capacitación.
2. Rac1 es importante para la producción normal de ERO por ambas NOX2 y NOX4, ya que la inhibición de Rac1 impide la activación de NOX2, principal productor de ion superóxido, pero incrementa la producción de peróxido por NOX4.
3. La producción de ERO por NOX2 y NOX4 es esencial para que procesos espermáticos como la capacitación, la reacción acrosomal y la motilidad sucedan normalmente. Las alteraciones de estos procesos fisiológicos espermáticos podrían estar relacionada con el incremento temprano de la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>.
4. NOX2 y NOX4 se encuentran asociadas en el estado no capacitado de los espermatozoides. Dicha interacción se rompe durante la capacitación y es dependiente la proteasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>, calpaína. La interrupción de la interacción entre NOX2 y NOX4 conlleva a su activación y por tanto al incremento de la producción de ERO.
5. Sugerimos que calpaína es una piedra angular de la capacitación, ya que su activación permite que varios procesos espermáticos relacionados con la capacitación se lleven a cabo normalmente, procesos como son: producción de ERO, fosforilación de proteínas en Tyr, influjos de calcio, polimerización de actina, migración de balsas lipídicas, entre otros.

## IX. Perspectivas

1. Estudiar la presencia de NOX1 y NOX3 en los espermatozoides de ratón y cobayo, y definir su posible función en los espermatozoides.
2. Definir si la función tanto NOX2 como NOX4 son requeridas para la capacitación y la motilidad o actúan de manera diferencial, esto mediante el uso de un inhibidor más específico para NOX4, M13 de Glucox Biotech.
3. Investigar si la interacción de NOX2 con NOX4 es directa o alguna otra proteína media dicha interacción.
4. Definir si NOX2 y NOX4 tienen alguna relación con proteínas de las balsas lipídicas como caveolina o flotilina.

## X. Bibliografía

- Acevedo, A. and C. Gonzalez-Billault (2018). "Crosstalk between Rac1-mediated actin regulation and ROS production." Free Radic Biol Med **116**: 101-113.
- Aguirre, J. and J. D. Lambeth (2010). "Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals." Free Radic Biol Med **49**(9): 1342-1353.
- Aitken, J., C. Krausz and D. Buckingham (1994). "Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions." Mol Reprod Dev **39**(3): 268-279.
- Aitken, R. J. (2017). "Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage." Mol Reprod Dev **84**(10): 1039-1052.
- Andrade-Pavon, D., R. I. Cuevas-Hernandez, J. G. Trujillo-Ferrara, C. Hernandez-Rodriguez, J. A. Ibarra and L. Villa-Tanaca (2017). "Recombinant 3-Hydroxy 3-Methyl Glutaryl-CoA Reductase from *Candida glabrata* (Rec-CgHMGR) Obtained by Heterologous Expression, as a Novel Therapeutic Target Model for Testing Synthetic Drugs." Appl Biochem Biotechnol **182**(4): 1478-1490.
- Aoyama, T., Y. Ozaki, K. Aoki, M. Kunimatsu, T. Tada, M. Sasaki and K. Suzumori (2001). "Involvement of mu-calpain in human sperm capacitation for fertilization." Am J Reprod Immunol **45**(1): 12-20.
- Aparnak, P. and A. Saberivand (2019). "Effects of curcumin on canine semen parameters and expression of NOX5 gene in cryopreserved spermatozoa." Vet Res Forum **10**(3): 221-226.
- Ashizawa, K., G. J. Wishart, S. Katayama, D. Takano, M. Maeda, E. Arakawa and Y. Tsuzuki (2006). "Effects of calpain and Rho-kinase inhibitors on the acrosome reaction and motility of fowl spermatozoa in vitro." Reproduction **131**(1): 71-79.
- Baker, M. A., L. Hetherington, G. Reeves, J. Muller and R. J. Aitken (2008). "The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification." Proteomics **8**(11): 2312-2321.

Banfi, B., B. Malgrange, J. Knisz, K. Steger, M. Dubois-Dauphin and K. H. Krause (2004). "NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear." J Biol Chem **279**(44): 46065-46072.

Bastian, Y., A. L. Roa-Espitia, A. Mujica and E. O. Hernandez-Gonzalez (2010). "Calpain modulates capacitation and acrosome reaction through cleavage of the spectrin cytoskeleton." Reproduction **140**(5): 673-684.

Bauche, F., M. H. Fouchard and B. Jegou (1994). "Antioxidant system in rat testicular cells." FEBS Lett **349**(3): 392-396.

Bedard, K., V. Jaquet and K. H. Krause (2012). "NOX5: from basic biology to signaling and disease." Free Radic Biol Med **52**(4): 725-734.

Bienert, G. P., J. K. Schjoerring and T. P. Jahn (2006). "Membrane transport of hydrogen peroxide." Biochim Biophys Acta **1758**(8): 994-1003.

Brennan, J. P., S. C. Bardswell, J. R. Burgoyne, W. Fuller, E. Schroder, R. Wait, S. Begum, J. C. Kentish and P. Eaton (2006). "Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation." J Biol Chem **281**(31): 21827-21836.

Brucker, C. and G. B. Lipford (1995). "The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update." Hum Reprod Update **1**(1): 51-62.

Buvelot, H., V. Jaquet and K. H. Krause (2019). "Mammalian NADPH Oxidases." Methods Mol Biol **1982**: 17-36.

Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." Microbiol Mol Biol Rev **75**(1): 50-83.

Chandrasekhar, A., M. Laloraya and P. G. Kumar (2011). "Modulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity through sequential posttranslational modifications of p22 phagocytic oxidase during capacitation and acrosome reaction in goat spermatozoa." J Anim Sci **89**(10): 2995-3007.

Chang, H., J. J. Sheng, L. Zhang, Z. J. Yue, B. Jiao, J. S. Li and Z. B. Yu (2015). "ROS-Induced Nuclear Translocation of Calpain-2 Facilitates Cardiomyocyte Apoptosis in Tail-Suspended Rats." J Cell Biochem **116**(10): 2258-2269.

Cheng, G., Z. Cao, X. Xu, E. G. van Meir and J. D. Lambeth (2001). "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5." Gene **269**(1-2): 131-140.

D'Autreaux, B. and M. B. Toledano (2007). "ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 813-824.

Dao, V. T., M. H. Elbatrek, S. Altenhofer, A. I. Casas, M. P. Pachado, C. T. Neullens, U. G. Knaus and H. Schmidt (2020). "Isoform-selective NADPH oxidase inhibitor panel for pharmacological target validation." Free Radic Biol Med **148**: 60-69.

de Lamirande, E. and C. O'Flaherty (2008). "Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases." Biochim Biophys Acta **1784**(1): 106-115.

Dei Zotti, F., R. Verdoy, D. Brusa, Lobysheva, II and J. L. Balligand (2020). "Redox regulation of nitrosyl-hemoglobin in human erythrocytes." Redox Biol **34**: 101399.

Delgado-Buenrostro, N. L., E. O. Hernandez-Gonzalez, M. Segura-Nieto and A. Mujica (2005). "Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins." Mol Reprod Dev **70**(2): 198-210.

Diebold, B. A. and G. M. Bokoch (2001). "Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase." Nat Immunol **2**(3): 211-215.

Du Plessis, S. S., A. Agarwal, J. Halabi and E. Tvrda (2015). "Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function." J Assist Reprod Genet **32**(4): 509-520.

Ford, W. C. (2004). "Regulation of sperm function by reactive oxygen species." Hum Reprod Update **10**(5): 387-399.

Gadella, B. M. and R. A. Harrison (2002). "Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells." Biol Reprod **67**(1): 340-350.

Gavazzi, G., B. Banfi, C. Deffert, L. Fiette, M. Schappi, F. Herrmann and K. H. Krause (2006). "Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice." FEBS Lett **580**(2): 497-504.

Ghanbari, H., S. Keshtgar, H. R. Zare and B. Ghaheri-Fard (2019). "Inhibition of CatSper and Hv1 Channels and NOX5 Enzyme Affect Progesterone-Induced Increase of Intracellular Calcium Concentration and ROS Generation in Human Sperm." Iran J Med Sci **44**(2): 127-134.

Giorgi, C., C. Agnoletto, C. Baldini, A. Bononi, M. Bonora, S. Marchi, S. Missiroli, S. Patergnani, F. Poletti, A. Rimessi, B. Zavan and P. Pinton (2010). "Redox control of protein kinase C: cell- and disease-specific aspects." Antioxid Redox Signal **13**(7): 1051-1085.

Gonzalez-Fernandez, L., C. Ortega-Ferrusola, B. Macias-Garcia, G. M. Salido, F. J. Pena and J. A. Tapia (2009). "Identification of protein tyrosine phosphatases and dual-specificity phosphatases in mammalian spermatozoa and their role in sperm motility and protein tyrosine phosphorylation." Biol Reprod **80**(6): 1239-1252.

Guemez-Gamboa, A., A. M. Estrada-Sanchez, T. Montiel, B. Paramo, L. Massieu and J. Moran (2011). "Activation of NOX2 by the stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors contributes to glutamate neurotoxicity in vivo through the production of reactive oxygen species and calpain activation." J Neuropathol Exp Neurol **70**(11): 1020-1035.

Huo, C., Y. Liu, X. Li, R. Xu, X. Jia, L. Hou and X. Wang (2021). "LRRC8A contributes to angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by interacting with NADPH oxidases via the C-terminal leucine-rich repeat domain." Free Radic Biol Med **165**: 191-202.

J.P. Kehrer, J. D. R., C.V. Smith (2010). 1.14 - Free Radicals and Reactive Oxygen Species, Elsevier.

Lambeth, J. D. (2004). "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen." Nat Rev Immunol **4**(3): 181-189.

Lewis, B. and R. J. Aitken (2001). "A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa." J Androl **22**(4): 611-622.

Liang, L., H. Li, T. Cao, L. Qu, L. Zhang, G. C. Fan, P. A. Greer, J. Li, D. L. Jones and T. Peng (2020). "Calpain activation mediates microgravity-induced myocardial abnormalities in mice via p38 and ERK1/2 MAPK pathways." J Biol Chem **295**(49): 16840-16851.

Maldonado-Garcia, D., M. L. Salgado-Lucio, A. L. Roa-Espitia, T. Reyes-Miguel and E. O. Hernandez-Gonzalez (2017). "Calpain inhibition prevents flotillin re-ordering and Src family activation during capacitation." Cell Tissue Res **369**(2): 395-412.

Mortimer, S. T. (1997). "A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals." Hum Reprod Update **3**(5): 403-439.

Mostowy, S. and P. Cossart (2012). "Septins: the fourth component of the cytoskeleton." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(3): 183-194.

Musset, B., R. A. Clark, T. E. DeCoursey, G. L. Petheo, M. Geiszt, Y. Chen, J. E. Cornell, C. A. Eddy, R. G. Brzyski and A. El Jamali (2012). "NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation." J Biol Chem **287**(12): 9376-9388.

Nunes, P., N. Demareux and M. C. Dinauer (2013). "Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis." Traffic **14**(11): 1118-1131.

O'Flaherty, C. and D. Matsushita-Fournier (2017). "Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa." Biol Reprod **97**(4): 577-585.

