



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

**"Modelo Matemático para la Capacitación de
Espermatozoides en la Fecundación de Mamíferos".**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
M. en C. ANDRÉS ALEJANDRO AGUADO GARCÍA:

DIRECTOR DE TESIS
Dr. GUSTAVO MARTÍNEZ MEKLER



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada *"Modelo Matemático para la Capacitación de Espermatozoides en la Fecundación de Mamíferos"* que presenta el alumno Andrés Alejandro Aguado García (5920130201) para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Enrique Hernández Lemus INMEGEN	Aprobado	
Dr. Markus Mueller Bender CINC-UAEM	Aprobado	
Dr. Maximino Aldana González ICF-UNAM	Aprobado	
Dr. Hernán Larralde Ridaura ICF-UNAM	Aprobado	
Dr. José Fermin Díaz Escudero CINC-UAEM	APROBADO	
Dr. Alberto Darszon Israel IBT-UNAM	aprobada	
Dr. Gustavo Martínez Mekler ICF-UNAM	Aprobado	

Jurado revisor de tesis:
Dr. Enrique Hernández Lemus
Dr. Markus Franziskus Müller Bender
Dr. Maximino Aldana González
Dr. Hernán Larralde Ridaura
Dr. José Fermín Díaz Escudero
Dr. Alberto Darszon Israel
Dr. Gustavo Martínez Mekler

Publicaciones:

- 1.- *“Rasgos de Criticalidad y Complejidad en la Fecundación.”*
Rev. INTERdisciplina. ISSN 2395-969X
- 2.- *“A mathematical model for early capacitation mouse sperm reveals the role of
ion transporter number variability”*
arXiv:submit/2906789 [q-bio.CB] 29 Oct 2019

Resumen

La capacitación es un proceso de maduración complejo el cual los espermatozoides de mamífero deben atravesar durante su tránsito y residencia en el tracto reproductor femenino a fin de volverse capaces de fertilizar al óvulo. Este proceso involucra cambios fisiológicos en: el patrón de batido flagelar, el potencial de membrana, la concentración intracelular de varios iones, la fosforilación de proteínas, entre otros. Típicamente, en un medio capacitante, sólo una fracción de los espermatozoides alcanza dicho estado. La causa de esta respuesta heterogénea es una pregunta abierta. En el presente trabajo, se desarrolló para los niveles tempranos de la capacitación de ratón, un modelo de red de regulación discreto con dinámica determinista y algunos elementos estocásticos. En particular, el modelo sugiere que el grado de variabilidad en el número de transportadores iónicos entre la población de espermatozoides está relacionado con el porcentaje de células capacitadas. A nivel de célula única, el modelo requiere para la capacitación de la confluencia de niveles específicos de concentraciones y activación de algunos nodos selectos de la red. También en este estudio, se ponen de manifiesto comportamientos sinérgicos entre nodos clave de la red. Basado en el análisis del modelo, se proponen condiciones experimentales para controlar los niveles de capacitación.

Abstract

Capacitation is a complex maturation process that mammalian sperm must undergo in the female genital tract to be able to fertilize an egg. This process involves, amongst others, physiological changes in: flagellar beating pattern, membrane potential, intracellular ion concentrations and protein phosphorylation. Typically, in a capacitation medium, only a fraction of sperm achieve this state. The cause for this heterogeneous response is still not well understood and remains an open question. Here, we develop a discrete regulatory network with mainly deterministic dynamics in conjunction with some stochastic elements, which increases our understanding of this process. In particular the model suggests that the variability in ion transporter counts among sperm is related to the fraction of capacitated cells in population. In single cell for early capacitation the model requires the convergence of specific levels of concentration and activation of a select set of nodes. In the study synergistic traits amongst some components of the network are manifested. Based on the mathematical analysis, certain experimental conditions are proposed that control capacitation levels.

Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de posgrado que me fue otorgada para poder realizar este doctorado, así como también la beca mixta brindada para poder realizar una estancia en la Escuela Normal Superior de París. Además, quiero agradecer al proyecto "Motilidad y quimiotaxis en espermatozoides: Un estudio desde la biología de sistemas", clave 255914 por el apoyo complementario durante el doctorado.

Agradezco la hospitalidad de la institución receptora de mi estancia de investigación: Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure y a su anfitrión el Dr. Denis Thieffry, así como también agradezco la hospitalidad del Laboratoire de Physique Statistique de l'École Normale Supérieure y a su anfitrión el Dr. Jorge Kurchan.

Índice general

Resumen	II
Abstract	III
Agradecimientos	IV
1. Introducción	1
2. Métodos	5
2.1. Modelo biológico de capacitación	5
2.2. Redes dinámicas discretas	5
2.2.1. RDD con actualización multitemporal	8
2.2.2. Dinámica de flujos iónicos: Esquema de red neuronal	9
2.2.3. Dinámica de flujos iónicos con número de transportadores heterogéneo: Red neuronal con variabilidad en los pesos	9
2.3. Nodos integradores de flujos iónicos	10
2.3.1. Pesos y tasas de influencia de los nodos integradores de flujos iónicos	11
2.4. Nodo del potencial de membrana	12
2.4.1. Umbrales para el nodo de potencial de membrana	13
2.5. Definición operacional de capacitación a nivel de espermatozoide único	13
2.6. Resumen de métodos	14
3. Resultados	16
3.1. Validación del modelo	16
3.2. Efecto de la variabilidad en la cantidad de transportadores iónicos sobre las variables relevantes para capacitación	19
3.3. Parámetros del criterio de capacitación que reproducen una respuesta heterogénea	19
3.3.1. Distribuciones de los promedios temporales de las variables selectas provenientes de subpoblaciones de espermatozoides clasificadas	21
3.4. Controlando lo niveles de fracción de capacitación	22
4. Discusión	25
5. Limitaciones y perspectivas	27

6. Apendices	28
6.1. Condiciones iniciales	28
6.2. Nodos de concentración iónica intracelular y extracelular	28
6.3. Nodos de compuerta para los canales iónicos	30
6.3.1. CatSper	30
6.3.2. ENaC	31
6.3.3. CFTR	31
6.3.4. Slo3	31
6.4. Nodos de corriente para canales iónicos	32
6.4.1. KSper	32
6.4.2. Corriente de CFTR	32
6.4.3. Corriente de ENaC	33
6.4.4. Corriente de CatSper	33
6.5. Nodos de cotransportadores e intercambiadores iónicos	33
6.5.1. Intercambiador electrogénico sodio/calcio	33
6.5.2. Intercambiador electroneutro sodio/protón	34
6.5.3. Cotransportador sodio/bicarbonato	34
6.5.4. Intercambiador electroneutro cloro/bicarbonato	34
6.5.5. Intercambiador electrogénico cloro/bicarbonato	35
6.6. Nodos de fosforilación temprana	35
6.7. Nodos auxiliares de recuperación	36
6.8. Modificadores de flujos iónicos	36
6.8.1. Flujo de cloro	36
6.8.2. Flujo de bicarbonato	36
6.8.3. Flujo de sodio	37
6.9. Miscelanea de nodos	37
7. Material suplementario	43
7.1. Tablas de las funciones regulatorias	43
7.2. Figuras suplementarias	43
7.2.1. Series de tiempo usadas en la validación del modelo	43
7.2.2. Ejemplos de series de tiempo de espermatozoides individuales capacitados y no capacitados	43
7.2.3. Series de tiempo promediadas sobre subpoblaciones de esper- matozoides capacitados y no capacitados	43

Capítulo 1

Introducción

En la biología es común que los fenómenos de interés posean múltiples componentes entrelazados, dinámicas a varias escalas de resolución espacial y temporal, comportamientos multifactoriales, donde todo lo anterior da lugar a la emergencia de propiedades globales en el sistema de estudio. Desde mediados del siglo pasado el enfoque de los sistemas complejos ha enriquecido a esta disciplina desarrollando herramientas para el análisis de datos, la modelación matemática y su simulación, donde muchas de estas herramientas provienen de los sistemas dinámicos y de la física estadística [1].

En el contexto de la fecundación, ha sido de interés el estudio transdisciplinario de redes formadas por biomoléculas y sus interacciones, las cuales subyacen la regulación de una variedad de procesos moleculares que sostienen el funcionamiento de la célula, e.g redes genéticas, neuronales, metabólicas de señalización bioquímica, entre otras. El estudio de estas redes ha contribuido a caracterizar tres propiedades fundamentales: estructura, dinámica y función. Se busca determinar principios cuantitativos que contribuyan a la construcción de modelos predictivos para estos fenómenos biológicos.

Dada la naturaleza no lineal de la mayor parte de las interacciones que integran las redes de regulación y señalización en la capacitación así como la acumulación gradual de mediciones experimentales sobre propiedades puntuales relacionadas con los eventos moleculares que la subyacen a la fertilización, el desarrollo de modelos teóricos permite avanzar significativamente en la construcción de un panorama global que integre observaciones empíricas en una imagen coherente y que al mismo tiempo proporcione una idea más clara de cuáles son las propiedades esenciales del sistema de señalización visto como un todo.

Previamente se ha trabajado con el formalismo discreto de redes dinámicas aplicándolo en la vía de señalización del erizo de mar que regula la motilidad del espermatzoide:

- 1) En [2], con fundamento experimental se propuso un modelo de red de señalización discreta de oscilaciones de calcio inducidas por un quimioattractante proveniente del ovocito, el cual fue capaz de reproducir características experimentales de interés. Este trabajo demuestra que una aproximación de grano grueso a la dinámica de la vía de señalización es capaz de revelar elementos cruciales en regulación de la navegación del espermatozoide.
- 2) En [3], el modelo de redes lógicas desarrollado en (1), permitió la disección

individual y múltiple *in silico* de las acciones del ácido níflúmico. Los principales resultados fueron predecir las relaciones causa y efecto resultado de una inhibición selectiva de canales. Una de las conclusiones fue la necesidad de un canal de calcio pH y voltaje dependiente como es el caso de CatSper. El conocimiento de estas relaciones puede tener un impacto en las investigaciones relacionadas al desarrollo de fármacos.

- 3) En [4], la presencia activa del canal CatSper en el flagelo de *S. purpuratus* fue corroborado por primera vez. En [5], mediante varias redes de señalización se argumenta con perturbaciones *in silico* que CatSper es el principal generador de oscilaciones en la vía de señalización y que otros canales de calcio, si están presentes tendrían un papel complementario. Esta aproximación permite develar procesos que son difíciles de detectar exclusivamente por procedimientos experimentales.

Estos estudios permiten esclarecer el papel específico que juegan ciertos nodos en el contexto de la red completa, además de proveer un mejor entendimiento plantean predicciones cuantitativas y cualitativas que se convierten en un motor para el desarrollo de nuevos experimentos, poniendo de manifiesto las virtudes de un análisis con el enfoque de biología de sistemas.

En esta tesis se aplica y extiende el formalismo desarrollado previamente en el caso del erizo de mar para el caso de la fertilización de mamíferos con el propósito de lograr una mayor comprensión.

Los espermatozoides son células altamente especializadas cuyo propósito es alcanzar, reconocer y fusionarse con un ovocito. A pesar de la ausencia de una maquinaria de expresión genética, estas células móviles son capaces de responder a señales del medio extra celular principalmente mediante señales electroquímicas intracelulares y cascadas de fosforilación.

En el caso particular de la fertilización de mamífero, los espermatozoides deben transitar por el tracto reproductor femenino por un lapso a fin de adquirir la habilidad de nado adecuada, para alcanzar un ovocito al tiempo y lugar correcto. Durante este período, ellos deben completar un proceso de maduración. A principios de los 50's Austin y Chang identificaron los cambios esenciales requeridos por el espermatozoide para poder fertilizar al ovocito y llamaron a este proceso "capacitación" [6, 7]. En 1957 fue realizada la primera fertilización *in vitro* con espermatozoides de ratón proveniente del epidídimo los cuales fueron expuestos a un medio químico bien definido llamado medio capacitante [8]. Al respecto, múltiples eventos de señalización están involucrados y dependen de un conjunto de transportadores iónicos localizados a lo largo de la membrana celular, los cuales son sintetizados durante la espermatogenesis antes de convertirse en transcripcionalmente silenciados [9].

Se sabe que si los espermatozoides de ratón son estimulados por un medio capacitante con niveles adecuados de CaCl_2 , NaCl , NaHCO_3 , KCl , aceptor de colesterol, metabolitos, entre otros, solo una fracción de la población celular es capaz de mostrar una reacción acrosomal, una prueba crucial de que un espermatozoide se ha capacitado [10, 11]. Las relaciones causales que originan una respuesta heterogénea de capacitación permanecen pobremente entendidas, mientras que la posible ventaja de esta característica permanece solo especulativa actualmente.

Conforme la capacitación se desarrolla, el espermatozoide cambia su patrón de batido flagelar de una motilidad activada a una motilidad hiperactivada y se hace

competente para atravesar un evento fisiológico secretorio conocido como reacción acrosomal, el cual es necesario para la fusión de los gametos [12]. Durante este proceso, el potencial de membrana cambia del estado de reposo a un potencial hiperpolarizado [9], la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) [13], el pH (pH_i) [9], la concentración de cloro ($[Cl^-]_i$) [14] y la concentración de bicarbonato ($[HCO_3^-]_i$) [15] se incrementan, mientras que la concentración de sodio ($[Na^+]_i$) disminuye [16]. Además, la fosforilación por la proteína cinasa A (PKA) inicia durante los primeros minutos de la capacitación, mientras que la fosforilación de tirosinas comienza en estadios posteriores [9, 17, 18].

De acuerdo a la naturaleza molecular de cada uno de estos cambios fisiológicos, los procesos de señalización involucrados en la capacitación ocurren a diferentes escalas de tiempo (e.g. la apertura y cierre de canales iónicos ocurre en fracciones de segundo mientras que los eventos de fosforilación pueden tomar de minutos a horas). Para propósitos de este trabajo el sello del estado capacitado estará dado en términos de los niveles de las cantidades anteriormente mencionadas.