Ono, Y. and H. Sorimachi (2012). "Calpains: an elaborate proteolytic system." Biochim Biophys Acta **1824**(1): 224-236.

Ostman, A., J. Frijhoff, A. Sandin and F. D. Bohmer (2011). "Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation." J Biochem **150**(4): 345-356.

Ozaki, Y., K. Blomgren, M. S. Ogasawara, K. Aoki, T. Furuno, M. Nakanishi, M. Sasaki and K. Suzumori (2001). "Role of calpain in human sperm activated by progesterone for fertilization." Biol Chem **382**(5): 831-838.

Paffenholz, R., R. A. Bergstrom, F. Pasutto, P. Wabnitz, R. J. Munroe, W. Jagla, U. Heinzmann, A. Marquardt, A. Bareiss, J. Laufs, A. Russ, G. Stumm, J. C. Schimenti and D. E. Bergstrom (2004). "Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase." Genes Dev **18**(5): 486-491.

Paramo, B., T. Montiel, D. R. Hernandez-Espinosa, M. Rivera-Martinez, J. Moran and L. Massieu (2013). "Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage." Int J Biochem Cell Biol **45**(11): 2596-2604.

Puga Molina, L. C., G. M. Luque, P. A. Balestrini, C. I. Marin-Briggiler, A. Romarowski and M. G. Buffone (2018). "Molecular Basis of Human Sperm Capacitation." Front Cell Dev Biol **6**: 72.

Ramirez-Ramirez, D., M. L. Salgado-Lucio, A. L. Roa-Espitia, R. Fierro, H. Gonzalez-Marquez, J. Cordero-Martinez and E. O. Hernandez-Gonzalez (2020). "Rac1 is necessary for capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa." J Cell Biochem **121**(4): 2864-2876.

Ray, P. D., B. W. Huang and Y. Tsuji (2012). "Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling." Cell Signal **24**(5): 981-990.

Rivlin, J., J. Mendel, S. Rubinstein, N. Etkovitz and H. Breitbart (2004). "Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction." Biol Reprod **70**(2): 518-522.

Rojas, F. J. and I. Moretti-Rojas (2000). "Involvement of the calcium-specific protease, calpain, in the fertilizing capacity of human spermatozoa." Int J Androl **23**(3): 163-168.

Sabeur, K. and B. A. Ball (2007). "Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa." Reproduction **134**(2): 263-270.

Serafini, S. and C. O'Flaherty (2022). "Redox Regulation to Modulate Phosphorylation Events in Human Spermatozoa." Antioxid Redox Signal **37**(7-9): 437-450.

Setyawan, E. M. N., M. J. Kim, H. J. Oh, G. A. Kim, Y. K. Jo, S. H. Lee, Y. B. Choi and B. C. Lee (2016). "Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation." Biochem Biophys Res Commun **479**(4): 927-932.

Shan, L., J. Li, M. Wei, J. Ma, L. Wan, W. Zhu, Y. Li, H. Zhu, J. M. Arnold and T. Peng (2010). "Disruption of Rac1 signaling reduces ischemia-reperfusion injury in the diabetic heart by inhibiting calpain." Free Radic Biol Med **49**(11): 1804-1814.

Shoeb, M., M. Laloraya and P. G. Kumar (2010). "Progesterone-induced reorganisation of NOX-2 components in membrane rafts is critical for sperm functioning in *Capra hircus*." Andrologia **42**(6): 356-365.

Shukla, S., R. K. Jha, M. Laloraya and P. G. Kumar (2005). "Identification of non-mitochondrial NADPH oxidase and the spatio-temporal organization of its components in mouse spermatozoa." Biochem Biophys Res Commun **331**(2): 476-483.

Stival, C., C. Puga Molina Ldel, B. Paudel, M. G. Buffone, P. E. Visconti and D. Krapf (2016). "Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm." Adv Anat Embryol Cell Biol **220**: 93-106.

Suarez, S. S. and A. A. Pacey (2006). "Sperm transport in the female reproductive tract." Hum Reprod Update **12**(1): 23-37.

Toshimori, K. (2003). "Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue." Microsc Res Tech **61**(1): 1-6.

Tramer, F., F. Rocco, F. Micali, G. Sandri and E. Panfili (1998). "Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa." Biol Reprod **59**(4): 753-758.

Ueyama, T., M. Geiszt and T. L. Leto (2006). "Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases." Mol Cell Biol **26**(6): 2160-2174.

Vatannejad, A., H. Tavilani, M. R. Sadeghi, M. Karimi, N. Lakpour, S. Amanpour, M. Shabani Nashtaei and M. Doosti (2019). "Evaluation of the NOX5 protein expression and oxidative stress in sperm from asthenozoospermic men compared to normozoospermic men." J Endocrinol Invest **42**(10): 1181-1189.

Vieceli Dalla Sega, F., L. Zambonin, D. Fiorentini, B. Rizzo, C. Caliceti, L. Landi, S. Hrelia and C. Prata (2014). "Specific aquaporins facilitate Nox-produced hydrogen peroxide transport through plasma membrane in leukaemia cells." Biochim Biophys Acta.

Visconti, P. E. (2009). "Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(3): 667-668.

Visconti, P. E., V. A. Westbrook, O. Chertihin, I. Demarco, S. Sleight and A. B. Diekman (2002). "Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity." J Reprod Immunol **53**(1-2): 133-150.

Wang, J., Y. Bai, X. Zhao, J. Ru, N. Kang, T. Tian, L. Tang, Y. An and P. Li (2018). "oxLDL-mediated cellular senescence is associated with increased NADPH oxidase p47phox recruitment to caveolae." Biosci Rep **38**(3).

Ward, C. R. and B. T. Storey (1984). "Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay." Dev Biol **104**(2): 287-296.

Winterbourn, C. C. (2008). "Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species." Nat Chem Biol **4**(5): 278-286.

Yanagimachi, R. and M. C. Chang (1963). "Fertilization of Hamster Eggs in Vitro." Nature **200**: 281-282.

Zhang, J., C. Kong, H. Xie, P. S. McPherson, S. Grinstein and W. S. Trimble (1999). "Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP." Curr Biol **9**(24): 1458-1467.

# Anexo I (Medios, soluciones y reactivos)

## Solución isotónica (NaCl a 0.154 M)

Diluir 4.5 g de NaCl en 500 mL de agua destilada

## Medios mínimos de capacitación espermática

	MCM-PL	T-G
NaCl	102.3	116.73
KCl	-	2.80
CaCl <sub>2</sub>	1.71	1.80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	-	0.36
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	-
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0.49
NaHCO <sub>3</sub>	25.07	11.90
Piruvato de sodio	0.25	-
Lactato de sodio	20.00	-
Glucosa	5.56	5.56
Osmolalidad (mOsm/kg)	306	316

El pH de los medios de capacitación es de 7.4, en el medio de capacitación que carece de NaHCO<sub>3</sub> para regular el pH se utilizará HEPES.

## PBS 10X

Para preparar el PBS a 10X pH 7.4 (para un litro)

a. Se pesan los siguientes reactivos:

Cloruro de Sodio (NaCl)= 80 g

Fosfato de Potasio Monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)= 2 g

Fosfato de Sodio Dibásico 7•hidrato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O)= 21.7 g

Cloruro de Potasio (KCl)= 2 g

b. Los reactivos Se disuelven en 950 mL de agua desionizada con ayuda de un agitador magnético.

c. Se ajusta el pH a 7.4

d. Se afora a 1000 mL con agua desionizada. Se pasa el PBS a un recipiente para almacenarlo.

### **PBS-Tritón X 100 al 0.1%**

Tomar 99 mL de PBS 1X y 1 mL de tritón X-100 y homogenizar.

### **Amortiguador de lisis para proteínas fosforiladas**

Para preparar 2 mL, A 550  $\mu$ L de los componentes del amortiguador de lisis, poner lo que lo que resta de PBS (1450  $\mu$ L)

<b>COMPONENTES</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>STOCKS</b>	<b>[ ] DESEADA</b>
<b>NP 40</b>	20 $\mu$ L		
<b>IODEACETAMIDA</b>	20 $\mu$ L	1 mg/mL	10 $\mu$ g/mL
<b>INHIBIDOR DE TRIPSINA</b>	5 $\mu$ L	1 mg/mL	2.5 $\mu$ g/mL
<b>BENZAMIDINA</b>	100 $\mu$ L	1 mg/mL	50 $\mu$ g/mL
<b>PEPTATINA</b>	15 $\mu$ L	2 mg/mL	6 $\mu$ g/mL
<b>LEUPEPTINA</b>	15 $\mu$ L	2 mg/mL	6 $\mu$ g/mL
<b>APROTININA</b>	15 $\mu$ L	12 mg/mL	12 $\mu$ g/mL
<b>PMSF 10X</b>	50 $\mu$ L	10X (DMSO)	1 nM
<b>COMPLETE</b>	50 $\mu$ L	1 tableta /1 mL de H <sub>2</sub> O	
<b>ORTOVANADATO DE NA+</b>	40 $\mu$ L	1 mM	1 nM
<b>NAF+</b>	20 $\mu$ L	10 mM	10 $\mu$ M
<b>GLICEROL</b>	200 $\mu$ L	Directo	10%
<b>SUMA</b>	550 $\mu$ L		

### **RIPA:**

Para 25 mL

0.0755 g en 25 mL de agua Tris HCl= 25 mM a pH 7.6

Los demás reactivos se diluyen aquí:

0.219 g de NaCl= 150 mM

0.250 g de Deoxicolato de Na= 1%

0.0250 g de SDS= 0.1%

0.250 mL de NP40= 1%

### **Solución de CTC**

Para la solución de dilución, se pesan:

0.189 g de NaCl

0.02195 g de Cysteina

0.060 g de Trizma Base

Se diluyen en agua destilada y se ajusta el pH a 7.8

Se afora a 25 mL con agua destilada.

Se pesa 0.004 g de CTC-HCL de Sigma, la cual se diluirá en 1 mL de la solución anteriormente preparada.

### **Glutaraldehido (12.5 %) –Tris 1 M**

En tubo eppendorf se diluyen 100  $\mu$ L de glutaraldehido al 25% y 100  $\mu$ L de TRIS-HCL 1 M pH 7.4

### **Solución fijadora: Formaldehído al 4% y Glutaraldehido al 0.2%**

Del Gultaraldehido al 25% se tomarón 800  $\mu$ L para obtener una concentración de 0.2%

Del Formaldehido al 36% se tomarón 8.3 mL para obtener una concentración al 4%

Se afora a 100 mL con PBS 1X

### **Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) a 50 mM**

Se pesan 0.1337 g de NH<sub>4</sub>Cl

Se diluirán en 50 mL de PBS 1X

### **Solución Bloqueadora:**

BSA al 1% diluida en PBS 1X

### **Solución Stripping**

Para 1 Litro

Se pesa 7.5 g Glicina para tener 25 mM

Se pesa 9 g de NaCl para tene 0.9% w/v

Se disuelve en agua destilada y se ajusta el pH a 2.3

10 g de SDS 1% w/v

Aforar a un litro.