Para aclarar la causa de la respuesta heterogénea de los espermatozoides de ratón, se introduce un modelo matemático *ad hoc* que considera la diversidad de escalas de tiempo involucradas y la variabilidad en el número de un conjunto clave de elementos de señalización. Este modelo comprende eventos relacionados a la capacitación temprana i.e río arriba de la fosforilación de PKA, y está limitado al flagelo del espermatozoide.

Puesto que los transportadores iónicos constituyen un porcentaje menor del total de las proteínas de espermatozoide [9] y debido a su bajo número de proteínas, se considera en el modelado que el papel del número de este tipo de elementos en la respuesta heterogénea de la capacitación es de naturaleza estocástica.

Para evaluar la hipótesis de que la heterogeneidad en el número de transportadores iónicos entre los espermatozoides adquirida durante la espermatogénesis podría explicar los niveles de capacitación parciales típicamente observados *in vitro*, se exploraron diferentes niveles de variabilidad en la cantidad de transportadores iónicos por espermatozoide y se investigaron las propiedades de su distribución. Este concepto de variabilidad en expresión de proteínas usado en este trabajo ha sido reportado antes [19-22].

El modelo incorpora el conocimiento previo adquirido sobre fertilización en erizo de mar, es construido con base en la información disponible de la literatura científica y resultados del grupo experimental del Instituto de Biotecnología (IBT) liderado por el Dr. Alberto Darszon acerca de la maquinaria electroquímica de la capacitación de espermatozoide. Se calibró para reproducir el comportamiento electrofisiológico y bioquímico de una población con idéntica maquinaria de señalización. Una vez calibrado el modelo, se analiza la influencia de la variabilidad en el número de transportadores iónicos sobre la actividad promedio de las variables clave de la capacitación. Para atacar la cuestión de la respuesta heterogénea, se propone un clasificador cuantitativo basado en la dinámica de célula única de estas variables clave.

Después de una exploración general de los parámetros que definen este clasificador operacional de capacitación, se encontraron los niveles de variabilidad que dan lugar a la respuesta heterogénea observada experimentalmente. Dentro de este marco de trabajo, los porcentajes típicos de capacitación pueden ser controlados por perturbaciones simples o dobles (bloques o sobre activaciones) en elementos de la

vía de señalización de la capacitación, *i.e.* mutaciones *in silico*.

Capítulo 2

Métodos

En este capítulo, primero se introduce el modelo biológico de capacitación, el cual está basado en observaciones experimentales. En seguida, se construye una red de señalización discreta de múltiples componentes que incorpora la información del modelo biológico. Después, nos enfocamos en la dinámica de la red y desarrollamos paso a paso un esquema de actualización asíncrono *ad hoc* por medio de elementos estocásticos. Al final de esta sección, se propone una definición operacional de capacitación a nivel de espermatozoide único a fin de discriminar entre espermatozoides capacitados y no capacitados en las siguientes secciones de resultados.

2.1. Modelo biológico de capacitación

La Fig. 2.1 muestra una caricatura de los elementos de la vía de señalización de la capacitación considerados en el modelo matemático (Fig. 2.2). Varios transportadores iónicos de la pieza media y la pieza principal así como sus respectivos flujos iónicos fueron considerados [9]. Algunos elementos de la fosforilación temprana relacionados con la actividad de PKA fueron considerados también [23].

La topología de la red generada al conectar los elementos de interés para la capacitación, basados en las relaciones moleculares, se muestra en la Fig. 2.2. Las etiquetas de la red de capacitación tienen una distribución espacial similar al diagrama previo. Nótese entre otras cosas, la presencia en esta red de elementos auxiliares: nodos de recuperación, aquellos que ayudan a representar explícitamente las fuerzas electromotrices que generan los flujos a través cada tipo de canal iónico, así como también aquellos elementos relacionados a flujos iónicos totales.

2.2. Redes dinámicas discretas

A fin de caracterizar la dinámica de la vía de señalización relacionada a la capacitación temprana, se modela cada componente e interacción como una red de dinámica discreta (RDD). La configuración de este tipo de redes está dada por un conjunto de N variables discretas $\{\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_N\}$ las cuales representan el estado dinámico de todos los elementos de la red (nodos). La configuración de la red evoluciona en pasos discretos $t \in \mathbb{N}$ de acuerdo a un conjunto de reglas dinámicas que actualizan el estado de cada nodo. Uno de los formalismos más estudiados dentro de las redes dinámicas discretas es la aproximación booleana. Tal tipo de red fue

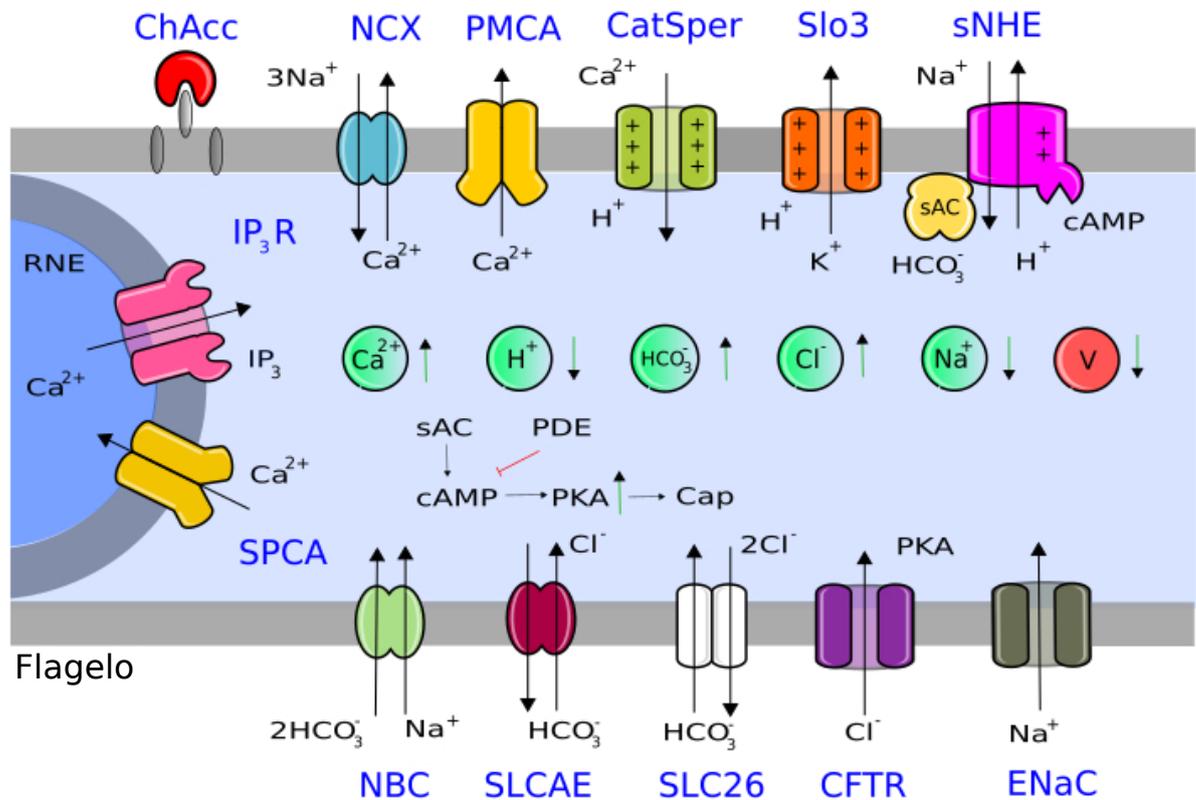


Figura 2.1: Representación de la maquinaria de capacitación considerada en este modelo biológico. Las bandas grises representan la membrana del flagelo. El semicírculo gris representa depósitos de calcio. Dentro del fondo azul claro (medio intracelular), podemos ver insertados de izquierda a derecha círculos que representan las concentraciones iónicas relevantes (verde) y el potencial de membrana (V, rojo). De izquierda a derecha insertados en la banda superior gris encontramos: el aceptor de colesterol (ChAcc), el intercambiador sodio/calcio (NCX), la bomba de calcio (PMCA), el canal de calcio voltaje/pH dependiente (CatSper), el canal de potasio voltaje/pH dependiente (Slo3), el intercambiador electroneutro sodio/protón (sNHE). De arriba a abajo insertados en el semicírculo gris (Envoltura nuclear redundante, RNE) encontramos: el canal de calcio IP₃/calcio dependiente (IP₃R), la bomba de calcio de la envoltura nuclear redundante (SPCA). De izquierda a derecha insertados en la banda inferior gris encontramos: el cotransportador sodio/bicarbonato (NBC), el intercambiador electroneutro cloro/bicarbonato (SLCAE), el intercambiador electrogénico cloro/bicarbonato (SLC26), el canal de cloro (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR), y el canal de sodio (ENaC). Adenilato ciclasa (sAC), fosfodiesterasa (PDE), adenosín monofosfato (cAMP), proteína quinasa A (PKA), inositol trifosfato (IP₃). Cap representa el inicio de la capacitación tardía.

propuesta por Kauffman como un marco de trabajo para estudiar sistemas regulatorios genéticos y metabólicos [24], con la hipótesis subyacente que cada patrón temporal podía ser asociado a un fenotipo celular. Este tipo de modelos ha probado su utilidad en el estudio de varios sistemas biológicos, e.g. [2, 25, 26]. De acuerdo al

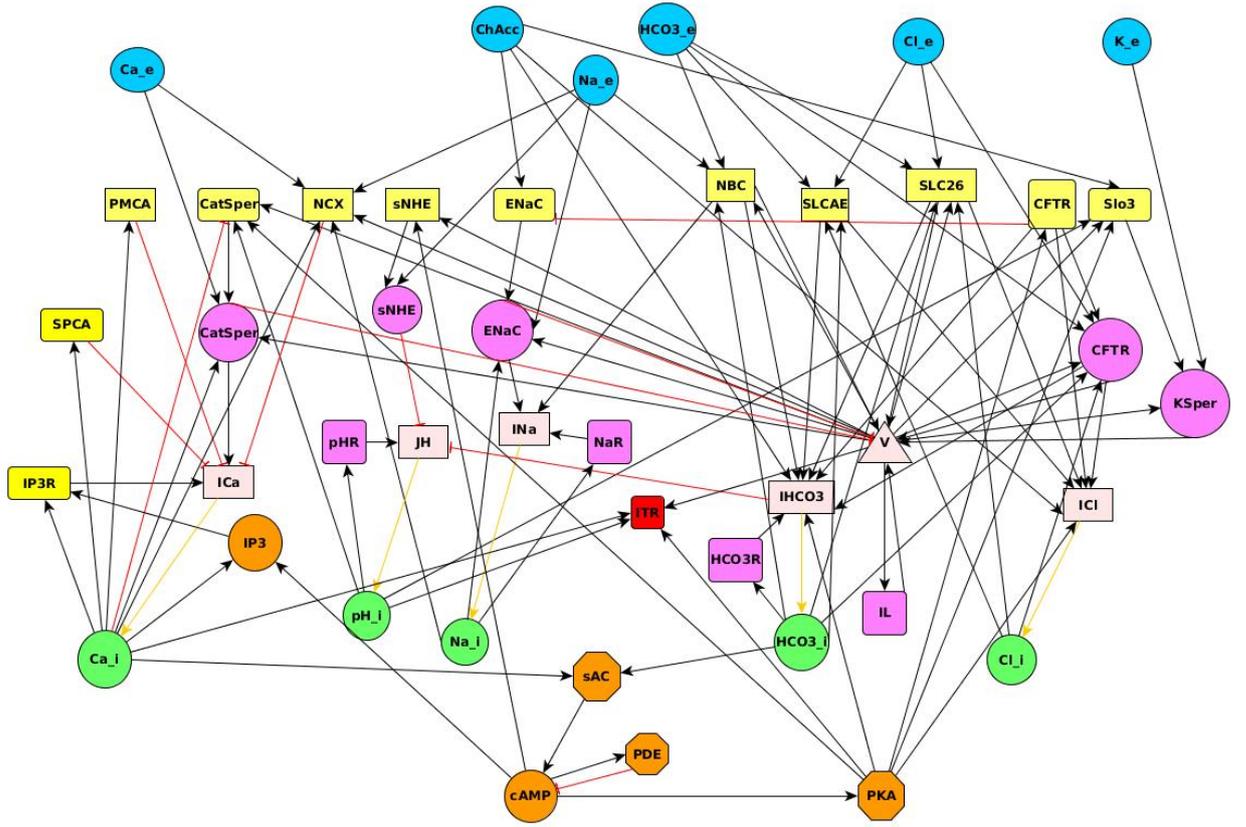


Figura 2.2: Red de interacción entre elementos considerados en el modelo biológico y elementos auxiliares adicionales. Los círculos azules representan las concentraciones iónicas extracelulares. Los cuadros amarillos representan a los transportadores iónicos. Los círculos rosas representan las fuerzas electromotrices de los transportadores iónicos. Los cuadros rosas claros representan a las corrientes iónicas totales. Los círculos verdes representan a las concentraciones iónicas intracelulares. Los nodos naranjas representan a las enzimas y moléculas del citosol. El cuadro rojo representa al nodo integrador de los cambios de capacitación. Los cuadros rosas representan a los nodos auxiliares de recuperación de concentraciones iónicas y del potencial de membrana. El triángulo rosa claro representa el potencial de membrana. Las flechas negras representan una regulación positiva. Las flechas rojas representan una regulación negativa. Las flechas amarillas representan una regulación dual.

formalismo de Kauffman, el estado dinámico de un nodo dado σ_i a tiempo $t + 1$ está determinado por el estado de sus k reguladores $\{\sigma_{i_1}, \sigma_{i_2}, \dots, \sigma_{i_k}\}$ a tiempo t como sigue:

$$\sigma_i(t + 1) = F_i[\sigma_{i_1}(t), \dots, \sigma_{i_k}(t)] \quad (2.1)$$

donde F_i es una función regulatoria que asigna un valor de un repertorio de estados discretos al nodo σ_i . Nótese que cada nodo σ_i tiene su propia función regulatoria F_i , la cual se construyó para reflejar cualitativamente el carácter inhibitor/activador de las interacciones de un conjunto particular de reguladores. Esta función puede ser codificada a través de tablas de verdad o expresada en términos de frases lógicas booleanas. En la variante mas simple, el estado dinámico de todos los nodos es actualizado sincrónicamente aplicando simultáneamente su respectiva función regulatoria

a cada iteración (Ec. 2.1).

El modelo booleano puede ser generalizado a la variante multiestado, en la cual a cada nodo σ_i se le permite tomar hasta m estados en vez de dos:

$$\sigma_i(t) \in \tilde{e}_i = \{e_{i_1}, \dots, e_{i_m}\} \quad (2.2)$$

donde \tilde{e}_i es el conjunto de estados que σ_i puede tomar, $e_{i_j} \in \mathbb{Z}$.

La mayoría de los nodos de la red de capacitación tienen dos estados dinámicos. En el caso de canales iónicos, los estados dinámicos representan: abierto (estado 1) y cerrado (estado 0). En el caso de concentraciones iónicas (Tab. 6.2), los estados dinámicos representan: concentración alta (estado 1) y concentración baja (estado 0). En el caso de la actividad de una proteína dada, los estados dinámicos representan: actividad alta (estado 1) y actividad baja (estado 0). En el caso de nodos de corriente, ellos tienen tres estados dinámicos los cuales representan la dirección de la corriente: corriente entrante (estado 1), corriente nula (estado 0) y corriente saliente (estado -1). En el caso del potencial de membrana los estados dinámicos representan: depolarizado (estado 1), reposo (estado 0) e hiperpolarizado (estado -1).

En general, hay muchas formas reportadas en la literatura para construir funciones regulatorias, *e.g.* tablas de verdad con salidas aleatorias [24], redes booleanas de umbral [27], reglas de la mayoría [28], etc. El método para construir las funciones regulatorias en el presente modelo es *ad hoc* relacionado a la termodinámica y electrofisiología del fenómeno, el cual es explicado en la sección de apéndices. Además, las reglas dinámicas para los nodos de flujo iónico total y del nodo de potencial de membrana fueron construidas como un caso particular del nuevo esquema propuesto, el cual es explicado en 2.2.3.

2.2.1. RDD con actualización multitemporal

Como se indicó en la sección 1, se ha establecido experimentalmente que hay una diversidad de escalas de tiempo con las cuales los diferentes nodos de la red de capacitación interactúan. A fin de tomar esto en cuenta, en el presente modelo se define una ecuación de evolución temporal la cual incorpora interacciones estocásticas, de manera que cada entrada de un nodo es muestreada a diferentes tasas de acuerdo a un proceso de Bernoulli sesgado. El valor promedio de este proceso es calibrado de acuerdo con los experimentos (como se muestra en la sección 2.3.1). Por lo tanto generalizamos el modelo multiestados de Kauffman como sigue:

$$\sigma_i(t+1) = F_i[B_{\tau_{i_1}}^t[\sigma_{i_1}(t)], \dots, B_{\tau_{i_k}}^t[\sigma_{i_k}(t)]], \quad (2.3a)$$

$$B_{\tau_{i_j}}^t[\sigma_{i_j}(t)] = \begin{cases} \sigma_{i_j}(t) & \text{si } b_{\tau_{i_j}}^t = 1 \\ 0 & \text{en caso contrario} \end{cases} \quad (2.3b)$$

donde $b_{\tau_{i_j}}^t \in \{0, 1\}$ es una variable aleatoria proveniente de un proceso de Bernoulli sesgado con promedio $\tau_{i_j} \in [0, 1]$, muestreada a tiempo t , y $\sigma_{i_j}(t) \in \tilde{e}_{i_j}$.

Dado que la fosforilación dependiente de PKA, los efectos del receptor de colesterol y la difusión desde el RNE a la pieza principal muestran tiempos característicos mas grandes que otros componentes de la red de capacitación, existe un retardo y

una persistencia de sus efectos la cual es modelada por un proceso de memoria. Para estos casos en lugar de la ecuación 2.3b, la evolución del nodo esta dada, para $t = 0$, por

$$B_{\tau_{i_j}}^0 [\sigma_{i_j}(0)] \equiv \sigma'_{i_j}(0) = \sigma_{i_j}(0), \quad (2.4)$$

y para $t > 0$, por

$$B_{\tau_{i_j}}^t [\sigma_{i_j}(t)] \equiv \sigma'_{i_j}(t) = \begin{cases} \sigma_{i_j}(t) & \text{si } b_{\tau_{i_j}}^t = 1 \\ \sigma'_{i_j}(t-1) & \text{en caso contrario} \end{cases}, \quad (2.5)$$

donde $\sigma_{i_j}(t)'$ y $\sigma_{i_j}(t) \in \tilde{e}_{i_j}$. Nótese que aunque la evolución del modelo de red es síncrono, la asincronía biológica es incorporada en el modelo a través de una actualización estocástica a nivel de enlace.

2.2.2. Dinámica de flujos iónicos: Esquema de red neuronal

A fin de gestionar los flujos iónicos relacionados a varios tipos de transportadores, incluimos nodos auxiliares integradores de flujos que funcionan de forma parecida a como una neurona integra señales provenientes de varias entradas. La actualización depende de si se sobrepasa un valor de umbral dado. Cada nodo integrador de corriente σ_i se actualiza de acuerdo a una función reguladora F_i la cual consiste en una suma pesada de sus reguladores σ_{i_j} , como en el esquema de McCulloch&Pitts [29]:

$$\sigma_i(t+1) = \text{sgn} \left[\sum_{j=1}^k w_{i_j} \sigma_{i_j}(t) \right] \quad (2.6)$$

donde la función sgn discretiza la suma de los reguladores σ_{i_j} pesados por w_{i_j} , de acuerdo a:

$$\text{sgn}(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } x > 0 \\ 0 & \text{si } x = 0 \\ -1 & \text{si } x < 0 \end{cases} \quad (2.7)$$

como en la Sec. 2.2.1, se puede generalizar el esquema de red neuronal a la variante multitemporal como sigue:

$$\sigma_i(t+1) = \text{sgn} \left[\sum_{j=1}^k w_{i_j} B_{\tau_{i_j}}^t [\sigma_{i_j}(t)] \right] \quad (2.8)$$

donde los nodos σ_i ahora tienen funciones reguladoras en el cual cada regulador σ_{i_j} participa a través de un proceso de Bernoulli sesgado. Los valores del conjunto de pesos de la red $\tilde{w} = \{w_{i_j}\}$ está basado en evidencia biológica como se muestra en la sección 2.3.1.

2.2.3. Dinámica de flujos iónicos con número de transportadores heterogéneo: Red neuronal con variabilidad en los pesos

A fin de introducir variabilidad en poblaciones de redes con un conjunto de pesos \tilde{w} dado, es posible construir poblaciones de redes comenzando de una red generadora

y su respectivo conjunto de pesos $\tilde{w} = \{w_{i_j}\}$. Cada red r de la población construida tendrá un conjunto de pesos $\tilde{w}^r = \{G_{i_j}^r(w_{i_j}, D)\}$, donde $G_{i_j}^r$ es un número aleatorio muestreado con una distribución de probabilidad Gaussiana truncada $G(w_{i_j}, D)$ con promedio w_{i_j} y desviación estándar D , sobre un intervalo $[a, b]$ con $a, b \in \mathbb{R}$ y donde este intervalo esta relacionado a los valores que $G_{i_j}^r$ puede tomar. En general, las redes que provienen de esta población tendrán diferentes conjuntos de pesos entre ellas. Es posible extender esta noción de variabilidad en funciones regulatorias tipo neurona a la variante multitemporal como sigue:

$$\sigma_i^r(t+1) = \text{sgn} \left[\sum_{j=1}^k G_{i_j}^r(w_{i_j}, D) B_{\tau_{i_j}}^t[\sigma_{i_j}(t)] \right] \quad (2.9)$$

Con todas estas extensiones al esquema de Kauffman multiestado y al esquema de McCulloch&Pitts, hemos alcanzado el nuevo esquema general propuesto en este trabajo para modelar la capacitación temprana de ratón.

2.3. Nodos integradores de flujos iónicos

Comenzando con la ecuación 2.9 y adaptándola al caso particular de los nodos integradores de flujo (I_{Ca} , J_H , I_{HCO_3} , I_{Cl} y I_{Na}), se introdujeron variables auxiliares \tilde{I}_i^r , las cuales integran los flujos j de un ión particular i para un espermatozoide dado r . Cada una de estas variables auxiliares se actualiza dependiendo del estado particular de su conjunto de transportadores iónicos al tiempo t . A fin de considerar las diferencias en las velocidades de operación entre transportadores iónicos I_{i_j} , se multiplica cada flujo por un número aleatorio $b_{\tau_j}^t$ proveniente de un proceso de Bernoulli sesgado con promedio τ_{i_j} a cada paso de tiempo t . El parámetro τ_{i_j} controla la tasa de operación promedio del flujo I_{i_j} . La regla dinámica resultante es:

$$\tilde{I}_i^r(t+1) = \text{sgn} \left[\sum_{j=1}^k b_{\tau_{i_j}}^t G_{i_j}^r(w_{i_j}, D) \Delta\mu_{i_j}(t) \right] \quad (2.10)$$

Donde $\Delta\mu_{i_j}$ es la fuerza electromotriz (FEM) del flujo j , $\Delta\mu_{i_j}$ contribuirá o no a la actualización de \tilde{I}_i^r al tiempo $t+1$, dependiendo de la variable aleatoria $b_{\tau_j}^t$, la cual puede ser 0 o 1. Nótese que cada espermatozoide r de la población tiene su propio conjunto de funciones regulatorias $\{F_i^r\}$ para el flujo iónico neto \tilde{I}_i^r el cual puede diferir de otro espermatozoide r' . La función regulatoria F_i^r es un caso particular del esquema 2.2.3, donde la desviación estándar corre sobre el intervalo $D \in [0, w_j]$ y $G_j^r \in [0, 2w_j]$. Además, los nodos reguladores $\Delta\mu_j(t)$ representan la FEM asociada al transportador j , y los pesos w_j podrían ser un análogo a las conductancias efectivas. El producto de estos términos da una expresión de corriente basada en la ley de Ohm. Los nodos reguladores $\Delta\mu_j(t)$ tienen un repertorio de estados $\Delta\mu_j(t) \in \{-1, 0, 1\}$, donde -1 corresponde a una FEM que genera un flujo saliente, 0 corresponde a una fuerza nula y 1 corresponde a una FEM que genera un flujo entrante. En la figura 2.3 podemos observar cómo un cambio en la concentración iónica x_i ocurre a través de un flujo total \tilde{I}_i^r descrito arriba. Los pesos w_j y tasas de influencia τ_j son reportados en la siguiente sección.

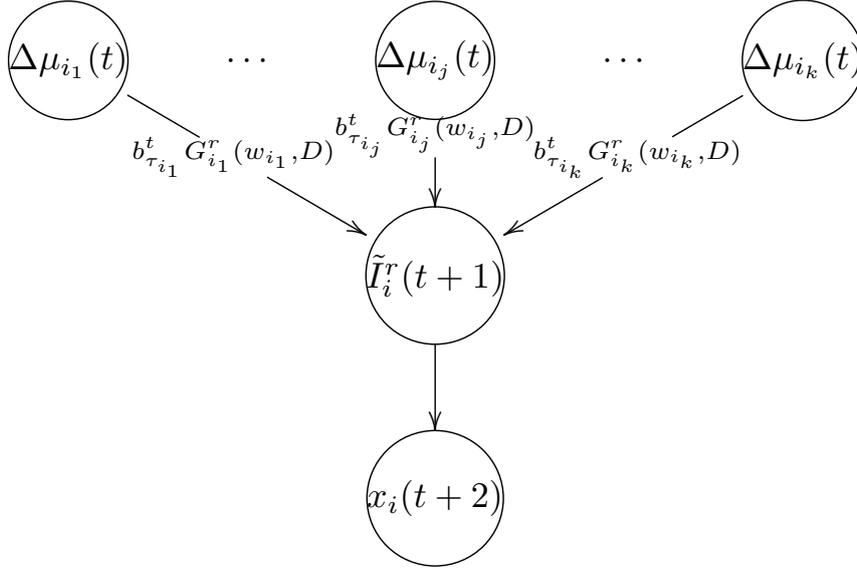


Figura 2.3: Diagrama del mecanismo por el cual una concentración iónica x_i (abajo) cambia por medio del nodo del flujo iónico total \tilde{I}_i^r (en medio) determinado mediante la suma pesada de todos los nodos de fuerza electromotriz $\Delta\mu_j$ conectados.

2.3.1. Pesos y tasas de influencia de los nodos integradores de flujos iónicos

A fin de calcular los pesos w_j de los canales iónicos en la Ec. 2.10, se usó la conductancia total η_j , el promedio de la cantidad de transportadores iónicos N_j y la conductancia unitaria g_j como sigue:

$$\eta_j = N_j g_j \quad (2.11)$$

$$W_{ji} = \frac{\eta_j}{\eta_i} = \frac{N_j g_j}{N_i g_i} \quad (2.12)$$

$$W_j = W_{jm} = \frac{\eta_j}{\eta_m} = \frac{N_j g_j}{N_m g_m} \quad (2.13)$$

donde para el canal iónico j , $W_j \in [0, 1]$ y el índice m corresponde al canal iónico con mayor conductancia. En consistencia con nuestro modelo discreto, se discretizan los pesos como sigue:

$$w_j = \tilde{\Theta}[W_j], w_j \in \{1, 2, 4\} \quad (2.14)$$

Donde la función $\tilde{\Theta}[x]$ restringe el peso decimal W_j a solo tomar tres valores enteros; valor 1 correspondiente a ENaC y CFTR, el valor 2 correspondiente a CatSper y el valor 4 correspondiente a KSper y a V (nodo de potencial de membrana). El peso asignado en el caso de todos los transportadores iónicos restantes fue el menor de los tres valores disponibles i.e. 1.