# Anexo II (Artículo)



International Journal of  
Molecular Sciences



Article

## Calpain Regulates Reactive Oxygen Species Production during Capacitation through the Activation of NOX2 and NOX4

César I. Ortiz-García <sup>1</sup>, Monica L. Salgado-Lucio <sup>1,2</sup>, Ana L. Roa-Espitia <sup>1</sup>, Aidé A. Muñoz-Sánchez <sup>1</sup>, Joaquín Cordero-Martínez <sup>3</sup> and Enrique O. Hernández-González <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Cell Biology, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero, México City 07360, Mexico

<sup>2</sup> Department of Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Colonia Vicentina, Alcaldía Iztapalapa, México City 09310, Mexico

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación Manuel Carpio y Plan de Ayala s/n Col, Santo Tomás, Del. Miguel Hidalgo, México City 11340, Mexico

\* Correspondence: enrique.hernandez@cinvestav.mx; Tel.: +52-55-5747-3352

**Abstract:** Capacitation is a series of physiological, biochemical, and metabolic changes experienced by mammalian spermatozoa. These changes enable them to fertilize eggs. The capacitation prepares the spermatozoa to undergo the acrosomal reaction and hyperactivated motility. Several mechanisms that regulate capacitation are known, although they have not been fully disclosed; among them, reactive oxygen species (ROS) play an essential role in the normal development of capacitation. NADPH oxidases (NOXs) are a family of enzymes responsible for ROS production. Although their presence in mammalian sperm is known, little is known about their participation in sperm physiology. This work aimed to identify the NOXs related to the production of ROS in guinea pig and mouse spermatozoa and define their participation in capacitation, acrosomal reaction, and motility. Additionally, a mechanism for NOXs' activation during capacitation was established. The results show that guinea pig and mouse spermatozoa express NOX2 and NOX4, which initiate ROS production during capacitation. NOXs inhibition by VAS2870 led to an early increase in the capacitation and intracellular concentration of Ca<sup>2+</sup> in such a way that the spermatozoa also presented an early acrosome reaction. In addition, the inhibition of NOX2 and NOX4 reduced progressive motility and hyperactive motility. NOX2 and NOX4 were found to interact with each other prior to capacitation. This interaction was interrupted during capacitation and correlated with the increase in ROS. Interestingly, the association between NOX2-NOX4 and their activation depends on calpain activation, since the inhibition of this Ca<sup>2+</sup>-dependent protease prevents NOX2-NOX4 from dissociating and ROS production. The results indicate that NOX2 and NOX4 could be the most important ROS producers during guinea pig and mouse sperm capacitation and that their activation depends on calpain.

**Keywords:** NADPH oxidases; ROS production; capacitation; acrosome reaction; mobility; calcium; calpain



**Citation:** Ortiz-García, C.I.; Salgado-Lucio, M.L.; Roa-Espitia, A.L.; Muñoz-Sánchez, A.A.; Cordero-Martínez, J.; Hernández-González, E.O. Calpain Regulates Reactive Oxygen Species Production during Capacitation through the Activation of NOX2 and NOX4. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3980. <https://doi.org/10.3390/ijms24043980>

Academic Editor: Hung-Yao Ho

Received: 29 November 2022

Revised: 5 February 2023

Accepted: 9 February 2023

Published: 16 February 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

In vivo reactive oxygen species (ROS) are a secondary product in many cellular processes, such as the electron transport chain, lipid peroxidation, and the xanthine oxidase system. The traditional views of ROS only address their roles related to aging and disease. However, in recent years, they have gained attention as signaling molecules in many physiological processes, such as cell differentiation, vascular pressure regulation, and sperm physiological maturation, i.e., capacitation and hyperactivation [1].

ROS include dioxygen ( $O_2$ ) molecules reduced by one (radical) or two (nonradical) electrons, and these are classified by their reduction potential. Superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) are ROS that have the potential to serve as second messengers because cells have specialized systems for ROS production, such as the NADPH oxidase (NOX) system [1,2]. NOXs catalyze ROS production by transferring electrons from NADPH to  $O_2$  in a highly regulated manner. NOXs' function and regulation were first described in phagocytic cells. The phagocytic ROS production system Nox2/gp91<sup>phox</sup> is composed of several subunits: the catalytic and transmembrane subunit flavocytochrome b588 integrated by Nox2/gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup>, and the cytosolic and regulatory proteins p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, as well as the small GTPase, Rac1 [2,3].

In mammalian sperm processes such as capacitation, acrosome reaction and motility are sensitive to ROS such as  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ , and nitric oxide (NO) [4,5]. Human spermatozoa were the first cells in which physiological ROS production was reported [6]. The detection of NOX5, whose activity is calcium-dependent, is responsible for the oxidative stress produced during capacitation and regulates capacitation and motility in human spermatozoa [7]. However, in other mammals, such as rodents (i.e., mice, rats, and guinea pigs), the *nox5* gene is absent from their genomes [2]. Even so, ROS production has been reported in mouse and rat spermatozoa. Members of the NOX family, NOX2 and NOX3, respectively, have been observed in sperm cells, which suggests that ROS production by NOX family members plays a significant role in physiological processes, such as capacitation, acrosome reaction, and mobility development [7–9]. Interestingly, the NOX1 and NOX2 activator p67<sup>phox</sup> is a Rac1 target, so Rac is essential to regulate NOX1 and NOX2 activity [2,3].

ROS production through NADPH oxidases has been correlated with the activation of calcium-dependent proteases and calpains [10,11]. Calpain activity is essential for fertilization [12], since it allows mammalian spermatozoa to acquire their fertilizing ability by participating in physiological processes such as capacitation, acrosomal reaction, and sperm mobility [13–17], as well as in fowl sperm mobility [18]. Calpains-1 and -2 are the two isoforms of the calpain family members found in human, mouse, and guinea pig spermatozoa [12,14,17]. Although the mechanism by which these proteases regulate capacitation, acrosomal reaction, and mobility is not well understood, calpain-1 is known to regulate remodeling of the spectrin cytoskeleton [14], lipid raft rearrangement, and activation of the Src kinase family [15].

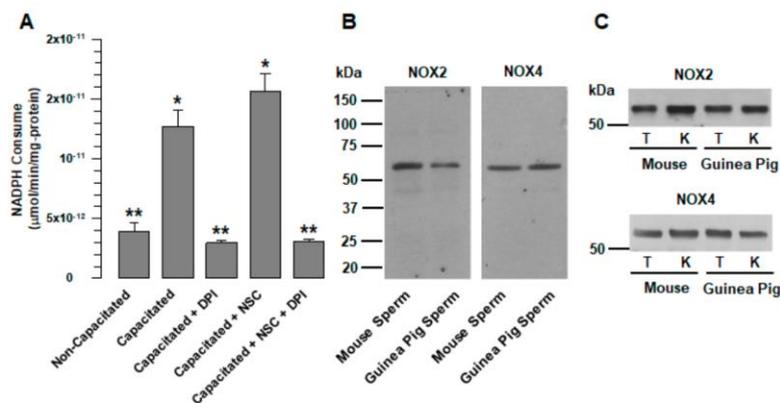
Given the existence of multiple members of the NOX family in mammal cells, and the presence of calpains [13–17] and Rac1 [19,20] in mammalian spermatozoa, as well as the importance of ROS in several sperm processes that prepare them for fertilization, such as capacitation, acrosomal reaction, and mobility [21], the objective of this work was to determine which members of the NOX family are responsible for the production of ROS in guinea pig spermatozoa. Furthermore, we examined the participation of ROS produced by NOX in capacitation, acrosomal reaction, and mobility, and whether the activity of the NOX present in guinea pig spermatozoa is dependent on calpain. The results showed that, unlike human and stallion spermatozoa [7,22], two different NOX members are present in guinea pig spermatozoa. We also found that the production of ROS by these NOXs is related to capacitation, acrosomal integrity, and mobility. The results also suggested that NOX2 and NOX4 interact in the non-capacitated state but not in the capacitated state. Such interactions and NOX activity are dependent on calpain activity.

## 2. Results

### 2.1. Guinea Pig and Mouse Spermatozoa Express Two Different Flavoproteins Implicated in NADPH Consumption

The correct capacitation in many mammalian spermatozoa is strongly related to ROS production. First, our work focused on determining which NOX family proteins are involved in ROS production and function during capacitation and the role that ROS play in guinea pig spermatozoa. In this way, we quantified the specific NADPH consumption ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ -protein) in native total protein extracts in the presence of ROS production

inhibitors at different levels using diphenyl iodonium (DPI), a general flavoprotein inhibitor, and the Rac1 inhibitor NSC23766, which prevents Rac1 activation and is necessary for the activation of Nox1 and 2. This assay revealed that NADPH consumption in native total extracts was significantly increased under conditions of capacitation due to a flavo-protein system, while DPI abolished NADPH consumption (Figure 1A). The Rac1 inhibitor (NSC23766) was unable to prevent NADPH consumption; conversely, the consumption levels of NADPH were higher, although not significant, compared to those shown in the extracts of capacitated spermatozoa, a rise that was inhibited by DPI (Figure 1A). These results suggest the presence of a flavoprotein system composed of at least two different flavoproteins, which consume NADPH in spermatoc native total extracts. Rac1 regulates one of the NOXs (1 or 2), while the other would show independent Rac1 activity.

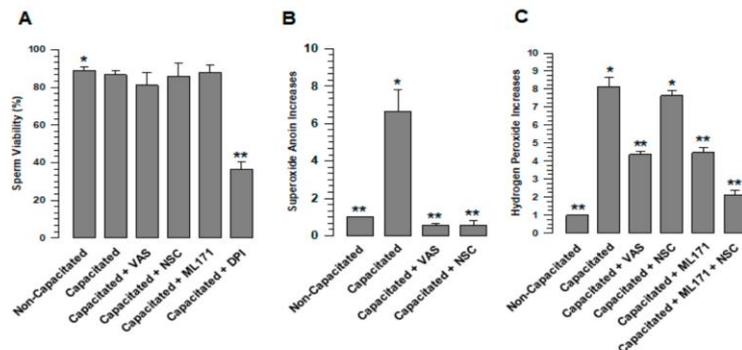


**Figure 1.** Guinea pig and mouse spermatozoa express two different NOXs. (A) Consumption of NADPH in total native protein extracts of guinea pig spermatozoa. The consumption of NADPH was assessed in both non-capacitated and capacitated spermatozoa in the absence and presence of DPI (10 μM) and NSC (NSC23766 100 μM). The results are expressed as the ratio  $N/N_0$ , where  $N$  is the total amount of NADPH that is consumed and  $N_0$  is the total quantity of NADPH that is consumed in the non-capacitated assay. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ , comparing (\*) concerning (\*\*). (B) Detection of NOX2 and NOX4 in guinea pig and mouse spermatozoa. Proteins from whole spermatozoa extracts (300 μg) were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The proteins were detected using specific antibodies against NOX2 and NOX4. MS: Mouse spermatozoa. GPS: Guinea pig spermatozoa. (C) Detection of NOX2 and NOX4 in guinea pig and mouse testes and kidneys. Proteins from whole extracts of guinea pig and mouse testes and kidneys were used to determine antibody specificity. T: Testis. K: kidney. Images are representative of three independent experiments. The representative Wb images (B,C) of three independent experiments for NOXs detection are shown.

We hypothesize that NOX2 and NOX4 are the two NOX that are related to ROS production in guinea pig spermatozoa. The reasons for this suggestion are as follows: NOX2 has been found in rodents' spermatozoa, such as that of mice and rats; NOX4 produces constitutively large amounts of peroxide and is not regulated by Rac1. This hypothesis was confirmed by Wb: using specific antibodies that recognize NOX2 and NOX4, we detected protein bands of approximately 65 kDa for both NOX2 and NOX4 in guinea pig and mouse spermatozoa (Figure 1B). Similar protein bands were detected in the testicles and kidneys of guinea pigs and mice (Figure 1C).

## 2.2. DPI Affects Sperm Viability

With the aim of learning the effects of NOX antagonists on sperm viability, this was evaluated by PI assay. The test results show no significant differences between non-capacitated, capacitated, and capacitated sperm in the presence of VAS2870, NSC23766, or ML171 (Figure 2A). However, DPI clearly decreased sperm viability with respect to those not treated with DPI (Figure 2A). For this reason, this NOX inhibitor was not used in tests carried out in vivo.



**Figure 2.** ROS production in sperm increases during capacitation. The status of ROS production was determined in guinea pig spermatozoa; they were capacitated for 60 min in the absence and presence of VAS (VAS2870 40  $\mu$ M) or NSC (NSC23766 100  $\mu$ M) or/and ML171 (2  $\mu$ M), then  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  were assessed. (A) VAS2870, NSC23766, and ML171 did not alter sperm viability. (B) Increase in  $O_2^{\bullet-}$  production during capacitation. (C) Increase in  $H_2O_2$  production during capacitation. The results are expressed in the ratio  $N/N_0$ , where N is the total amount of  $O_2^{\bullet-}$  or  $H_2O_2$  produced in each assay and  $N_0$  is the total quantity of  $O_2^{\bullet-}$  or  $H_2O_2$  produced by non-capacitated assay. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ , comparing (\*) concerning (\*\*).

## 2.3. NADPH Oxidase Inhibition Abolishes ROS Production during Capacitation

To determine whether ROS ( $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$ ) are produced during capacitation by NOXs, spermatozoa were capacitated, and  $H_2O_2$  and  $O_2^{\bullet-}$  were evaluated. The results showed that spermatozoa in a non-capacitated state produce a basal level of  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  and, after 60 min of capacitation, the levels of  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  significantly increased (Figure 2B,C). To define whether the increases in  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  are a consequence of NOX activity, VAS2870, a pan-NOX inhibitor, and NSC23766, a specific Rac1 inhibitor, were tested. The  $O_2^{\bullet-}$  increase experienced by spermatozoa during capacitation was inhibited by VAS2870 and NSC23766, maintaining similar levels to those observed in non-capacitated spermatozoa (Figure 2B). These results suggest that NOX2 is active in guinea pig spermatozoa. In the case of  $H_2O_2$ , the increase experienced by spermatozoa during capacitation was significantly inhibited when spermatozoa were capacitated in the presence of VAS2870, while NSC23766 did not inhibit  $H_2O_2$  production, suggesting that NOX4 remains active (Figure 2C). To confirm that this increase in  $H_2O_2$  production is the consequence of NOX4 activity, sperm capacitation was performed in the presence of ML171 (2  $\mu$ M), a more specific inhibitor for NOX4. ML171 significantly inhibited  $H_2O_2$  production regarding the spermatozoa that were capacitated in the absence of ML171 (Figure 2C); however,  $H_2O_2$  production in the presence of ML171 is significantly ( $p < 0.01$ ) higher when considering non-capacitated spermatozoa (Figure 2C). Possibly, this  $H_2O_2$  is produced by NOX2, which is not affected by ML171. NSC23766 and ML171 were tested during capacitation, finding a reduction in  $H_2O_2$  to levels that were very similar to the

non-capacitated spermatozoa (Figure 2C). These did not show a significant difference. Together, these results indicate that NOX2 and NOX4 are the main producers of ROS in mammalian spermatozoa.

#### 2.4. The Effects of Inhibiting ROS Production on Sperm Physiology

During capacitation, the levels of different ROS rose, exerting a positive effect on capacitation. Interfering with the generation of these ROS impairs capacitation and other sperm processes, such as the acrosomal reaction and hypermotility. To define whether ROS generation by NOX2 and NOX4 in guinea pig spermatozoa is essential for capacitation, spontaneous acrosomal reaction (sAR) and motility, they were valued in spermatozoa capacitated in the presence of VAS2870 (40  $\mu$ M).

##### 2.4.1. Capacitation

The evaluation using the CTC assay showed that, under conditions of capacitation, pattern B slowly increased during the first minutes of incubation. After 15 min of incubation, the percentage of spermatozoa showing pattern B rapidly increased, reaching a maximum at 30 min of incubation (Figure 3A). After 60 min of capacitation, the rate of pattern B decreased, probably as a consequence of the increase in the number of spermatozoa that showed pattern AR (Figure 3B). Unlike the control, spermatozoa capacitated in the presence of VAS2870 showed a rapid rise in pattern B, reaching its maximum at 15 min of incubation. The percentage of pattern B rapidly decreased (Figure 3A), perhaps due to the rapid increase in the AR pattern (Figure 3B). These results suggest that the inhibition of NOX2 and NOX4 accelerates capacitation.

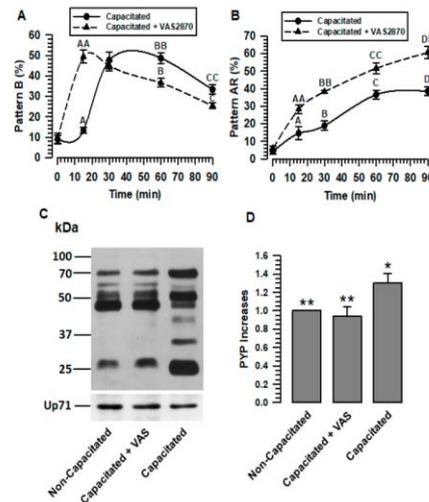
The effect of the inhibition of ROS production on capacitation is usually assessed using the protein tyrosine phosphorylation assay (PYP). The results show that the inhibition of ROS generation during capacitation prevents PYP. To determine whether PYP occurs during NOX inhibition, PYP was valued. Thus, spermatozoa capacitated in the presence of VAS2870 (40  $\mu$ M) showed PYP levels similar to non-capacitated spermatozoa, which are significantly lower than those presented by spermatozoa capacitated in the absence of VAS2870 (Figure 3C,D). These results confirm that inhibiting ROS generation during capacitation prevents PYP.

##### 2.4.2. Spontaneous Acrosomal Reaction

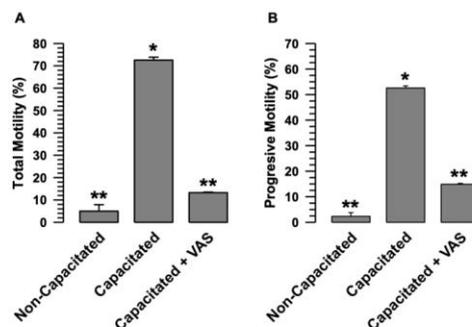
CTC evaluation shows that, in spermatozoa capacitated in the presence of VAS2870, the pattern AR rapidly increased, reaching significantly higher levels than those capacitated in the absence of VAS2870 (Figure 3B). This result may be a consequence of the rapid increase in pattern B that occurred during capacitation in the presence of VAS2870.

##### 2.4.3. Motility

To determine the effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>•-</sup> on motility, total motility and progressive motility were assessed in capacitated spermatozoa in the presence of VAS2870. The results revealed a significant increase in both parameters in capacitated compared to non-capacitated spermatozoa (Figure 4A,B). The total and progressive motility in the presence of VAS2870 significantly inhibited this increase (Figure 4A,B).



**Figure 3.** The activity of sperm NOXs is important for capacitation and acrosomal reactions. The role of NOX in guinea pig sperm physiology was defined by incubating them under capacitating conditions for 60 min, either in the absence or presence of VAS (VAS2870 40  $\mu$ M). Capacitation was evaluated by CTC techniques, and protein tyrosine phosphorylation patterns (PYP) were determined by immunoblotting using a specific anti-p-Y antibody. (A) Assessment of pattern B by CTC. (B) Evaluation of the A.R. pattern by CTC. (C) Determination of PYP increases by immunoblotting in non-capacitated or capacitated spermatozoa in the absence and presence of VAS (VAS2870 40  $\mu$ M). Up71 was used as a loading control. The representative Wb image of three independent experiments for PYP is shown. (D) Densitometric assessment of PYP. The results are expressed as the ratio N/N<sub>0</sub>, where N is the total amount of PYP and N<sub>0</sub> is the total PYP quantity of non-capacitated. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ , comparing (\*) concerning (\*\*).

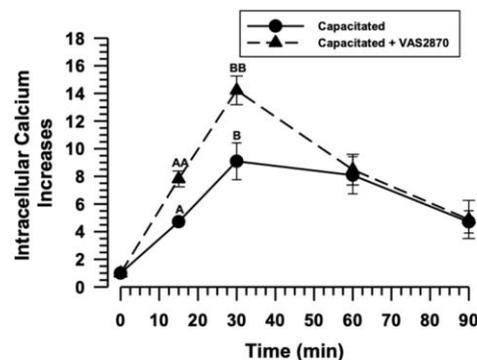


**Figure 4.** The activity of sperm NOXs is relevant to sperm motility. The role of NOXs in motility was determined; guinea pig spermatozoa were incubated under capacitative conditions in the absence and presence of VAS (VAS2870 40  $\mu$ M). Sperm motility was assessed by CASA. (A) Total motility. (B) Progressive motility. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ , comparing (\*) concerning (\*\*).

In summary, these results demonstrated that, during capacitation, the inhibition of  $O_2^{\bullet -}$  and  $H_2O_2$  production by VAS2870 significantly affects the physiology of guinea pig spermatozoa.