Una distribución normal truncada $G_{i_j}^r(w_{i_j}, D) \in [0, 2w_{i_j}]$ con promedio w_{i_j} y desviación D se usó a fin de obtener una variabilidad en la cantidad de transportadores iónicos de la población de espermatozoides, asignando un conjunto de pesos aleatorio $\{G_{i_j}^r(w_{i_j}, D)\}$ a cada espermatozoide de la población, donde $D \in [0, w_{i_j}]$.

Para tomar en consideración diferencias en la velocidad de operación de varios transportadores iónicos, se usó el número aleatorio $b \in \{0, 1\}$ proveniente de una distribución de Bernoulli sesgada a tiempo t , donde τ_{i_j} es el promedio de la distribución de Bernoulli. Si b es igual a 1 al tiempo t , el transportador iónico i_j participará en la suma pesada con una corriente $I_{i_j}(t)$. En otro caso, el transportador iónico tendrá participación nula en la suma pesada al tiempo t . El promedio de la distribución de Bernoulli sesgada τ_{i_j} de cada transportador iónico i_j está relacionado a un parámetro de velocidad v_{i_j} como sigue:

$$\tau_{i_j} = \gamma v_{i_j}, v_{i_j}^{-1} \in \{1, 2, 4, \dots, 9\} \quad (2.15)$$

donde $\gamma \in [0, 1]$ es un factor de proporcionalidad y permite tener escalas de tiempo de capacitación consistentes con las reportadas en la literatura y está relacionado al máximo valor promedio que se le puede asignar a la distribución. Una velocidad igual a 1 corresponde a canales iónicos, una velocidad igual a 1/2 corresponde a intercambiadores y cotransportadores, una velocidad igual a 1/4 corresponde a las bombas de calcio. Inversos multiplicativos de las velocidades ($v_{i_j}^{-1}$) mayores a 4 corresponden a nodos reguladores de fosforilación, al nodo regulador de ChAcc y a la difusión de calcio desde el RNE a la pieza principal. Todos los parámetros usados en esta sección son reportados en Tab. 6.4.

2.4. Nodo del potencial de membrana

El potencial de membrana es un componente central altamente conectado en la red, en nuestro modelo puede tomar valores $\{-1, 0, 1\}$, los cuales corresponden respectivamente a hiperpolarización, reposo y depolarización. Para su evolución temporal se construyó una versión discreta de la ecuación de Hodgkin&Huxley [30] mostrada en la Ec. 2.17 a través de una partición discretizante definida en la Ec. 2.19. tal que el estado de reposo es robusto bajo perturbaciones pequeñas.

Como con los nodos integradores de flujos iónicos, V es determinado por una suma pesada de múltiples fuentes: CatSper, ENaC, Slo3, CFTR, el cotransportador NBC, el intercambiador SLC26 y la corriente de fuga IL. El peso de la i -ésima contribución esta dada por la conductancia máxima. El ultimo termino es consecuencia de las leyes de Kirchoff's. entonces tenemos:

$$V^r(t+1) = \Theta \left[\sum_{j=V_1}^{V_k-1} z_j b_{\tau_j}^t G_j^r(w_j, D) \Delta \mu_j(t) + w_{V_k} V^r(t) \right]. \quad (2.16)$$

Donde w_{V_k} es el peso del potencial de membrana a un paso de tiempo anterior. z_j es el signo de la carga del ion de referencia en la corriente del transportador j . Esta cantidad garantiza que los flujos iónicos sean capaces de modificar el potencial de membrana siguiendo la convención típica de electrofisiología, i.e. corrientes negativas corresponden a flujos entrantes de cargas positivas (e.g. CatSper, ENaC), corrientes positivas corresponden a flujos salientes de cargas positivas (e.g. Slo3), o flujos entrantes de cargas negativas (e.g. CFTR, NBC). La variable aleatoria $b_{\tau_j}^t$ otra vez se

encarga de modelar las diferentes velocidades de operación de los transportadores iónicos. Los pesos w_j y velocidades τ_j están reportadas en la sección previa.

2.4.1. Umbrales para el nodo de potencial de membrana

La ecuación 2.16 se dedujo de la versión discreta de:

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{1}{C_m} \sum_j^k \tilde{I}_j(t), \quad (2.17)$$

donde C_m es la capacitancia del flagelo del espermatozoide e $\tilde{I}_j(t)$ es el flujo del transportador j a tiempo t . En general, la suma pesada de la ecuación 2.16 puede tomar valores del intervalo $x_i \in (l_{i_o}, l_{i_m})$, el intervalo puede ser dividido como $p_j = (l_{i_{j-1}}, l_{i_j})$ y discretizado como sigue:

$$\Theta_i(x_i) = \begin{cases} e_{i_m} & \text{si } x_i \in p_m \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ e_{i_1} & \text{si } x_i \in p_1 \end{cases} \quad (2.18)$$

donde $l_{i_j} \in (l_{i_o}, l_{i_m})$ y m es el número de estados que σ_i puede tomar. En particular, para el caso del potencial de membrana, ecuación 2.16, La función Θ discretiza *ad hoc* los valores arrojados por la suma pesada como sigue:

$$\Theta = \begin{cases} 1 & \text{si } 3 < x \\ 0 & \text{si } -2 \leq x \leq 3 \\ -1 & \text{si } x < -2 \end{cases}, \quad (2.19)$$

donde $x = [\sum_{j=V_1}^{V_k-1} z_j B_{\tau_j}^t G_j^r(w_j, \sigma) \Delta\mu_j(t) + w_{V_k} V^r(t)]$, estado 1 (depolarizado), estado 0 (reposo) y estado -1 (hiperpolarizado).

2.5. Definición operacional de capacitación a nivel de espermatozoide único

La mayoría de las variables relevantes para la capacitación son reportadas como mediciones aisladas, ya sea distribuciones de poblaciones o series de tiempo, *i.e.* no hay mediciones disponibles multivariable a nivel de célula única. Esto obstaculiza el estudio de qué cambios ocurren simultáneamente en el espermatozoide que alcanza el estado capacitado. Tomando ventaja del modelo, exploramos la dinámica conjunta de aquellos cambios involucrados en la respuesta de capacitación temprana. Para esto, se introduce un nodo auxiliar $\sigma_{\mathcal{J}}$, que integra a nivel de espermatozoide único, los cambios fisiológicos asociados a la capacitación, cambios extrapolados de lo que se ha observado en mediciones de poblaciones. Para tal nodo integrador, se consideran los siguientes cambios observables como indicador de la capacitación: hiperpolarización del potencial de membrana (estado -1), alta concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (estado 1), altos niveles de pH_i (estado 1) y una alta actividad de PKA (estado 1). Aunque los niveles de sodio, bicarbonato y cloro intracelulares son también determinantes,

ellos no fueron incluidos en el $\sigma_{\mathcal{J}}$ debido a la escasez de medidas experimentales en célula única.

Además, a fin de superar la falta de simultaneidad sostenida de las condiciones de capacitación en realizaciones individuales de espermatozoide, inherentes a la naturaleza estocástica de la dinámica de la red, se midió la dinámica conjunta con una ventana de observación W . Entonces, para un espermatozoide dado r , su nodo integrador $\sigma_{\mathcal{J}}^r(t)$ toma el estado 1 a tiempo t si el "promedio móvil", superpuesto de la ventana W para todas las observables asociadas está arriba de un umbral $\theta \in [0, 1]$. Esto significa que $\sigma_{\mathcal{J}}^r(t)$ se activa si a lo largo de la ventana precedente W , cada una de las variables mencionadas anteriormente son simultáneamente encontradas en el estado requerido para la capacitación mas de una fracción de tiempo θ . Si alguna de estas variables falla, el nodo integrador toma el estado 0. En otras palabras, $\sigma_{\mathcal{J}}^r(t)$ depende de los valores suavizados de nuestras cuatro variables selectas, calculadas como los respectivos promedios de tiempo en ventana. El umbral del nodo integrador θ indica cual es el mínimo porcentaje de tiempo que las condiciones de capacitación se necesitan satisfacer simultáneamente durante una ventana de observación W . Se define la regla dinámica para $\sigma_{\mathcal{J}}^r(t)$ como sigue:

$$\sigma_{\mathcal{J}}^r(t|W, \theta) = \begin{cases} 1 & \text{si } \forall i \in \{V, \text{Ca}_i, \text{pH}_i, \text{PKA}\}, s_i \frac{1}{W} \sum_{\tau=1}^W \sigma_i^r(t - \tau) > \theta \\ 0 & \text{en caso contrario} \end{cases} \quad (2.20a)$$

$$s_i = \begin{cases} -1 & \text{si } i = V \\ 1 & \text{en caso contrario} \end{cases}, \quad (2.20b)$$

donde s_i proporciona el signo adecuado del nivel esperado en la variable selecta i . Resumiendo, el nodo integrador nos dice si, en promedio, las cuatro variables selectas estuvieron en sus respectivos estados asociados a capacitación la suficiente fracción de tiempo θ en una ventana de observación W antes del tiempo t .

Diremos que una célula única está capacitada si el estado estacionario del promedio en el tiempo de σ_{cap}^r está arriba de un umbral θ_c . Entonces, se propone un criterio de capacitación en términos del clasificador binario σ_{cap}^r definido:

$$\sigma_{\text{cap}}^r = \Theta_c \left[\frac{1}{L - t_r - 1} \sum_{t=t_r+1}^L \sigma_{\mathcal{J}}^r(t) \right] \quad (2.21a)$$

$$\Theta_c(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } x \geq \theta_c \\ 0 & \text{en caso contrario} \end{cases} \quad (2.21b)$$

el cual es una discretización $\{0, 1\}$ del valor promedio de $\sigma_{\mathcal{J}}^r(t)$ durante una observación post estímulo $L - t_r - 1$, después de descartar un transitorio de t_r requerido para alcanzar el estado estacionario. Si $\sigma_{\text{cap}}^r = 1$, entonces el espermatozoide dado r será considerado como capacitado.

2.6. Resumen de métodos

En la calibración y análisis de nuestro modelo de red, podemos distinguir tres tipos de parámetros:

- Aquellos que afectan la dinámica individual de la red: $w_{i,j}$, un peso que determina la contribución del regulador j en el nodo i ; $\tau_{i,j}$, un parámetro cinético que determina la tasa de influencia del regulador j en el nodo i .
- Aquellos que impactan en la población de redes: D , la desviación estándar de la distribución Gaussiana usada para muestrear el número de transportadores iónicos.
- Aquellos relacionados a la medición de la dinámica de la red que constituyen nuestra definición operacional de capacitación (Sec. 2.5): W , una ventana de observación del promedio móvil que ajusta el nivel de suavizado de las variables de entrada del nodo integrador, θ , un umbral de la actividad promedio necesaria para activar al nodo integrador; θ_c , un umbral de la actividad promedio del nodo integrador necesaria para que un espermatozoide se clasifique como capacitado.

En la última sección de este trabajo, se explora el bloqueo (mutantes knockout) y sobre activación (mutantes constitutivos) de nodos selectos. Para el primer escenario, se pone el nodo mutado en su estado menos activo (0), mientras que para el segundo, el nodo se fija en su estado mas activo.

Capítulo 3

Resultados

A fin de presentar los resultados principales de este trabajo, primero se reprodujeron los cambios cualitativos reportados en la literatura, electrofisiológicos y de señales de fosforilación temprana típicamente observados en poblaciones de espermatozoides. Para esto, se validó la compatibilidad entre las simulaciones y los comportamientos reportados en espermatozoides tipo silvestre así como también en mutantes knockout selectos. Basados en esta comparación sistemática, se calibró el modelo y se encontraron los valores de los parámetros que determinan la dinámica de la red, i.e w_{ij} y τ_{ij} .

Posteriormente se muestra el efecto de la variabilidad D sobre las variables definitorias para la capacitación (Ca_i , pH_i , V y PKA). Después, se encontraron los valores numéricos del umbral para el nodo integrador θ , el umbral de actividad θ_c , la ventana de observación W , y la variabilidad D requerida para reproducir la fracción de capacitación reportada en los experimentos. Una vez con el modelo validado que da lugar a la fracción de capacitación correcta, se comparan las distribuciones de Ca_i , pH_i , V y PKA, provenientes de la subpoblación capacitada con la subpoblación no capacitada. Finalmente, se muestra como la fracción de capacitación puede ser modificada a través de perturbaciones en las funciones regulatorias de la red, i.e. mutantes *in silico* individuales y dobles.

Para todas las simulaciones realizadas en este trabajo, se usó un tamaño de población de $N = 2 \times 10^3$ espermatozoides, debido a que a partir de poblaciones de tamaño $N = 10^3$ el comportamiento de las simulaciones numéricas no cambia al incrementar el tamaño de la población.

3.1. Validación del modelo

A fin de poner a prueba el modelo, primero se reprodujeron varios resultados cualitativos de la literatura. Se probaron poblaciones silvestres (WT) y varios knockouts (KO) individuales. Se compararon las mediciones experimentales reportadas con su respectiva contraparte en el modelo (series de tiempo promediadas sobre la población de espermatozoides). En este análisis inicial, no se incluyó variabilidad en los conjuntos de pesos (w_{ij}) que definen las interacciones en la red.

La Tab. 3.1 muestra un resumen de los espermatozoides WT simulados bajo diferentes estímulos, la Tab. 3.2 muestra un resumen de los espermatozoides simulados con bloqueo de nodos selectos. En la Sec. 3.3, se muestra que los resultados de las dos tablas se mantienen incluso cuando se considera una variabilidad de $D = 0,25$.