#### 2.5. ROS Reduction by NOX Inhibition Increases Intracellular $Ca^{2+}$

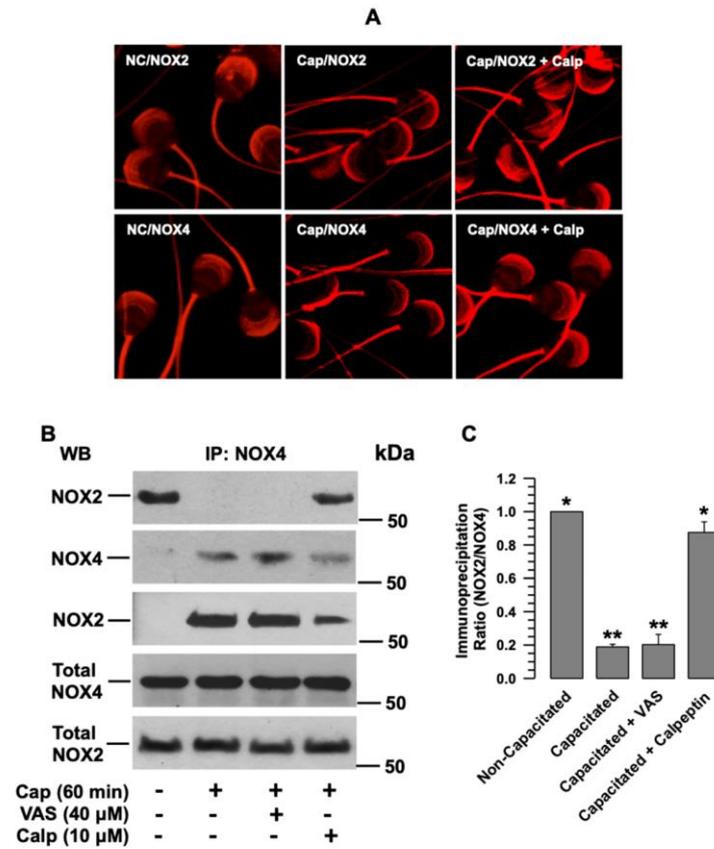
The PYP results suggest that capacitation is inhibited when sperm are incubated in the presence of VAS2870. Despite this, sAR is increased early (Figure 3B), suggesting that calcium influx is not altered by NOX inhibition. To confirm this hypothesis, the  $[Ca^{2+}]_i$  during capacitation was assessed in the presence or absence of VAS2870 (40  $\mu$ M). The results show that the  $[Ca^{2+}]_i$  gradually increased in capacitated spermatozoa. It reached its maximum at 30 min of incubation and remained at these levels until 60 min of capacitation (Figure 5). After 60 min, the  $[Ca^{2+}]_i$  rapidly declined due to sAR, while the  $[Ca^{2+}]_i$  quickly increased in spermatozoa capacitated in the VAS2870 presence, reaching a maximum at 30 min of incubation and rapidly decaying after this time (Figure 5).  $[Ca^{2+}]_i$  at 15 and 30 min of capacitation in the presence of VAS2870 is significantly higher than the  $[Ca^{2+}]_i$  in the absence of VAS2870 (Figure 5). Capacitated spermatozoa in the presence of VAS2870 may experience early capacitation and sAR.



**Figure 5.** NOX inhibition during capacitation does not affect  $Ca^{2+}$  influx. The role of NOXs  $Ca^{2+}$  influx during capacitation was determined in guinea pig spermatozoa. The sperm were incubated under capacitation conditions in the absence and presence of VAS2870 (40  $\mu$ M). The  $[Ca^{2+}]_i$  was recorded at different incubation times by spectrofluorimetry using Fluo-3AM. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ , comparing (A or B) concerning (AA or BB).

#### 2.6. NOX2 and NOX4 Alter Their Subcellular Localization during Capacitation

To determine whether NOX2 and NOX4 exhibit differential subcellular localization, both proteins were immunolocalized in non-capacitated and capacitated spermatozoa. NOX2 and NOX4 were scattered throughout the acrosome and in the midpiece of the non-capacitated spermatozoa (Figure 1D). During capacitation, the NOX2 and NOX4 localized in the acrosome aggregated in the apical region (Figure 6A, middle panels). Since a relationship has been suggested between NOX2 and the  $Ca^{2+}$ -dependent protease calpain, and guinea pig spermatozoa express calpain 1, we investigated whether calpain activity was correlated with NOX aggregation in the apical region of the acrosome. To corroborate this hypothesis, spermatozoa were capacitated in the presence of a specific calpain inhibitor, calpeptin (10  $\mu$ M). The localization analysis of both NOXs showed that the inhibition of calpain blocked the aggregation of NOX2 and NOX4 (Figure 6A, right panels). Their localization was similar to that of the non-capacitated spermatozoa. Changes in NOX2 and NOX4 were not observed in the midpiece of the flagellum (Figure 6A).



**Figure 6.** The interaction between NOX2 and NOX4 is broken during capacitation and depends on calpain activity. (A) Localization of NOX2 and NOX4 in non-capacitated (N.C.) and capacitated (Cap) sperm, either in the absence or presence of calpeptin (Calp, 10  $\mu$ M). The images are representative of three independent experiments. (B) Coimmunoprecipitation of NOX2 with NOX4 in non-capacitated and capacitated (Cap) sperm in the absence and presence of VAS2870 (VAS) or calpeptin (Calp). The representative Wb image of three independent experiments for the co-immunoprecipitation assay is shown. (C) Densitometry of NOX2 coimmunoprecipitated with NOX4. The results are expressed as the ratio N/N0, where N is the total amount of NOX2 coimmunoprecipitated and N0 is the total quantity of NOX4 of each assay. Then, data were normalized concerning the non-capacitated data. VAS: VAS2870. Calp: Calpeptin. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ , comparing (\*) concerning (\*\*).

### 2.7. The Association between NOX2 and NOX4 Depends on Calpain

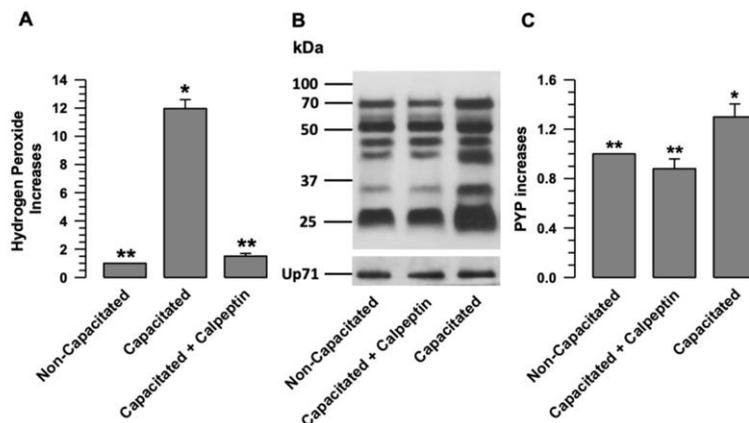
Since both NOXs aggregate at the same acrosome site, they could have a direct or indirect physical interaction. To test this hypothesis, we examined whether NOX2 coimmunoprecipitates with NOX4. The results showed that NOX2 coimmunoprecipitated with NOX4 in non-capacitated spermatozoa; however, this did not occur in capacitated spermatozoa (Figure 6B,C). These results indicate that NOX2 and NOX4 are associated

(NOX2-NOX4) in non-capacitated spermatozoa and lose this association during capacitation. When spermatozoa were capacitated in the presence of VAS2870, NOXs' dissociation was not interrupted (Figure 6B,C), suggesting that NOX2 and NOX4 dissociation does not depend on their activation but on a factor required for capacitation. When the coimmunoprecipitation assay was performed, using capacitated spermatozoa in the presence of calpeptin, NOX2 co-immunoprecipitated with NOX4, and these results suggest that calpain regulates the dissociation of NOX2-NOX4 (Figure 6A,B).

Analysis of the protein recovered after incubation with the agarose-Protein A/G-IgG anti-NOX4 beads supports the coimmunoprecipitation results. The Wb for NOX4 shows that most of the NOX4 in the sperm protein extract was associated with the beads in all assays (Figure 6B, second panel). In contrast, the Wb for NOX2 shows that this NOX was only retained on the beads in the assays of non-capacitated and capacitated in the presence of calpeptin (Figure 6B, third panel).

### 2.8. Interrupting the Separation of NOX2-NOX4 Prevents the Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Once we determined that calpains mediate the separation of NOX2-NOX4 during capacitation, we investigated whether the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by both NOXs depends on this separation process. We assessed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production during capacitation when calpain was inhibited by calpeptin. Figure 7 shows that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production significantly increases during capacitation (Figure 7A). This increase was significantly inhibited when the spermatozoa were capacitated in the presence of calpeptin (Figure 7A).



**Figure 7.** The activation of NOX2 and NOX4 depends on calpain activity. (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was assessed in non-capacitated or capacitated sperm in the absence and presence of calpeptin (Calp 10 μM). The results are expressed as the ratio N/N<sub>0</sub>, where N is the total amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced in each assay and N<sub>0</sub> is the total quantity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by non-capacitated assay. The results are expressed as the mean ± S.E. (n = 3). Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ , comparing (\*) concerning (\*\*). (B) Determination of PYP patterns by immunoblotting of non-capacitated or capacitated sperm in the absence and presence of the calpain inhibitor calpeptin (Calp 10 μM). Up71 was used as a loading control. The representative Wb image of three independent experiments for PYP is shown. (C) The results are expressed as the ratio N/N<sub>0</sub>, where N is the total amount of PYP and N<sub>0</sub> is the total PYP quantity of non-capacitated assay. Results are expressed as the mean ± S.E. (n = 3). Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ , comparing (\*) concerning (\*\*).

To determine whether calpain inhibition resulted in capacitation, PYP was assessed in capacitated spermatozoa in the absence and presence of calpeptin (10  $\mu$ M). The results showed a significant increase in PYP in capacitated spermatozoa compared to non-capacitated spermatozoa (Figure 7B,C). When the spermatozoa were capacitated in the presence of calpeptin, an increase in PYP did not occur (Figure 7C). The previous results suggest that calpain inhibition during capacitation prevents ROS production and PYP, with both processes related to capacitation.

### 3. Discussion

ROS production in mammalian spermatozoa is a consequence of the different signaling pathways in these cells. ROS activate other signaling pathways related to processes such as capacitation, acrosomal reaction, and motility [1,4,21]. Despite the physiological and pathological evidence of the effects of ROS on spermatozoa, the identity of the NADPH oxidases responsible for ROS production remains uncertain, although two different NOXs, NOX2 and NOX5, are present in mammalian spermatozoa [7,9,23–25]. The present work demonstrates clear evidence of the presence of two different NOXs in mouse and guinea pig spermatozoa, NOX2 and NOX4, which increase the levels of  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  during capacitation. The evidence presented here directly relates NOX2 and NOX4 to sperm processes, such as capacitation, spontaneous acrosomal reaction (sAR), and motility. Notably, our results reveal an unprecedented mechanism related to NOX family activation, specifically NOX2 and NOX4, which occurs during capacitation and involves the  $Ca^{2+}$ -dependent protease calpain.

Different reports suggest that ROS production in mammalian spermatozoa could be the consequence of a single member of the NOX family. NOX5 occurs in human, stallion, and canine spermatozoa [7,22,23,26], and NOX2 in mouse, rat and goat spermatozoa [8,9,25]. This suggestion is supported by the study by Musset et al., which demonstrated that human spermatozoa do not express NOX1, NOX2, or NOX4 [7]. Our results show that, as in other rodents [24,25], NOX2 is also expressed in guinea pig spermatozoa (Figure 1B). At the same time, analysis of the consumption of NADPH revealed the presence of another member of the NOX family in guinea pig spermatozoa, NOX4. ROS production by NOX2 requires active Rac1 [3]; therefore, the increase in NADPH consumption that occurs during capacitation (Figure 1A) was not suppressed by a specific Rac1 inhibitor (NSC23766). In contrast, NADPH consumption increased (Figure 1A); this is indicative of the presence of other NOXs not regulated by Rac1, and resulted in NOX4, which was corroborated by WB (Figure 1B) and immunolocalization (Figure 6A). It is possible that spermatozoa express not only NOX2 and NOX4 but also NOX1 and NOX3. Nevertheless, this remains to be clarified in a later study.