		Estímulo		
		HCO ₃ _e	✓	✓
		ChAcc	✓	✓
Observables	$\Delta_r^s \text{Ca}_i$	+*	+	+
		+ [31]	+ [32]	+ [13, 33]
	$\Delta_r^s \text{Na}_i$	-*	-	-
		NA	NA	- [16]
	$\Delta_r^s \text{pH}_i$	+*	+	+
		NA	+ [15]	+ [34]
$\Delta_r^s \text{V}$	0	+	-	
	0 [15]	+ [15]	- [35, 36]	
$\Delta_r^s \text{Cl}_i$	0	+	+	
	NA	NA	+ [14]	
$\Delta_r^s \text{PKA}$	+*	+	+	
	NA	NA	+ [37]	

Cuadro 3.1: Resumen de la validación del modelo en observables selectas de la red WT. Cada celda contiene una descripción cualitativa de los cambios observados después de un estímulo dado con respecto a las condiciones basales ($\Delta_r^s = \sigma_i^s - \sigma_i^r$). En la primera columna, solo el aceptor de colesterol (ChAcc) fue agregado. En la segunda columna, solo bicarbonato fue agregado. En la última columna, los dos estímulos fueron agregados al medio extracelular. Para cada celda, la esquina superior derecha corresponde a cambios observados en las series de tiempo promediadas sobre la simulación de 2×10^3 espermatozoides (e.g. Fig. 7.2). Los símbolos -, + y 0 se refieren a una disminución, un incremento y una ausencia de cambio respectivamente. Las equinas inferiores contienen referencias para cada medición experimental específica, NA significa que no hay información disponible en la literatura. El color verde indica coincidencia completa entre simulación y experimento. El superíndice * se refiere a un comportamiento transitorio.

		Variante de red KO				
		CatSper	Slo3	CFTR	ENaC	PKA
Observables	$\Delta_{wt}^{ko} Ca_i$	-	0	0	0	-
	$\Delta_{wt}^{ko} Na_i$	-[31]	-[38]	NA	NA	-[32, 39]
	$\Delta_{wt}^{ko} pH_i$	0	0	+	-	+
	$\Delta_{wt}^{ko} V$	NA	NA	NA	-[16]	+[16]
	$\Delta_{wt}^{ko} Cl_i$	0	0	0	0	0
	$\Delta_{wt}^{ko} PKA$	NA	NA	-[40]	NA	NA
		-	+	0	-	+
		NA	+[41, 42]	+[14, 40]	-[43]	+[44, 45]
		0	+	0	0	0
		NA	NA	-[14]	NA	-[14]
		-	0	0	0	-
		NA	0[36]	0[46]	NA	-[39]

Cuadro 3.2: Resumen de la validación del modelo en redes con mutantes KO selectos. Cada celda contiene una comparación cualitativa de los cambios en una observable dada, después de un estímulo capacitante (ver la última columna de la Tab. 3.1 ($HCO_e + ChAcc$), entre espermatozoides con un nodo bloqueado con respecto de la red WT ($\Delta_{wt}^{ko} = \sigma_i^{ko} - \sigma_i^{wt}$). La esquina inferior izquierda se refiere a la evidencia experimental, acompañada por las referencias (si es que están disponibles), la esquina superior derecha se refiere a los cambios correspondientes a las series de tiempo promediadas sobre 2×10^3 espermatozoides simulados. Las entradas tienen los siguientes significados: NA para el caso de no haber literatura disponible para esa observable particular bajo el bloqueo específico; -, 0 y + corresponden a una disminución, sin cambio y a un incremento con respecto a la respuesta en el control WT. Los colores se refieren al nivel de coincidencia entre experimentos y simulaciones: coincidencia completa (verde), coincidencia parcial (amarillo).

3.2. Efecto de la variabilidad en la cantidad de transportadores iónicos sobre las variables relevantes para capacitación

Motivado por la pregunta de cuáles son los efectos que puede tener la variabilidad de la cantidad de transportadores iónicos sobre la respuesta de capacitación a nivel de población celular, se calculó la distribución de los promedios temporales de las variables más relevantes (V , Ca_i , pH_i y PKA) durante el estímulo capacitante para varios valores de variabilidad D (Fig. 3.1). La variabilidad introducida en la cantidad de transportadores iónicos entre espermatozoides provenientes de una población celular es modelada mediante una distribución Gaussiana truncada donde su ancho es controlado por un parámetro de desviación estándar (D , Sec. 2.2.3). La distribución del potencial de membrana (rojo) se ensancha drásticamente en función de D , y se hace ligeramente bimodal a niveles de D altos, mostrando un pico menor en valores positivos (centrados cerca de 0.1). De forma similar, la distribución de calcio (morado) se hace bimodal a niveles altos de D , con un segundo pico localizado en valores bajos de Ca_i (centrados al rededor de 0.37), sin embargo esta cota superior no cambia en función de variabilidad. Además, la distribución de pH_i (azul) se ensancha drásticamente con la introducción de la variabilidad y cambia de unimodal a bimodal. En contraste, la distribución de PKA (amarillo) no parece ser afectada por la introducción de variabilidad. Con lo anterior, se puede argumentar que la variabilidad regula la probabilidad de que cierta fracción de la población de espermatozoides satisfaga una definición operacional de capacitación mas estricta, esto pudiera estar relacionado con una dinámica mas rica a medida que D se incrementa.

3.3. Parámetros del criterio de capacitación que producen una respuesta heterogénea

Con el propósito de encontrar un conjunto de parámetros razonable para nuestro criterio de capacitación (ver Sec. 2.5), se exploró la relación funcional del porcentaje de capacitación con respecto a tres parámetros (Fig. 3.2): ventana de observación (W) para calcular el nodo integrador (Ec. 2.20), ancho de la variabilidad de la población en la cantidad de transportadores iónicos (D), y umbral de actividad (θ_c) del nodo integrador. Es importante mencionar que el único parámetro de control para cada espermatozoide (representado como una red individual) es la variabilidad (D), puesto que afecta directamente la dinámica de la red a través de modificaciones en las funciones regulatorias. Los otros parámetros usados en la definición operacional de capacitación, W , θ y θ_c , son cantidades auxiliares de observación usadas para analizar las series de tiempo generadas por cada realización de espermatozoide individual y son parte del criterio de selección propuesto en la Sec. 2.5. La definición operacional ayuda a: 1) Discernir fluctuaciones estocásticas relevantes para la capacitación de simplemente ruido (parámetro θ), 2) encontrar cuál es la escala de tiempo de la actividad conjunta de las cuatro variables selectas (parámetro W), 3) asegurar que los cambios requeridos no son transitorios en las series de tiempo de célula única, 4) medir la fuerza de la actividad conjunta de las cuatro variables selectas a lo largo del tiempo de observación (parámetro θ_c), y 5) permitir discriminar entre

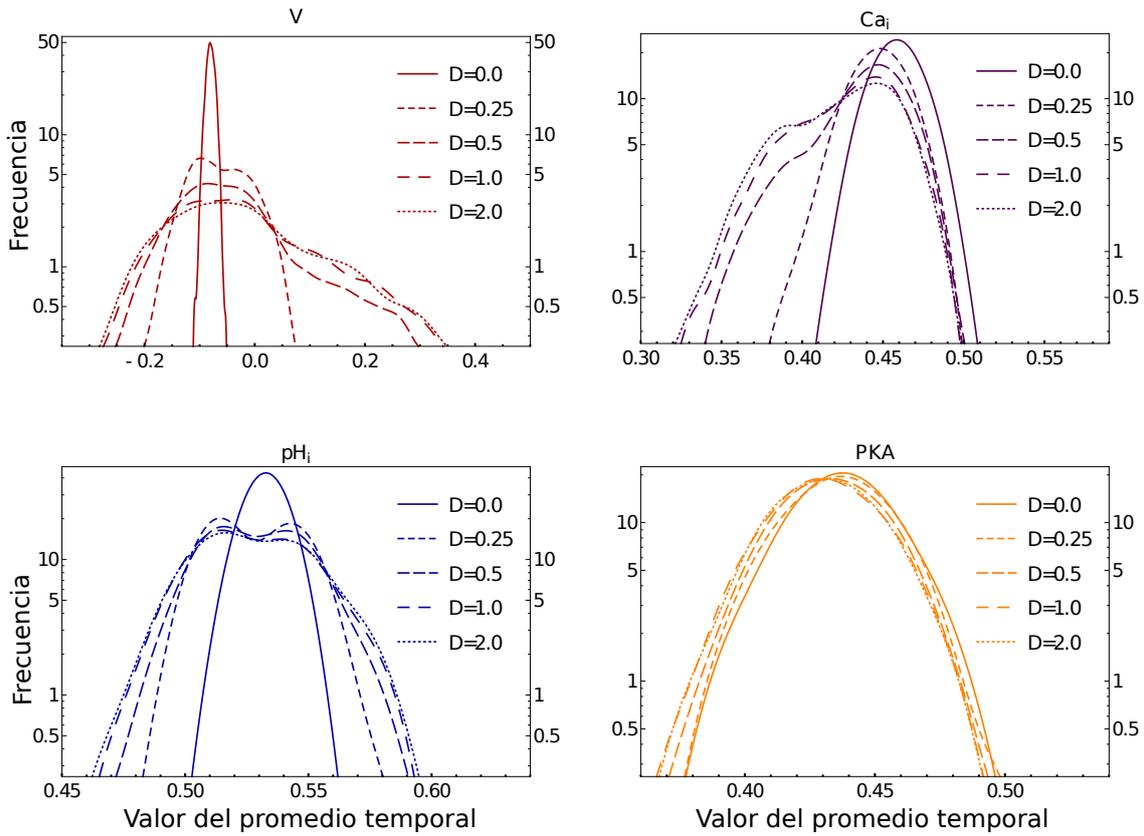


Figura 3.1: Efecto de la variabilidad sobre la distribución de promedios temporales de las variables selectas provenientes de una población de 2×10^3 espermatozoides estimulados, donde D es el valor numérico de la desviación estándar de la distribución Gaussiana usada para muestrear los conjuntos de pesos \tilde{w}^r para cada espermatozoide r de la población (Sec. 2.2.3).

espermatozoides capacitados y no capacitados.

Nótese que a medida que el umbral de actividad θ_c se incrementa la fracción de capacitación máxima alcanzable disminuye. Además, se puede observar una meseta en la superficie dentro de una región bien definida de tamaño de ventana de observación pequeño ($W = 10$ a $W = 200$). Mas aún, el máximo global de la fracción de capacitación se encuentra dentro de esta región de W pequeña en todas las superficies mostradas. Esta familia de superficies fue calculada con un umbral de integración fijo $\theta = 0,225$ a fin de elegir una variabilidad capaz de satisfacer los niveles de fracción de capacitación reportados en la literatura lo mejor posible REF. Ajustando el umbral de integración θ y el umbral de actividad θ_c , una región bien delimitada puede ser conseguida donde varias combinaciones de W y D reproducen una fracción de capacitación similar a la que se observa en experimentos de poblaciones ($\approx 30\%$) (meseta blanca a $\theta = 0,15$, Fig. 3.2). De esta meseta definida con umbral de actividad $\theta_c = 0,15$, se eligió una combinación de parámetros de referencia (punto morado) para el resto de los análisis: el mínimo de variabilidad al cual la región de interés comienza a desarrollarse ($D = 0,25$), y una ventana de observación donde el pliegue se maximiza ($W = 70$).

Vale la pena mencionar que la ventana de observación ($W = 35$) podría estar relacionada a la fluctuación típica más lenta de las variables selectas (PKA), o estar

relacionada al período del atractor estocástico subyacente.

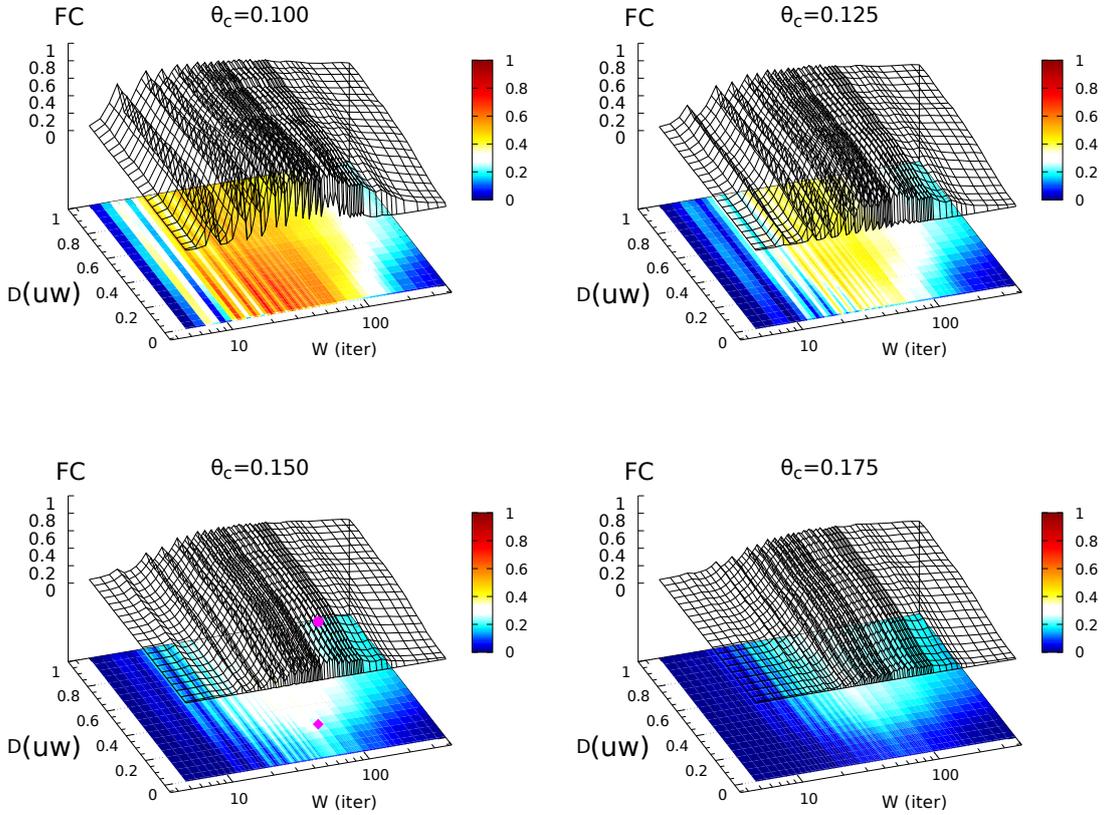


Figura 3.2: Fracción de capacitación (FC) en poblaciones de espermatozoides en función de tres parámetros: tamaño de la ventana de observación (W , en iteraciones), desviación estándar de la variabilidad Gaussiana (D , en unidades de pesos) y umbral de actividad del nodo integrador (θ_c). En todas las superficies, cada punto proviene de una población de 2×10^3 espermatozoides con simulaciones de 20×10^3 iteraciones de duración (5×10^3 iteraciones en el estado de reposo, 15×10^3 iteraciones después del estímulo) y un umbral de integración $\theta = 0,225$. La clasificación de capacitado contra no capacitado se aplica a las últimas 10^4 iteraciones de cada espermatozoide individual. La barra de colores representa los niveles de fracción de capacitación. Nótese que la zona blanca corresponde al nivel de capacitación de $30 \pm 5\%$, el cual es cercano a los niveles típicamente observados para capacitación *in vitro* en espermatozoides silvestres. El conjunto de parámetros elegido para el resto de análisis ($D = 0,25$, $W = 70$, $\theta = 0,225$, $\theta_c = 0,15$) se indica en morado (circulo en la superficie, diamante en el mapa de calor).

3.3.1. Distribuciones de los promedios temporales de las variables selectas provenientes de subpoblaciones de espermatozoides clasificadas

Después de clasificar a los espermatozoides de acuerdo al criterio descrito en esta sección, se caracterizaron para cada subpoblación de espermatozoides (capacitados

contra no capacitados) las distribuciones de los promedios temporales de las cuatro variables selectas; potencial de membrana (V , rojo), calcio intracelular (Ca_i , morado), protones intracelulares (pH_i , azul) y actividad de la proteína quinasa A (PKA, amarillo) en la Fig. 3.3. Para las distribuciones de Ca_i , pH_i y PKA, se observa un ligero incremento en sus respectivos valores de mediana de las distribuciones provenientes de los espermatozoides capacitados con respecto a lo no capacitados, donde el ancho de las tres distribuciones no parece cambiar. Significativamente, el potencial de membrana muestra una disminución en el valor de la mediana de la distribución con respecto a los espermatozoides no capacitados, donde la cota superior e inferior son desplazadas a valores más negativos en comparación con los espermatozoides no capacitados. Además, el potencial de membrana muestra una clara separación entre espermatozoides capacitados y no capacitados, cuando se compara con las otras tres variables mostradas.

Resumiendo, la subpoblación capacitada presenta espermatozoides más hiperpolarizados con un moderado incremento en Ca_i , pH_i y la actividad de PKA con respecto a la subpoblación no capacitada. Claramente, las distribuciones reportadas en la figura 3.1 se pueden recuperar mezclando la subpoblación capacitada con la no capacitada mostradas en la figura 3.3.

3.4. Controlando los niveles de fracción de capacitación

A fin de obtener una intuición de la importancia relativa de las proteínas más relevantes que regulan a la capacitación, se analizó la respuesta de capacitación ante mutantes individuales y dobles provenientes de una lista de nodos selectos de interés (Fig. 3.4). El análisis fue limitado a proteínas que se sabe se expresan específicamente en el flagelo del espermatozoide (sNHE, Slo3, CatSper, PKA) y aquellas que directamente modifican las variables electroquímicas de interés en la respuesta de capacitación (ENaC, CFTR). Adicionalmente al esquema previamente presentado de KO (Tab. 3.2), se exploró otro esquema de perturbaciones: mutantes constitutivos (CM), en los cuales el nodo de interés se fija en el estado activado durante toda la simulación. La fracción de capacitación resultante después del estímulo capacitante en cada mutante es representada mediante una celda coloreada. Como referencia, una población de espermatozoides silvestre (control no perturbado) alcanza aproximadamente el 30% de nivel de capacitación (el color blanco representa la región de $30 \pm 5\%$). Los escenarios de KO y CM individuales son mostrados en los triángulos inferior izquierdo y superior derecho respectivamente, los casos mixtos se encuentran en el cuadrante superior izquierdo. En los escenarios de mutantes KO se puede observar que el efecto predominante es en general una disminución de los niveles de capacitación, a excepción de las combinaciones de $CFTR^{KO}$ y $ENaC^{KO}$. En el triángulo de CM el efecto predominante es incrementar los niveles de capacitación, exceptuando las combinaciones de $CatSper^{CM}$, $CFTR^{CM}$ y $ENaC^{CM}$. Los escenarios de casos mixtos muestran un patrón más complicado que los casos individuales. Este tipo de escenarios permiten validar las posibles interferencias entre nodos. Por ejemplo, el modelo predice que la sobre activación de cualquiera de los nodos selectos no es suficiente para mantener la fracción de capacitación típica pues es disminuida por ejemplo por el bloqueo de Slo3, CatSper o PKA. En contraste,

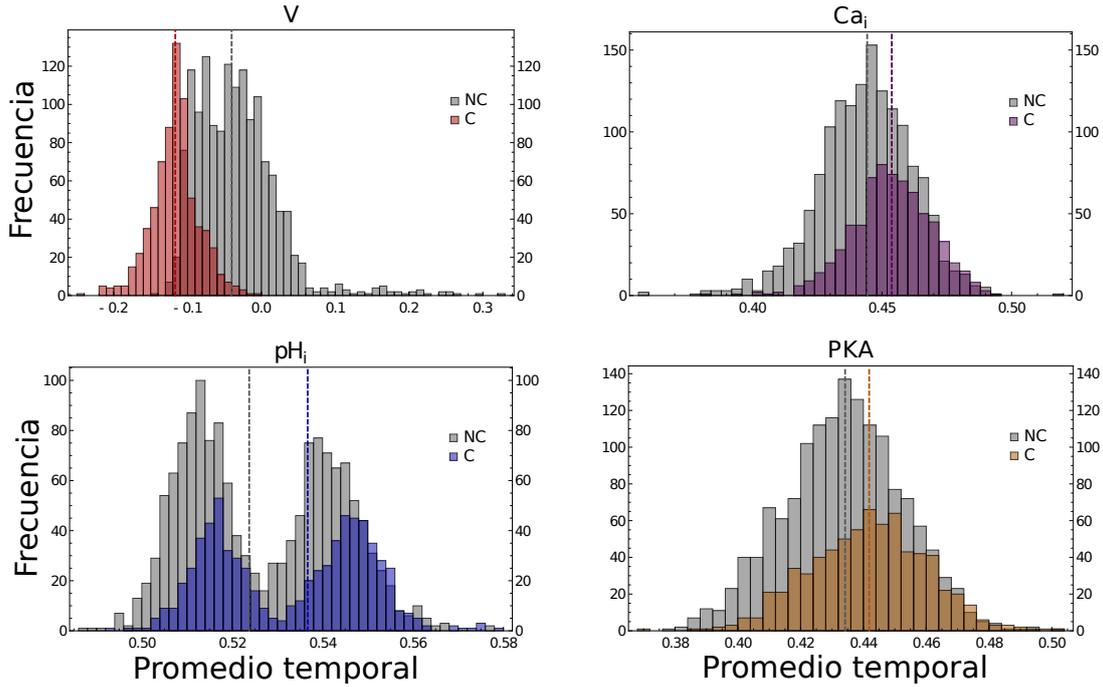


Figura 3.3: Distribuciones de los promedios temporales de las variables relevantes para la capacitación en poblaciones de espermatozoides simuladas bajo condiciones capacitantes. Los espermatozoides fueron separados de acuerdo al clasificador definido en la Ec. 2.21 (Sec. 2.5). Para cada gráfica, la distribución de aquellos espermatozoides que no alcanzaron el estado capacitado (NC) son mostradas en gris. La fracción capacitada de espermatozoides es etiquetada como (C). Los parámetros usados para la clasificación de los espermatozoides son: umbral de integración $\theta = 0,225$, umbral de actividad $\theta_c = 0,15$, ventana de observación $W = 70$ y variabilidad $D = 0,25$. Los valores usados para construir las distribuciones provienen de los promedios temporales de las variables selectas de poblaciones de 2×10^3 espermatozoides durante 15×10^3 iteraciones con el estímulo capacitante, después de desechar 5×10^3 iteraciones en el estado de reposo. A fin de comparar las distribuciones, las medianas de la distribución son indicadas como líneas punteadas. Estos valores son: V $-0,040$ (NC) y $-0,122$ (C), Ca_i $0,444$ (NC) y $0,454$ (C), pH_i $0,524$ (NC) y $0,537$ (C), finalmente PKA $0,434$ (NC) y $0,442$ (C).

en el caso de sNHE^{KO}, Slo3 puede totalmente salvar la respuesta de capacitación e incluso sobrepasar los niveles WT.

Nótese que la sobre estimulación de Slo3 o PKA puede maximizar los niveles de capacitación en la mayoría de combinaciones, ellos son los potenciadores mas fuertes predichos por el modelo. Esto está de acuerdo con el hecho de que ellos son los nodos que afectan el potencial de membrana mas fuertemente REF, una variable que es marcadamente diferente entre poblaciones de espermatozoides capacitados y no capacitados (Fig.3.3).

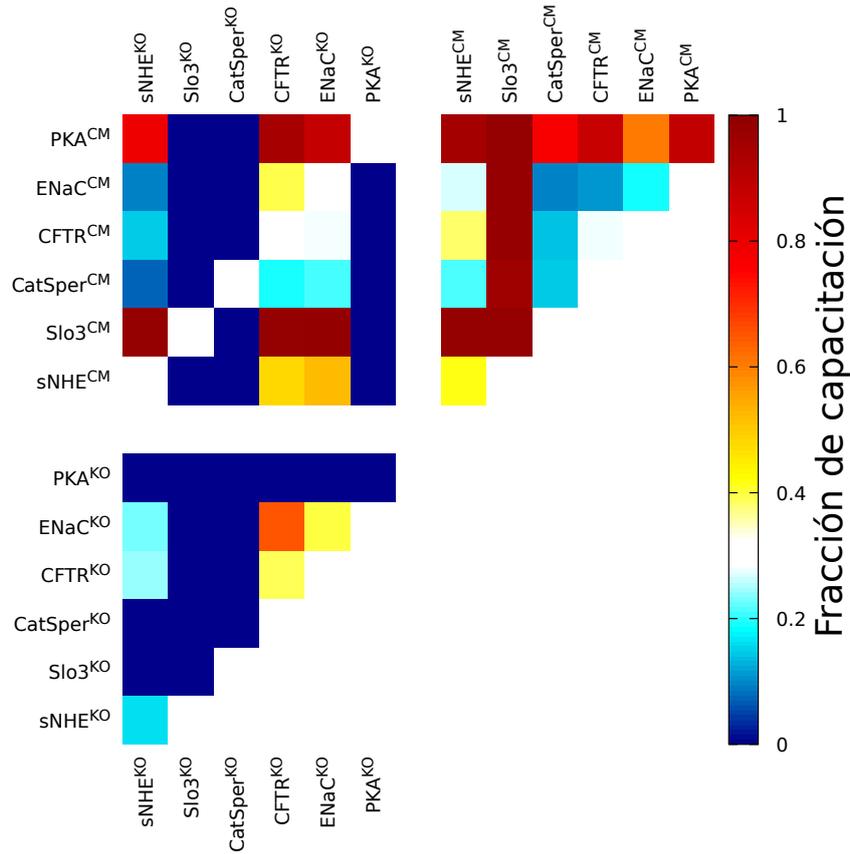


Figura 3.4: Fracción de espermatozoides capacitados teniendo una o dos perturbaciones: inactivación (KO, estado fijado en 0), constitutivamente activo (CM, estado fijado en 1). Los cálculos fueron hechos con los últimos 10^4 pasos de tiempo de simulaciones de 15×10^3 pasos de tiempo de duración, en poblaciones de 2×10^3 espermatozoides al igual que en la Fig.3.2. Se usó una ventana de observación de tamaño 70, una variabilidad Gaussiana de $D=0.25$, un umbral del nodo integrador de $\theta = 0,225$ y un umbral de actividad de $\theta_c = 0,15$ como en la Fig. 3.2. La zona blanca indica los niveles de capacitación que están dentro del rango típico observado en capacitación *in vitro* en espermatozoides silvestres ($30 \pm 5\%$).

Capítulo 4

Discusión

En este trabajo se propuso un nuevo esquema de actualización de la dinámica que permite la introducción de diferentes escalas de tiempo de interacción, así como ocurre con varias interrelaciones involucradas en la vía de señalización de la capacitación mencionadas en la Sec. 1. En particular, este marco de trabajo matemático considera el papel de la variabilidad en elementos de interés, justo como es el caso de la cantidad de transportadores iónicos en la población de espermatozoides.

Ha habido intentos previos que solo se han enfocado en la búsqueda de la topología de la red relevante a la capacitación, donde estas redes fueron construidas a través de una aproximación de “arriba hacia a abajo” con técnicas de minado de textos [47-49]. Para nuestro modelado de capacitación se sigue una aproximación de “abajo hacia a arriba” con el objetivo de caracterizar los mecanismos moleculares en la dinámica de la red. Más aún, hasta donde es de nuestro conocimiento, este es el primer modelo dinámico para la capacitación de mamífero que reproduce varios experimentos relevantes reportados en la literatura (Tab. 3.1 y 3.2). Específicamente reproduce $\approx 80\%$ de la literatura disponible a la fecha (celdas verdes), donde el 20% restante no está en contradicción con el modelo (celdas amarillas). No se puede descartar la posibilidad de componentes y mecanismos faltantes aún por ser caracterizados en el campo, los cuales podrían complementar las funciones regulatorias del modelo para contribuir al aumento de coincidencia con los experimentos reportados.