Our results show the presence of two different NOXs in guinea pigs and mouse spermatozoa, but further evidence also suggests that both NOX2 and NOX4 are active in guinea pig spermatozoa. In the case of NOX2, we know that the main product of this enzyme is the  $O_2^{\bullet-}$ , which is transmuted to  $H_2O_2$  [2]. NSC23766 and VAS2870 inhibit superoxide ion production at levels found in non-capacitated spermatozoa (Figure 2B). Thus, the production of the  $O_2^{\bullet-}$  is blocked by inhibiting Rac1, indicating that this anion is produced by a NOX dependent on Rac1, such as NOX2. However, Rac1 inhibition did not reduce  $H_2O_2$  levels; these were reduced by ML171 (Figure 2C), a more specific inhibitor for NOX4 that does not affect NOX2 activity [27]. Therefore, we suggest that the production of  $H_2O_2$  under this condition must be due to a NOX not dependent on Rac1, such as NOX4. The fact that NOX2 inhibition does not reduce  $H_2O_2$  levels during capacitation does not rule out the transmutation from  $O_2^{\bullet-}$  to  $H_2O_2$  under normal conditions. It is essential to consider that the reduction in  $H_2O_2$  levels compared to those observed for non-capacitated spermatozoa is only achieved when NSC23766 and ML171 were tested together (Figure 2C). In conclusion, our data clearly show that NOX2 and NOX4 are responsible for ROS production during capacitation.

The use of ML171 (2  $\mu\text{M}$ ) in this work implies the possibility that NOX1, NOX4, and NOX5 activity may be affected [27]. First, it is known that NOX5 is an NADPH oxidase exclusive to human beings [7]. Since the gene does not exist in organisms of the rodent order [2], there is no interference in the production of ROS in the spermatozoa of rodents such as guinea pigs and mice. In the case of NOX1, ML171 concentrations less than 0.5  $\mu\text{M}$  specifically inhibit NOX1 [28]. However, at these concentrations, the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  did not show changes concerning capacitated spermatozoa in the absence of ML171. NOX1, if present in rodent spermatozoa, would not be involved in the different physiological processes experienced by the sperm before fertilizing the egg. This is supported by the fact that NOX1-deficient mice are fertile [28]. Finally, the NOX2 activity could not have been altered by ML171, since it is only affected at concentrations greater than 10  $\mu\text{M}$  [27,28].

During capacitation,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels rose due to the increased activity of the enzymes responsible for producing these ROS [1,4,29]. Several enzyme pathways responsible for ROS production and their participation in processes such as capacitation, acrosomal reaction, and motility have been characterized [29]. However, except for NOX5 [7], little is known about the participation of NOX2 and NOX4 in ROS production and its impact on sperm physiology. Our results clearly show that NOX2 and NOX4 inhibition by an agonist of both NOXs and VAS2879 [27] almost entirely prevents the production of  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and reduced the levels of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 2B,C). However, this low level of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production does not support capacitation (Figures 4 and 5) and directly affects sperm processes such as acrosomal reaction and the activation of progressive and hyperactivated motility. Therefore, the inhibition of  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  production by VAS2870 during capacitation directly relates NOX2 and NOX4 to physiological processes such as capacitation and motility, which require an adequate level of  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  produced by NOX2 and NOX4 for these sperm processes to occur correctly. In this regard, it is well known that  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  are related to capacitation, acrosomal reaction, and motility by activating different kinases, such as PKA, PKC, and MEK, which are fully involved in sperm physiology [29,30].

The early increase in the B and AR patterns experienced by sperm when VAS2870 inhibits  $\text{H}_2\text{O}_2$  production suggests that spermatozoa undergo early capacitation; therefore, sAR is also increased early (Figure 3A,B). These data appear to be contradictory regarding the non-increase in PYP during capacitation in the presence of VAS2870, and suggest that the spermatozoa would not undergo capacitation (Figure 3C,D). The development of the B and AR patterns through the CTC assay is dependent on  $\text{Ca}^{2+}$ , since CTC interacts with membrane proteins in the presence of this cation [31]. While the adequate production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  during capacitation is related to the activation of different kinases, such as PKC and PKA, these kinases show low activity when capacitation is performed in an environment with low levels of  $\text{H}_2\text{O}_2$  [29]. We suggest that both processes, the association of CTC with membrane proteins and PYP, occur independently during capacitation, since, despite the low production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  when NOX2 and NOX4 are inhibited, a continuous sperm influx  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 5) and, therefore, the association between CTCs and membrane proteins, should occur during capacitation. In this sense, a recent study reported that in human sperm, during capacitation, progesterone increases  $\text{Ca}^{2+}$  influx and ROS production by NOX5. Still, the inhibition of NOX5 by DPI, in both the presence and absence of progesterone, reduces the production of ROS but not the influx of  $\text{Ca}^{2+}$  [32]. We also suggest that normal  $\text{H}_2\text{O}_2$  production is required for capacitation and AR events to occur normally. Low  $\text{H}_2\text{O}_2$  production during capacitation induces a higher  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, leading to the early occurrence of these events.

The presented results reveal a novel mechanism for the activation of NOXs, in which calpain-1, the calpain expressed in guinea pig spermatozoa [14], plays a predominant role. In spermatozoa in a non-capacitated state, NOX2 and NOX4 are physically associated. In this physiological state, the production of  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  is deficient (Figures 3 and 7). Therefore, we suggest that the interaction between NOX2 and NOX4 keeps these two NADPH oxidases inactive or at very low activity levels (Figure 7A). The interaction between NOX2 and NOX4 changes when spermatozoa enter the capacitated state, separating

and increasing their activity (Figures 3 and 7). NOX2-NOX4 interaction occurs independently of their activity since, even in the presence of VAS2870, the NOXs are separated (Figure 6B). Additionally, as  $H_2O_2$  production increases only in the sperm-capacitated state (Figures 3 and 7), we propose that the separation of NOX2 and NOX4 is a crucial point in the activation of these two NOXs, and also suggest that the increase in ROS causes capacitation and hypermotility to occur without alterations.

Furthermore, calpain-1 is known for its importance in sperm processes, including capacitation, acrosomal reaction, and motility, in different mammals' spermatozoa [12–14,16,18]. Although different relationships between NOXs and calpain have been reported, wherein NOX2 and NOX4 regulate calpain activity in neuropathological processes [10,11,33], a mechanism where calpain-1 is related to the activation of NOX2 and NOX4 has not been previously reported. Our results suggest that calpain-1 activation is an essential and critical requirement for capacitation and motility to occur through the separation of NOX2 and NOX4, leading to an increase in  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$ , which are directly related to capacitation and sperm motility [1,4,29].

We do not know whether the NOX2/NOX4 interaction is direct or whether other proteins are involved. The relationship between NOX2 and NOX5 and caveolin-1 has been characterized, and it has been suggested that caveolin-1 is a negative regulator of these two NOXs [34,35]. Additionally, the caveolin-1/NOX2 interaction was observed in goat spermatozoa, and NOX2 activity is closely related to the reorganization of lipid rafts that occurs during capacitation [9]. The relocation experienced by NOX2 and NOX4 during capacitation (Figure 7A) is similar to that experienced by lipid rafts in guinea pig spermatozoa [15]. Although neither caveolins nor flotillins are targeted by calpains, we suggest that these proteins, which are related to lipid rafts, could be associated with the reorganizing of these two NOXs that occurs after their separation. Recently, in cardiomyocytes, it was reported that the NOX2 and NOX4 activity depends on their interaction with LRRC8A through its LRRD domain [34]. However, like lipid raft proteins, LRRC8A is not targeted by calpain. It is important to note that, in the work of Huo et al. (2021), as in this work, the involved NADPH oxidases are NOX2 and NOX4, suggesting that these two NOXs could have an important relationship in multiple cellular and physiological processes. Therefore, it remains to be elucidated whether the NOX2/NOX4 interaction is direct or mediated by other proteins.

In conclusion, our results indicate that the production of  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  during capacitation is related to at least two NOXs: NOX2 and NOX4. The inhibition of these two NOXs implies a low production of  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  during capacitation and, as a result, capacitation, acrosome reaction and motility are affected, directly relating these two NOXs with the physiological processes that enable spermatozoa to fertilize. Therefore, the normal production of ROS by NOX2 and NOX4 during capacitation is essential for events such as capacitation, acrosomal reaction, and motility to occur normally. Finally, we present a new regulatory mechanism for NOXs, directed by the calcium-dependent protease calpain.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Reagents

All reagents used in this work were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), except where otherwise indicated.

##### 4.2. Experimental Animals

Male Dunkin-Hartley guinea pigs (*Cavia porcellus*) with a mean weight from 800 to 900 g were used to isolate testicles, epididymis, and vas deferens. Experimental animals were handled in accordance with the Mexican Official Norm for Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999) and protocols from the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals, Cinvestav-IPN (CICUAL No. 321-02), following American Veterinary Medical Association guidelines.

#### 4.3. Capacitation Assay

Spermatozoa were obtained from the vas deferens of guinea pigs in 2 mL of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) perfusion. The cells were adjusted to  $3.5 \times 10^7$  cells/mL and incubated at 37 °C during and until capacitation. We used minimal capacitate medium supplemented with sodium pyruvate and lactic acid (MCM-PL (NaCl 105.8 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.1 mM, lactic acid 20 mM, sodium pyruvate 0.25 mM and HEPES 2.5 mM, pH 7.8)) to induce capacitation. For non-capacitative conditions, the cell suspension ( $3.5 \times 10^7$  cell/mL) was incubated in MCM-PL lacking CaCl<sub>2</sub> and NaHCO<sub>3</sub> at 37 °C.

#### 4.4. Pharmacologic Inhibitors

ROS production in guinea pig spermatozoa was assessed under non-capacitative and capacitative conditions, with or without specific NOX inhibitor, VAS2879 (40 μM), a pan-NOX inhibitor [27]; ML171 (2 μM) or NSC23766, a small GTPase Rac1 inhibitor (100 μM). We also tested the effect of calpain inhibition on ROS production using calpeptin (10 μM), a calpain-specific inhibitor.

#### 4.5. Assessment of NADPH Consumption

NADPH consumption was assessed following the method described by Andrade-Pavon et al. [36]. Whole native protein extracts obtained from spermatozoa under non-capacitation and capacitation conditions were tested with or without specific inhibitors of NOXs in the presence of NADPH (18 nM). The decrease in absorbance at 340 nm was measured for 10 min, and the difference between the initial and final absorbance was used to calculate the enzymatic activity (μmol/min/mg-protein).

#### 4.6. Assessment of Oxidative Stress

**Intracellular peroxide assay.** Intracellular ROS levels were determined using the oxidation-sensitive fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA) to analyze the intracellular content of peroxides (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) following a procedure modified from Guthrie and Welch [37]. Spermatozoa ( $3.5 \times 10^7$  cell/mL) were incubated under conditions of capacitation in the presence of H2DCF-DA (50 μM final concentration), at 37 °C for 60 min in the dark. ROS production was evaluated (Ex/Em, 490/525) using an LS55 Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer, Waltham Mass. USA). Detection of extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Amplex UltraRed (AUR) assay in the presence of HRP; spermatozoa ( $3.5 \times 10^7$  cell/mL) were incubated under conditions of capacitation with or without specific inhibitor in the presence of AUR (50 μM final concentration) and HRP (0.1 mM final concentration), at 37 °C for 60 min in the dark. Samples were centrifuged (5000 × g) for 3 min and supernatants were placed in a 96-well plate. Absorbance was read on a Microplate Reader at 540 nm (Bio rad, microplate reader, model 550).