El efecto de la variabilidad en las observables relevantes para la capacitación es incrementar la diversidad y rango de posibles dinámicas en la población (Fig. 3.1). Es interesante que la introducción de variabilidad induce bimodalidad en las distribuciones del potencial de membrana, calcio intracelular y pH_i (Fig. 3.1). Estas formas en las distribuciones se asemejan a las que se han reportado para el potencial de membrana y el calcio intracelular en experimentos de citometría de flujos [33, 36]. Lo dicho arriba es consistente con la observación de que la ausencia de variabilidad en los transportadores iónicos (i.e $D = 0$) lleva a niveles de capacitación despreciables, como se muestra en los porcentajes reportados (Fig. 3.2).

Vale la pena señalar que el valor de la variabilidad usado $D = 0,25$, es consistente con la distribución de probabilidad para expresión de proteínas el cual ha sido determinado experimentalmente para otras células [21, 22]. Nótese que como consecuencia del valor del parámetro de control (D), aproximadamente 30% de la subpoblación capacitada (proveniente de una población inicial mostrada en Fig. 3.1) tiene características de espermatozoides altamente hiperpolarizados con niveles mas

altos de Ca_i , pH_i y actividad de PKA con respecto a la subpoblación no capacitada (ver Fig. 3.3). Uno de los principales resultados es que la variabilidad propuesta en la cantidad de transportadores iónicos de la población de espermatozoides modelada podría ser una explicación para la base de la respuesta típica heterogénea del espermatozoide de ratón en presencia de un medio capacitante *in vitro*, haciendo una predicción experimental de la forma de la distribución ($G_j^r \equiv$ Gaussiana) y el valor de la desviación estándar de los transportadores iónicos en la membrana del espermatozoide ($D = 0,25$). Adicionalmente, predicciones experimentales son proporcionadas para las escalas de tiempo de la actividad conjunta ($W = 35$) y la fuerza de esta actividad conjunta ($\theta_c = 0,15$) entre el potencial de membrana, el calcio intracelular, el pH intracelular y la actividad de PKA.

Otro resultado que vale la pena resaltar, es el análisis de los mutantes individuales y dobles (Fig. 3.4), el cual ofrece una intuición de como controlar los niveles de capacitación a través de modificaciones de nodos específicos de la vía de señalización de la capacitación. Además, este análisis hace mas evidente las jerarquías de los elementos de la red con respecto a otros. Varios casos de interés alcanzan casi el 100% de capacitación o la anulan. De especial interés son los escenarios donde el Slo3 y PKA son constitutivamente sobreactivados, nuestro modelo anticipa casi la capacitación completa, sugiriendo que la estimulación de elementos específicos en la red podría llevar al diseño de experimentos para ayudar al estudio de fertilidad asistida. Otro resultado es que la variante del modelo donde CatSper es mutado constitutivamente (CatSper^{CM}, Fig. 3.4), predice que los niveles de capacitación disminuyen con respecto a la red WT, a pesar de que no se anulan como en el caso de KO. Esto sugiere que la función adecuada de CatSper en la vía de señalización de la capacitación podría implicar una dinámica de compuerta que fluctúe. Contrario a lo que se esperaría (9,46), el modelo predice que el bloqueo de CFTR lleva a un aumento de la capacitación y viceversa; esto requiere mayor estudio y podría ser indicativo de la necesidad de mecanismos adicionales relacionados a la función adecuada de Cl^- aún por caracterizarse.

Si bien a lo largo de esta tesis se pone énfasis en la importancia en la regulación de la capacitación por la variabilidad en el numero de transportadores ionicos, cabe resaltar dos comportamientos determinantes en el planteamiento del modelo: confluencia y sinergia. El criterio de capacitación empleado requiere de la confluencia de un comportamiento específico de los nodos selectos. Si solo uno de esos nodos altera su comportamiento, la capacitación se pierde. La sinergia se manifiesta al considerar la potenciación sobre la fracción de capacitación por medio de mutantes knockout y mutantes constitutivos cuando se llevan a cabo por pares como se muestra en la sección 3.4.

Capítulo 5

Limitaciones y perspectivas

El modelo ofrece una aproximación de grano grueso al fenómeno de capacitación, mostrando principalmente comportamientos cualitativos. Ofrece una descripción del transporte iónico y la fosforilación temprana, dejando a un lado módulos importantes relacionados a: la fosforilación tardía, el metabolismo homeostático, y la reacción acrosomal *per se*, entre otros. Mas aún, el modelo sólo sugiere posibilidades de comportamiento sinergista entre algunos transportadores iónicos sin una explicación completa, como se muestra en la Fig. 3.4. A fin de mejorar la validación del modelo, mas datos experimentales son necesarios (entradas NA en la Tab. 3.2).

Así como la mayoría del trabajo experimental realizado en el campo de la fisiología del espermatozoide, el presente estudio se enfoca en la configuración *in vitro*, en la cual, el estímulo capacitante es constante a lo largo del tiempo. Sin embargo, la capacitación *in vivo* involucra un estímulo dinámico, puesto que los espermatozoides atraviesan cambios de entorno a lo largo de su trayecto por el tracto genital femenino, desde la vagina hasta el oviducto. La extensión del modelo para atacar aquellos escenarios mas complicados y realistas permanece como un reto abierto.

En proyectos futuros, podría ser interesante una modelación de variable continua al fenómeno de capacitación para una comparación mas cercana con los experimentos. También podría ser relevante incluir otros módulos importantes para la capacitación (e.g. cambios fisiológicos en la cabeza del espermatozoide, metabolismo homeostático, cascadas de fosforilación de serinas y trioninas, etc). Igualmente, un estudio detallado y extendido del análisis de los mutantes explorado aquí (Fig. 3.4) en términos de la información compartida o transferida (e.g. transfer entropy [50]) entre elementos selectos de la red de capacitación (e.g. transportadores iónicos) podría ayudar a desenmarañar la organización jerárquica de la vía de señalización y finalmente explicar el posible comportamiento sinérgico entre estos elementos.

En variedad de redes de regulación biológica se ha puesto en evidencia que su dinámica se desarrolla en un régimen llamado crítico [51], donde por ejemplo, robustez [1] y capacidad de evolución [52] pueden ocurrir. Esta característica también se ha podido corroborar para el caso del erizo de mar [2]. Queda abierta la pregunta de si la criticalidad está presente en la capacitación de mamíferos.

Capítulo 6

Apendices

En esta sección se describen a detalle los métodos para construir las funciones regulatorias de: los nodos de concentración iónica, los nodos de los transportadores iónicos, los nodos de corriente iónica, los nodos auxiliares, los nodos de fosforilación temprana, entre otros. Además, se da una tabla con las condiciones iniciales usadas en las simulaciones. En seguida, los casos particulares de nodos de flujos iónicos con modificadores son explicados.

Debido al formalismo discreto, se emplea una aproximación discretizada de la ley de Ohm, el potencial de Nernst y potenciales electroquímicos. Se calcularon las funciones regulatorias de acuerdo a las condiciones fisiológicas del sistema. Todos los parámetros son reportados en forma de tabla y los valores lanzados por las ecuaciones fueron discretizados en dos o tres estados de acuerdo a sus reguladores.

6.1. Condiciones iniciales

La Tab. 6.1 muestra los valores numéricos discretos usados en todas las simulaciones como condiciones iniciales.

6.2. Nodos de concentración iónica intracelular y extracelular

Los nodos de concentración iónica solamente consideran dos estados: baja concentración (estado 0) y alta concentración (estado 1). Con respecto a los nodos de concentración intracelular, tienen dos reguladores, el nodo de flujo total del ion correspondiente y la concentración intracelular por sí misma. Dependiendo de la dirección del flujo y la concentración intracelular a un paso de tiempo previo, podrá haber un incremento, nada o una disminución de la concentración. Para pH, sodio y bicarbonato, hay un regulador extra relacionado a la recuperación del estado basal en cada caso correspondiente. La Tab. 6.2 resume los valores numéricos de concentración intracelular y extracelular usados en las ecuaciones para calcular la dirección y magnitud de los flujos a través de los respectivos transportadores iónicos.

Nodo	Nombre	Valor
$\Delta\mu_{\text{NCX}}$	Intercambiador sodio/calcio FEM	0
$\Delta\mu_{\text{PMCA}}$	Bomba de calcio de la pieza principal del flagelo FEM	0
$\Delta\mu_{\text{Cat}}$	CatSper FEM	0
Ca_i	Calcio intracelular	0
Ca_e	Calcio extracelular	1
Na_i	Sodio intracelular	1
Na_e	Sodio extracelular	1
pH_i	pH intracelular	0
pH_e	pH extracelular	1
V	Potencial de membrana	0
Cat	Compuerta de CatSper	0
ICa	Corriente de calcio	0
IH _i	Corriente de protones	0
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico	0
IP3	Inositol trifosfato	0
$\Delta\mu_{\text{SPCA}}$	Bomba de calcio de los depositos de calcio FEM	0
$\Delta\mu_{\text{IP3R}}$	Canal de IP3 FEM	0
Slo3	Compuerta de Slo3	0
K_e	Potasio extracelular	0
$\Delta\mu_{\text{KSper}}$	Slo3 FEM	0
ENaC	Compuerta de ENaC	0
CFTR	Compuerta de CFTR	0
$\Delta\mu_{\text{ENaC}}$	ENaC FEM	0
$\Delta\mu_{\text{SLC26}}$	Intercambiador electrogénico cloro/bicarbonato FEM	0
$\Delta\mu_{\text{CFTR}}$	CFTR FEM	0
Cl_i	Cloro intracelular	0
Cl_e	Cloro extracelular	1
HCO_3_i	Bicarbonato intracelular	0
HCO_3_e	Bicarbonato extracelular	0
sAC	Adenilato ciclasa soluble	0
PDE	fosfodiesterasas generales	0
PKA	Proteína quinasa A	0
INa	Corriente de sodio	0
$\Delta\mu_{\text{NBC}}$	Cootransportador sodio/bicarbonato FEM	0
sNHE	Intercambiador sodio/protón	0
$\Delta\mu_{\text{sNHE}}$	intercambiador sodio/protón FEM	0
$\Delta\mu_{\text{SLCAE}}$	Intercambiador electroneutro cloro/bicarbonato FEM	0
IHCO3	Corriente de bicarbonato	0
ICl	Corriente de Cloro	0
ChAcc	Aceptor de colesterol	0
$\Delta\mu_{\text{pHR}}$	nodo de restablecimiento de pH FEM	0
$\Delta\mu_{\text{NaR}}$	nodo de restablecimiento de sodio FEM	0
$\Delta\mu_{\text{HCO3R}}$	nodo de restablecimiento de bicarbonato FEM	0
$\Delta\mu_{\text{Leak}}$	Corriente de fuga FEM	0

Cuadro 6.1: Resumen de las condiciones iniciales usadas para todas las simulaciones, FEM indica fuerza electromotriz.

Nodo	Estado 0	Estado 1	Estado 2	Unidades	Referencia
Ca _e	0.01	2	NA	mM	[13]
pH _e	6.80	7.20	NA	NA	[9]
ChAcc	Ausencia	Presencia	NA	NA	[23]
Na _e	0.01	130	NA	mM	[16]
HCO _{3e}	0.01	25	NA	mM	[15]
Cl _e	0.01	130	NA	mM	[14]
K _e	0.01	5	NA	mM	[9]
Ca _i	0.10	0.25	NA	μM	[13]
pH _i	6.50	6.80	NA	NA	[9]
Na _i *	10	14	NA	mM	[16]
HCO _{3i} **	5	15	NA	mM	[15]
Cl _i	30	40	NA	mM	[14]
V	-20	-40	-60	mV	[9]

Cuadro 6.2: Resumen de los valores numéricos para los estados de los nodos de concentración iónica intracelular, extracelular y potencial de membrana. (*) Este valor es una extrapolación aproximada de [16]. (**) Este valor es una hipótesis de trabajo.

6.3. Nodos de compuerta para los canales iónicos

6.3.1. CatSper

A fin de modelar la compuerta de CatSper, se consideraron cuatro reguladores: el potencial de membrana, el calcio intracelular, el pH intracelular y PKA. Se utilizaron las siguientes ecuaciones para modelar el efecto de los tres primeros reguladores mencionados:

$$P_V(V, \text{pH}_i) = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_{pH}(\text{pH}_i) - V}{\kappa}}} \quad (6.1a)$$

$$V_{pH}(\text{pH}_i) = A \frac{K_{pH}^{n_H}}{\text{pH}_i^{n_H} + K_{pH}^{n_H}} + B \quad (6.1b)$$

$$P_{Ca}(\text{Ca}_i) = \frac{K_{Ca}^{n_{Ca}}}{\text{Ca}_i^{n_{Ca}} + K_{Ca}^{n_{Ca}}} \quad (6.1c)$$

P_V es la probabilidad de que los canales de CatSper estén abiertos por influencia del potencial de membrana y protones. La Ec. 6.1a también se refiere a la función usada para modelar la curva sigmoide conductancia contra voltaje (G/V) como se ha reportado en [53]. La ecuación 6.1b (V_{pH}) modela el corrimiento de la curva de activación media del potencial de membrana de la ecuación Ec. 6.1a debido al pH_i. P_{Ca} es la probabilidad de que los canales de CatSper estén abiertos por influencia del calcio intracelular. Donde κ , K_{pH} y K_{Ca} son parámetros de ajuste empíricos, además de que n_{Ca} y n_{pH} son las estequiometrías de calcio y protones respectivamente.

Constante	Valor numérico
κ	30mV
K_{Ca}	0.5mM
n_{Ca}	2
A	79.7mV
K_{pH}	6.81
n_H	35.52
B	8.35mV

Cuadro 6.3: Resumen de las constantes de las ecuaciones para el cálculo de la compuerta de CatSper.