**Superoxide anion assay:** Nitrotetrazolium Blue (NBT, 0.6 mM) was used to determine O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [38]. ROS production assay was performed at  $3.5 \times 10^7$  cell/mL during capacitation (60 min). The NBT deposited inside the cells was then dissolved by adding KOH (2 M) to solubilize cell membranes and then adding DMSO to dissolve Formazan complex by gentle shaking for 10 min at room temperature. Absorbance was measured at 620 nm. Relative production was obtained when sperm were incubated in PBS, relative solution was then transferred to a 96-well plate and absorbance was read on a Multi-Function Microplate Reader at 620 nm (Power Wave X 340, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

#### 4.7. Effect of VAS2870, NSC23766, and DPI on Sperm Viability

Sperm viability was determined following the method described by Roa-Espitia et al. [39]. Sperm suspensions were incubated in MCM-PL at pH 7.8 and 37 °C for 60 min in the absence and presence of VAS2870 (40 μM) or NSC23766 (100 μM). Once the incubation was finished, we added a PI solution (1 μg/mL) to a sample of spermatozoa to a 1:1 ratio and mixed and incubated the mixture at room temperature for 30 min. The spermatozoa were washed and the number of stained and unstained spermatozoa was counted (500 cell

X sample,  $n = 3$ ) under an epifluorescence microscope (Olympus BX500, Tokyo, Japan). Images were registered and analyzed using the software Nikon Elements 3.1.

#### 4.8. Western Blotting

Vas deferens sperm were obtained, washed in 154 mM NaCl solution, and capacitated. Samples were centrifuged ( $5000\times g$ ) for 3 min and suspended in RIPA buffer (25 mM TRIS HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1%, sodium deoxycholate, 0.1% SDS), supplemented with protease inhibitors (5 mg/mL soybean trypsin inhibitor, 100 mg/mL benzamide, 30 mg/mL pepstatin A, 30 mg/mL leupeptin, 30 mg/mL aprotinin, 1 mM PMSF diluted in dimethyl sulfoxide, 20 mg/mL iodoacetamide, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 10% glycerol, and 2.5% complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail [1 tablet diluted in 1 mL H<sub>2</sub>O]). The samples were then incubated for 20 min on ice and centrifuged ( $20,000\times g$ ) for 20 min at 4 °C. The supernatants were collected, and their protein concentration was determined [40]. To reduce protein disulfide bonds, supernatant aliquots were boiled for 5 min in 3X Laemmli buffer (720 mM TRIS-base, 6% SDS (*w/v*), 30% glycerol, 2-mercaptoethanol, and 0.03% bromophenol blue (*w/v*), pH 10). Then, proteins were separated using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10% polyacrylamide non-gradient gels, and subsequently transferred to nitrocellulose membranes and blocked in 5% skimmed milk in 1 × PBS/1% Triton X-100 (pH 7.4).

Phospho-tyrosine detection. First, 500 µg of total spermatic protein extract was run on SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes overnight at 4 °C. Membranes were washed once with PBS-Tween 20 (0.1%) and blocked with 5% nonfat dry milk in PBS-Tween 20 (0.1%) for two hours at room temperature with constant agitation. Membranes were then incubated with a 1:500 dilution of anti-phosphotyrosine (Cell Signaling, APY03, Danvers, MA, USA) antibody diluted in PBS-Tween 20 (0.1%) and incubated overnight at 4 °C with constant agitation followed by washing three times in PBS-Tween 20 (0.1% final concentration). The secondary mouse antibody HRP-conjugated IgG (Jackson Labs., 115-035-068) was diluted 1:10,000 in PBS added with nonfat milk (3% final concentration) and incubated with membranes for one hour at room temperature. Membranes were then washed three times in PBS for 10 min each.

Nox4 and Nox2 detection. Using SDS-PAGE, 300 µg of spermatic protein extract was loaded, and the proteins were separated and transferred to nitrocellulose membranes. Western blotting was performed under the same conditions used for phospho-tyrosine detection. The antibodies used were anti-NOX2/gp91<sup>P<sup>hox</sup></sup> antibody (EPR6991) (Abcam, ab129068) for NOX2 detection and anti-NADPH oxidase 4 antibody (UOTR1B492) (Abcam, ab109225, Cambridge, UK) for NOX4 detection.

In both assays, proteins were detected by chemiluminescence, which was developed using Amersham Biosciences ECL Prime Western Blotting Detection Reagent and visualized in an Odyssey<sup>®</sup> Fc Imaging System by LI-COR Biosciences. The densitometric analysis was performed using the ImageJ software (<https://imagej.nih.gov> (accessed on 3 April 2021)).

#### 4.9. Chlortetracycline Fluorescence Assay

This procedure was previously described [31] and modified for guinea pig spermatozoa [39,41] as follows: The stain solution was prepared by dissolving 250-µM chlortetracycline (CTC)-HCl in TN buffer (20 mM Tris, 130 mM NaCl, and 5 mM cysteine at pH 7.8); fresh CTC stock was prepared daily. At the time of the assay, 20 µL of non-capacitated or capacitated spermatozoa, treated or not with VAS2879, were mixed with 20 µL of pre-warmed CTC stock solution and incubated for 20 s in a water bath at 37 °C. Immediately after incubation, the CTC-sperm suspension was fixed adding 3.5 µL of 12.5% glutaraldehyde in 1.25 M Tris (pH 7.5), immediately followed by gentle mixing. Fixed samples were kept in a dark box. After 1–4 h of fixation, slides were prepared and examined under fluorescence microscope (Ex330-380/Em420 nm). All fluorescence images were obtained using an Olympus BX500 fluorescence microscope. In each sample, 100 spermatozoa were classified

as expressing one of three CTC staining patterns: F pattern, a faint fluorescence in the acrosome region, which is characteristic of non-capacitated acrosome-intact cells; B pattern, a bright fluorescence in the acrosomal region with a band along the equatorial segment, which is typical of capacitated, acrosome-intact cells; AR pattern, a fluorescence in the equatorial segment and/or post-acrosomal region, which is characteristic of physiologically capacitated acrosome-reacted cells. The presence or absence of the acrosomal cap on each cell was verified using phase-contrast illumination.

#### 4.10. Spermatic Motility Analysis

Sperm motility was evaluated following the methodology described by Cordero-Martínez [41]. Guinea pig spermatozoa were capacitated for 60 min in the absence or presence of VAS2870 (40  $\mu$ M). During incubation, aliquots were used for sperm motility quantitative parameter screening on a CASA instrument (TOX IVOS, software version 12.3: Hamilton Thorne Bioscience, Beverly, MA, USA) in a sample counting chamber prewarmed to 37 °C (MicroCell 20 Micron). Sperm motility was recorded at 60 frames/s for one second; velocity distribution and other kinematic parameters of motility (VAP, VSL, VCL, ALH, and BCF) were analyzed. Experiments were performed in triplicate.

#### 4.11. Intracellular Calcium Evaluation

Spermatozoa were capacitated for 15, 30, 60 and 90 min in the absence or presence of VAS2870 (40  $\mu$ M), and then spermatozoa (aliquots of  $3.5 \times 10^7$  cell/mL) were loaded with the  $\text{Ca}^{2+}$  indicator dye Fluo-3AM (Fluo-3-pentaacetoxymethyl ester, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO, 1 mM). Assays were prepared at a final concentration of 2  $\mu$ M Fluo-3AM for 15 min at 37 °C in MCM-PL. The cells were washed by centrifugation at  $5000 \times g$  with MCM-PL. After treatment, changes in intracellular calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) were recorded as background substrate ratios of the corresponding excitation wavelength (Ex490/Em520 nm). Intracellular calcium evaluation was performed for 200 s on a continuous basis, with or without pharmacological inhibitors. Fluorescence was registered in an LS-55 Fluorescence Spectrometer (Perkin Elmer, Waltham MA, USA).

#### 4.12. Immunofluorescence Assays

Non-capacitated or capacitated spermatozoa, treated or not with calpeptin, were fixed in formaldehyde (1.5% final concentration) in PBS. After one hour, the sperm were collected by centrifugation. The pelleted sperm (600 g for 3 min) were incubated in 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 10 min, rinsed twice with PBS, and then with bidistilled water. Microscope slides were prepared using this suspension, air-dried at room temperature overnight and stored at 4 °C. Sperm cells were permeabilized in acetone for 7 min at  $-20^\circ\text{C}$  and washed with PBS. NOX2 or NOX4 (1:100) antibody was diluted in PBS with 1% BSA (blocking solution) added and incubated overnight at room temperature. The slides were washed with PBS and incubated for two hours at 37 °C with the appropriate TRITC-conjugated secondary antibody diluted in blocking solution. The samples were mounted on glass-covered slides using Gelvatol, sealed properly, and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until observations were performed. The stained cells were imaged under a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP8, Wetzlar, Germany) and analyzed using LAS AF Lite's imaging software (Version 2.6.3).

#### 4.13. Co-Immunoprecipitation Assay

Co-immunoprecipitation experiments were performed using the Crosslink Immunoprecipitation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA, 26147). This method involves capturing 20  $\mu$ g antibody on Protein A/G beaded agarose resin and covalently immobilizing it on the support by crosslinking with 2.5 mM disuccinimidyl suberate (DSS). The antibody resin was then incubated at 4 °C for 12 h with 500  $\mu$ g precleared guinea pig spermatozoa protein extracts, allowing for the antibody-antigen complex to form. Proteins bound to the respective antibodies were eluted, recovered by low-speed centrifugation

(3000× g), and stored at −20 °C. Only the antigen was eluted during the procedure, enabling it to be identified and analyzed with minimal interference from antibody fragments. For protein disulfide reduction, supernatant aliquots were boiled for 5 min in 3X Laemmli buffer (pH 10) containing 2-mercaptoethanol, and the proteins were then separated by SDS-PAGE. Next, proteins were transferred to nitrocellulose membranes for immunodetection. The recovered proteins were analyzed by WB using the adequate antibodies.

Negative control was performed by associating 20 µg of an IgG unrelated to NOX2 or NOX4 with the agarose-protein A/G beads. The beads were incubated with 500 µg of sperm protein extract in the same way as before. The WB carried out with the anti-NOX2 antibody did not show the presence of this protein, nor of another (Supplemental Figure S1).

#### 4.14. Statistical Analysis

SigmaPlot 11 was employed to perform statistical analysis. Data are expressed as mean ± S.E. Means were compared using ANOVA one way as appropriate. Statistical significance between the samples was considered when  $p \leq 0.05$ .

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24043980/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.I.O.-G. and E.O.H.-G.; Formal analysis, J.C.-M. and E.O.H.-G.; Funding acquisition, E.O.H.-G.; Investigation, C.I.O.-G. and E.O.H.-G.; Methodology, C.I.O.-G., M.L.S.-L., A.L.R.-E., A.A.M.-S. and J.C.-M.; Project administration, A.L.R.-E.; Resources, E.O.H.-G.; Supervision, A.L.R.-E.; Validation, C.I.O.-G., M.L.S.-L., A.L.R.-E., A.A.M.-S. and J.C.-M.; Visualization, E.O.H.-G.; Writing—original draft, E.O.H.-G.; Writing—review & editing, M.L.S.-L. and J.C.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Grant No. 284183-B to E.O.H.-G; Scholarships No. 367954 to C.I.O.-G.; 263011 to M.L.S.-L.; and 263022 to A.A.M.-S.).

**Institutional Review Board Statement:** Experimental animals were handled in accordance with the Mexican Official Norm for Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999) and protocols from the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals, Cinvestav-IPN (CICUAL No. 321-02), following American Veterinary Medical Association guidelines.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We wish to thank Jaime Escobar, Manager at Microscopy Confocal Unit (Cell Biology Department, Cinvestav-IPN) for access to confocal facilities and Alma O. Sánchez-González (Cellular and Developmental Biology Department, Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Aitken, R.J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.* **2017**, *84*, 1039–1052. [CrossRef] [PubMed]
2. Buvelot, H.; Jaquet, V.; Krause, K.H. Mammalian NADPH Oxidases. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1982*, 17–36. [PubMed]
3. Acevedo, A.; González-Billault, C. Crosstalk between Rac1-Mediated Actin Regulation and Ros Production. *Free. Radic. Biol. Med.* **2018**, *116*, 101–113. [CrossRef] [PubMed]
4. O’Flaherty, C.; Matsushita-Fournier, D. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biol. Reprod.* **2017**, *97*, 577–585. [CrossRef] [PubMed]
5. Dutta, S.; Majzoub, A.; Agarwal, A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab. J. Urol.* **2019**, *17*, 87–97. [CrossRef] [PubMed]
6. Gagnon, C.; Iwasaki, A.; De Lamirande, E.; Kovalski, N. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann. NY Acad. Sci.* **1991**, *637*, 436–444. [CrossRef]
7. Musset, B.; Clark, R.A.; DeCoursey, T.E.; Petheo, G.L.; Geiszt, M.; Chen, Y.; Cornell, J.E.; Eddy, C.A.; Brzyski, R.G.; El Jamali, A. NOX5 in human spermatozoa: Expression, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 9376–9388. [CrossRef]

8. Chandrasekhar, A.; Laloraya, M.; Kumar, P.G. Modulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity through sequential posttranslational modifications of p22 phagocytic oxidase during capacitation and acrosome reaction in goat spermatozoa. *J. Anim. Sci.* **2011**, *89*, 2995–3007. [[CrossRef](#)]
9. Shoeb, M.; Laloraya, M.; Kumar, P.G. Progesterone-induced reorganisation of NOX-2 components in membrane rafts is critical for sperm functioning in *Capra hircus*. *Andrologia* **2010**, *42*, 356–365. [[CrossRef](#)]
10. Guemez-Gamboa, A.; Estrada-Sanchez, A.M.; Montiel, T.; Paramo, B.; Massieu, L.; Moran, J. Activation of NOX2 by the stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors contributes to glutamate neurotoxicity in vivo through the production of reactive oxygen species and calpain activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2011**, *70*, 1020–1035. [[CrossRef](#)]
11. Paramo, B.; Montiel, T.; Hernandez-Espinosa, D.R.; Rivera-Martinez, M.; Moran, J.; Massieu, L. Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 2596–2604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Rojas, F.J.; Moretti-Rojas, I. Involvement of the calcium-specific protease, calpain, in the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* **2000**, *23*, 163–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Aoyama, T.; Ozaki, Y.; Aoki, K.; Kunimatsu, M.; Tada, T.; Sasaki, M.; Suzumori, K. Involvement of mu-calpain in human sperm capacitation for fertilization. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2001**, *45*, 12–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bastian, Y.; Roa-Espitia, A.L.; Mujica, A.; Hernandez-Gonzalez, E.O. Calpain modulates capacitation and acrosome reaction through cleavage of the spectrin cytoskeleton. *Reproduction* **2010**, *140*, 673–684. [[CrossRef](#)]
15. Maldonado-Garcia, D.; Salgado-Lucio, M.L.; Roa-Espitia, A.L.; Reyes-Miguel, T.; Hernandez-Gonzalez, E.O. Calpain inhibition prevents flotillin re-ordering and Src family activation during capacitation. *Cell Tissue Res.* **2017**, *369*, 395–412. [[CrossRef](#)]
16. Ozaki, Y.; Blomgren, K.; Ogasawara, M.S.; Aoki, K.; Furuno, T.; Nakanishi, M.; Sasaki, M.; Suzumori, K. Role of calpain in human sperm activated by progesterone for fertilization. *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 831–838. [[CrossRef](#)]
17. Ben-Aharon, I.; Brown, P.R.; Etkovitz, N.; Eddy, E.M.; Shalgi, R. The expression of calpain 1 and calpain 2 in spermatogenic cells and spermatozoa of the mouse. *Reproduction* **2005**, *129*, 435–442. [[CrossRef](#)]
18. Ashizawa, K.; Wishart, G.J.; Katayama, S.; Takano, D.; Maeda, M.; Arakawa, E.; Tsuzuki, Y. Effects of calpain and Rho-kinase inhibitors on the acrosome reaction and motility of fowl spermatozoa in vitro. *Reproduction* **2006**, *131*, 71–79. [[CrossRef](#)]
19. Ducummon, C.C.; Berger, T. Localization of the Rho GTPases and some Rho effector proteins in the sperm of several mammalian species. *Zygote* **2006**, *14*, 249–257. [[CrossRef](#)]
20. Ramirez-Ramirez, D.; Salgado-Lucio, M.L.; Roa-Espitia, A.L.; Fierro, R.; González-Márquez, H.; Cordero-Martínez, J.; Hernández-González, E.O. Rac1 Is Necessary for Capacitation and Acrosome Reaction in Guinea Pig Spermatozoa. *J. Cell. Biochem.* **2020**, *121*, 2864–2876. [[CrossRef](#)]
21. Rivlin, J.; Mendel, J.; Rubinstein, S.; Etkovitz, N.; Breitbart, H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* **2004**, *70*, 518–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Aparnak, P.; Saberivand, A. Effects of curcumin on canine semen parameters and expression of NOX5 gene in cryopreserved spermatozoa. *Vet. Res. Forum* **2019**, *10*, 221–226. [[PubMed](#)]
23. Setyawan, E.M.N.; Kim, M.J.; Oh, H.J.; Kim, G.A.; Jo, Y.K.; Lee, S.H.; Choi, Y.B.; Lee, B.C. Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *479*, 927–932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Shukla, S.; Jha, R.K.; Laloraya, M.; Kumar, P.G. Identification of non-mitochondrial NADPH oxidase and the spatio-temporal organization of its components in mouse spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 476–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Vatannejad, A.; Tavilani, H.; Sadeghi, M.R.; Karimi, M.; Lakpour, N.; Amanpour, S.; Shabani Nashtaei, M.; Doosti, M. Evaluation of the NOX5 protein expression and oxidative stress in sperm from asthenozoospermic men compared to normozoospermic men. *J. Endocrinol. Investig.* **2019**, *42*, 1181–1189. [[CrossRef](#)]
26. Sabeur, K.; Ball, B.A. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reproduction* **2007**, *134*, 263–270. [[CrossRef](#)]
27. Dao, V.T.; Elbatreeq, M.H.; Altenhofer, S.; Casas, A.I.; Pachado, M.P.; Neullens, C.T.; Knaus, U.G.; Schmidt, H. Isoform-selective NADPH oxidase inhibitor panel for pharmacological target validation. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *148*, 60–69. [[CrossRef](#)]
28. Gavazzi, G.; Banfi, B.; Deffert, C.; Fiette, L.; Schappi, M.; Herrmann, F.; Krause, K.H. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 497–504. [[CrossRef](#)]
29. Serafini, S.; O’Flaherty, C. Redox Regulation to Modulate Phosphorylation Events in Human Spermatozoa. *Antioxid. Redox Signal.* **2022**, *37*, 437–450. [[CrossRef](#)]
30. de Lamirande, E.; O’Flaherty, C. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 106–115. [[CrossRef](#)]
31. Ward, C.R.; Storey, B.T. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev. Biol.* **1984**, *104*, 287–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ghanbari, H.; Keshitgar, S.; Zare, H.R.; Ghareh-Fard, B. Inhibition of CatSper and Hv1 Channels and NOX5 Enzyme Affect Progesterone-Induced Increase of Intracellular Calcium Concentration and ROS Generation in Human Sperm. *Iran. J. Med. Sci.* **2019**, *44*, 127–134. [[PubMed](#)]
33. Wang, J.; Bai, Y.; Zhao, X.; Ru, J.; Kang, N.; Tian, T.; Tang, L.; An, Y.; Li, P. oxLDL-mediated cellular senescence is associated with increased NADPH oxidase p47phox recruitment to caveolae. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20180283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Huo, C.; Liu, Y.; Li, X.; Xu, R.; Jia, X.; Hou, L.; Wang, X. LRR8A contributes to angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by interacting with NADPH oxidases via the C-terminal leucine-rich repeat domain. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *165*, 191–202. [[CrossRef](#)]
35. Chen, F.; Barman, S.; Yu, Y.; Haigh, S.; Wang, Y.; Black, S.M.; Rafikov, R.; Dou, H.; Bagi, Z.; Han, W.; et al. Caveolin-1 is a negative regulator of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *73*, 201–213. [[CrossRef](#)]
36. Andrade-Pavon, D.; Cuevas-Hernandez, R.I.; Trujillo-Ferrara, J.G.; Hernandez-Rodriguez, C.; Ibarra, J.A.; Villa-Tanaca, L. Recombinant 3-Hydroxy 3-Methyl Glutaryl-CoA Reductase from *Candida glabrata* (Rec-CgHMGR) Obtained by Heterologous Expression, as a Novel Therapeutic Target Model for Testing Synthetic Drugs. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2017**, *182*, 1478–1490. [[CrossRef](#)]
37. Guthrie, H.D.; Welch, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J. Anim. Sci.* **2006**, *84*, 2089–2100. [[CrossRef](#)]
38. Choi, H.S.; Kim, J.W.; Cha, Y.N.; Kim, C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J. Immunoass. Immunochem.* **2006**, *27*, 31–44. [[CrossRef](#)]
39. Roa-Espitia, A.L.; Hernandez-Rendon, E.R.; Baltierrez-Hoyos, R.; Munoz-Gotera, R.J.; Cote-Velez, A.; Jimenez, I.; Gonzalez-Marquez, H.; Hernandez-Gonzalez, E.O. Focal adhesion kinase is required for actin polymerization and remodeling of the cytoskeleton during sperm capacitation. *Biol. Open* **2016**, *5*, 1189–1199. [[CrossRef](#)]
40. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
41. Cordero-Martinez, J.; Reyes-Miguel, T.; Rodriguez-Paez, L.; Garduno-Siciliano, L.; Maldonado-Garcia, D.; Roa-Espitia, A.L.; Hernandez-Gonzalez, E.O. TMEM16A inhibition impedes capacitation and acquisition of hyperactivated motility in guinea pig sperm. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 5944–5959. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.