De acuerdo con la combinación de estados de los reguladores, se realiza el producto de las ecuaciones 6.1b y 6.1c para obtener la probabilidad de que los canales de CatSper estén abiertos por influencia de sus tres reguladores. Posteriormente se discretiza este producto mediante un umbral $max(P_V P_{Ca})/2$, donde la función max obtiene el valor mas grande posible de este producto dadas las condiciones fisiológicas. Al producto por abajo de este umbral se les asocia el estado 0 (compuerta basal) y al producto por encima de este umbral se les asocia el estado 1 (compuerta más permeable). La única acción de PKA en la compuerta consiste en correr la permeabilidad al estado 1 a pesar de tener un pH_i y un potencial de membrana de reposo. La Tab. 6.3 contiene un resumen de los valores numéricos usados en las ecuaciones para los cálculos de la presente compuerta.

6.3.2. ENaC

Su permeabilidad se incrementa (estado 1) con respecto a los niveles basales (estado 0) cuando su regulador CFTR está en el estado 0.

6.3.3. CFTR

Su permeabilidad se incrementa (estado 1) con respecto a los niveles basales (estado 0) cuando su único regulador PKA está activo (estado 1).

6.3.4. Slo3

A fin de elegir si el nodo en cuestión toma un estado basal (estado 0) o un estado mas permeable (estado 1), se usó la ecuación de compuerta del material suplementario de [54] con sus respectivas constantes numéricas. La discretización se lleva a cabo con un criterio semejante al mencionado en 6.3.1. Adicionalmente y consecuencia de la calibración del modelo mencionada en la validación 3.1, se sigue que Slo3 sólo puede tomar el estado 1 si ChAcc o PKA o los dos estan en el estado 1. También se sigue que si PKA y CHAcc están en el estado 1 simultáneamente, Slo3 puede tomar el estado 1 incluso en el potencial de reposo.

6.4. Nodos de corriente para canales iónicos

6.4.1. KSper

Es sabido que Slo3 es el principal responsable de la corriente de potasio llamada KSper en el espermatozoide [55]. Sin embargo, a diferencia de Slo1, la selectividad de Slo3 es débil, esta se ha medido en expresión heteróloga del canal ($P_{K^+}/P_{Na^+} \sim 5$) [56], la cual podría resultar en un potencial reverso cercano al potencial de reposo. Incluso se ha reportado que el bloqueo o elminación de Slo3 anula la hiperpolarización típica en espermatozoides capacitados [41, 42]. La apertura de un canal con estas características no es capaz de generar corrientes hiperpolarizadoras. Para superar esta aparente contradicción, se decidió modelar esta corriente como puramente de K^+ , la cual podría participar mediante un posible canal adicional de K^+ río abajo de la actividad de Slo3 y con una mayor selectividad. A fin de obtener una noción de la magnitud y dirección de esta corriente, se consideró un flujo de potasio K^+ de acuerdo al potencial de Nernst y la ley de Ohm como sigue:

$$E_{KSper}(K_e, K_i) = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{K_e}{K_i} \right) \quad (6.2a)$$

$$\Delta\mu_{KSper} = V - E_{KSper} \quad (6.2b)$$

$$I_{KSper} = P_{Slo3} N_{Slo3} g_{Slo3} \Delta\mu_{KSper} \quad (6.2c)$$

Tomando en cuenta la combinación de los estados de sus reguladores (K_e, K_i, P_{Slo3}, V), se discretizó la ecuación 6.2b para tener la fuerza electromotriz de la corriente de KSper. El estado de este nodo sera -1 si el gradiente genera un flujo entrante, 0 si no hay flujo neto y 1 si el gradiente causa un flujo saliente de potasio. Donde P_{Slo3} es el nodo de compuerta de Slo3, N_{Slo3} es el numero de canales total y g_{Slo3} es la conductancia unitaria.

6.4.2. Corriente de CFTR

A fin de obtener noción de la magnitud y dirección del flujo a través de este canal, se consideró el gradiente de cloro/bicarbonato y se usó la ecuación de voltaje Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) junto con la ley de Ohm para el calculo del potencial reverso E_{CFTR} y la corriente I_{CFTR} :

$$E_{CFTR}(HCO3_e, Cl_e, HCO3_i, Cl_i) = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{HCO3Cl} HCO3_i + Cl_i}{P_{HCO3Cl} HCO3_e + Cl_e} \right) \quad (6.3a)$$

$$I_{CFTR}(P_{CFTR}, V, E_{CFTR}) = P_{CFTR} N_{CFTR} g_{CFTR} (V - E_{CFTR}) \quad (6.3b)$$

De acuerdo a los estados de sus reguladores ($HCO3_e, Cl_e, HCO3_i, Cl_i, P_{CFTR}, V$), se decidió por medio de las ecuaciones 6.3a y 6.3b, discretizando igual que en las sección previa 6.3.1, si el nodo de corriente de CFTR tendría una corriente saliente de cloro/bicarbonato (estado -1), una corriente nula (estado 0) o una corriente entrante de cloro/bicarbonato (estado 1). Donde P_{CFTR} es el nodo de compuerta de CFTR, N_{CFTR} es el numero de canales total y g_{CFTR} es la conductancia unitaria.

6.4.3. Corriente de ENaC

A fin de tener noción de la magnitud y dirección de este flujo, se consideró el gradiente de sodio Na^+ para el potencial de Nernst y la ley de Ohm como sigue:

$$E_{\text{ENaC}}(\text{Na}_e, \text{Na}_i) = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\text{Na}_e}{\text{Na}_i} \right) \quad (6.4a)$$

$$I_{\text{ENaC}}(P_{\text{ENaC}}, V, E_{\text{ENaC}}) = P_{\text{ENaC}} N_{\text{ENaC}} g_{\text{ENaC}} (V - E_{\text{ENaC}}) \quad (6.4b)$$

Al igual que en las secciones previas, de acuerdo a los estados de sus reguladores ($\text{Na}_e, \text{Na}_i, P_{\text{ENaC}}, V$), se decidió con ayuda de las ecuaciones 6.4a y 6.4b si el nodo de corriente de ENaC tendrá una corriente saliente (estado -1), una corriente nula (estado 0) o una corriente entrante de sodio (estado 1). Donde P_{ENaC} es el nodo de compuerta de ENaC.

6.4.4. Corriente de CatSper

A fin de tener una noción de la magnitud y dirección del flujo de este nodo, se consideró solamente el gradiente de calcio Ca^{2+} para el potencial de Nernst y la ley de Ohm como sigue:

$$E_{\text{CatSper}}(\text{Ca}_e, \text{Ca}_i) = \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{\text{Ca}_e}{\text{Ca}_i} \right) \quad (6.5a)$$

$$I_{\text{CatSper}}(P_{\text{CatSper}}, V, E_{\text{CatSper}}) = P_{\text{CatSper}} N_{\text{CatSper}} g_{\text{CatSper}} (V - E_{\text{CatSper}}) \quad (6.5b)$$

De acuerdo a los estados de sus reguladores ($\text{Ca}_e, \text{Ca}_i, P_{\text{CatSper}}, V$) se decidió con ayuda de la Ec. 6.5a y 6.5b si el nodo de corriente de CatSper tendrá una corriente saliente (state -1), una corriente nula (state 0) o una corriente entrante de calcio (state 1). Donde P_{CatSper} es el nodo de compuerta de CatSper. La Tab. 6.4 muestra los valores numéricos de las constantes usadas desde la Ec. 6.2a hasta la 6.5b.

6.5. Nodos de cotransportadores e intercambiadores iónicos

6.5.1. Intercambiador electrogénico sodio/calcio

A fin de tener una noción de la dirección del flujo del intercambiador sodio/calcio (NCX), se usó la ecuación del apéndice en [13] con sus respectivas constantes reportadas. Se eligió el estado -1 para un flujo saliente de sodio y un flujo entrante de calcio, el estado 0 para un flujo nulo, el estado 1 para un flujo entrante sodio y un flujo saliente de calcio.

6.5.2. Intercambiador electroneutro sodio/protón

A fin de tener una noción de la dirección del flujo del intercambiador electroneutro específico de espermatozoide (sNHE), se usó la siguiente consideración energética para determinar el estado más probable de acuerdo al gradiente químico de sus reguladores como sigue:

$$\Delta G_{NHE} = \Delta\mu_{Na} - \Delta\mu_H = RT \ln \left(\frac{Na_i}{Na_e} \right) - RT \ln \left(\frac{H_i}{H_e} \right) \quad (6.6)$$

Se asignó el estado -1 al flujo saliente de sodio y al flujo entrante de protones, el estado 0 para un flujo nulo, el estado 1 para un flujo entrante de sodio y un flujo saliente de protones. Este nodo tiene su nodo regulador de compuerta, el cual depende del potencial de membrana y el cAMP. Si hay cAMP en el citosol y el potencial es hiperpolarizado, entonces el flujo es potenciado. Si solamente uno de los reguladores está presente en el estado correcto el flujo es permitido. Si ninguno de los reguladores está en el estado correcto el flujo es prohibido.

6.5.3. Cootransportador sodio/bicarbonato

A fin de tener una noción de la dirección del flujo del cootransportador (NBC), se usó el potencial reverso y las siguientes consideraciones energéticas para determinar el estado mas probable de acuerdo a los gradientes de sus reguladores:

$$E_{NBC} = \frac{RT}{(n_{NBC} - 1)F} \ln \left(\frac{Na_i HCO_3_i^{n_{NBC}}}{Na_e HCO_3_e^{n_{NBC}}} \right) \quad (6.7a)$$

$$\Delta\mu_{NBC} = V - E_{NBC} \quad (6.7b)$$

Se asignó el estado -1 a un flujo saliente, el estado 0 a un flujo nulo y el estado 1 para un flujo entrante de sodio y bicarbonato. La estequiometría sodio/bicarbonato por transporte individual de este cootransportador n_{NBC} , se reporta en Tab. 6.4.

6.5.4. Intercambiador electroneutro cloro/bicarbonato

A fin de tener una noción de la dirección del flujo del intercambiador Cl^-/HCO_3^- (SLCAE), se usó la siguiente consideración energética para determinar el estado mas probable de acuerdo al gradiente de sus reguladores:

$$\Delta G_{AE} = \Delta\mu_{HCO_3} - \Delta\mu_{Cl} = RT \ln \left(\frac{HCO_3_i}{HCO_3_e} \right) - RT \ln \left(\frac{Cl_i}{Cl_e} \right) \quad (6.8)$$

Se asignó el estado -1 para un flujo saliente de cloro y un flujo entrante de bicarbonato, el estado 0 para un flujo nulo, el estado 1 para un flujo entrante de cloro y un flujo saliente de bicarbonato.

Constante	Valor numérico
R	Constante molar del gas ideal
T	37 °C
F	Constante de Faraday
P_{KNa}	5
N_{KSper}	30
g_{KSper}	90 pS
P_{HCO3Cl}	0.48
N_{CFTR}	10
g_{CFTR}	10 pS
N_{ENaC}	10
g_{ENaC}	5 pS
$N_{CatSper}$	900
$g_{CatSper}$	0.5 pS
n_{NBC}	3
n_{SLC26}	2
γ	0.25

Cuadro 6.4: Resumen de las constantes usadas en las ecuaciones de corriente y energía de este apéndice.

6.5.5. Intercambiador electrogénico cloro/bicarbonato

A fin de tener una noción de la dirección del flujo del intercambiador Cl^-/HCO_3^- (SLC26A3), se usó la siguiente consideración energética para determinar el estado mas probable de acuerdo al gradiente de sus reguladores:

$$\begin{aligned} \Delta\mu_{SLC26} &= n_{SLC26}E_{Cl} - E_{HCO3} - (n_{SLC26} - 1)V \\ &= n_{SLC26} \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{Cl_i}{Cl_e} \right) - \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{HCO3_i}{HCO3_e} \right) - (n_{SLC26} - 1)V \end{aligned} \quad (6.9)$$

Se asignó el estado -1 para un flujo saliente de cloro y un flujo entrante de bicarbonato, el estado 0 para un flujo nulo, el estado 1 para un flujo entrante de cloro y un flujo saliente de bicarbonato. La estequiometría de este intercambiador n_{SLC26} , es reportada en Tab. 6.4.

6.6. Nodos de fosforilación temprana

La adenilato ciclasa (sAC) tiene solo dos reguladores: calcio intracelular (Ca_i) y bicarbonato intracelular ($HCO3_i$). La sAC se activa (estado 1) si uno de sus reguladores, sea Ca_i o $HCO3_i$ está en altas concentraciones en el citosol (o los dos simultáneamente en el estado 1), en otro caso la sAC estará inactiva (estado 0).

La fosfodiesterasa (PDA) incrementará su actividad de basal (estado 0) a alta (estado 1) si hay adenosín monofosfato en el citosol (estado 1).

El adenosín monofosfato (cAMP) tiene tres reguladores: él mismo, sAC y PDE. El cAMP permanecerá en su estado previo si sAC y PDE permanecen inactivos. Habrá producción de cAMP (estado 1) mientras sAC este activa (estado 1) . Habrá disminución de sCA (estado 0) mientras solo PDE este activo (estado 1). Habrá

disminución de cAMP (estado 0) si PDE y sCA están simultáneamente activados (estado 1).

La proteína quinasa A permanecerá activa (estado 1) mientras haya cAMP en el citosol (estado 1) en otro caso PKA permanecerá inactivada (estado 0).

6.7. Nodos auxiliares de recuperación

Los nodos de recuperación (pHR, NaR y HCO3R) se activan cuando su variable respectiva (pH_i, Na_i y HCO3_i) permanece alta (estado 1), entonces tiende a llevarla al estado de reposo.

El nodo de corriente de fuga (IL) es un mecanismo no específico de contrapeso para cambios de voltage i.e. tiende a depolarizar el potencial si V está hiperpolarizado (estado -1) y tiende a hiperpolarizar si V está depolarizado (estado 1).

6.8. Modificadores de flujos ionicos

A fin de tomar en cuenta moduladores de flujos ionicos, tales como el acceptor de colesterol (suero de albumina) y fosforilación de proteínas por PKA, se introducen funciones que modifican los pesos de interacción de la ecuación 2.10.

6.8.1. Flujo de cloro

La regulación del nodo integrador de flujo de cloro \tilde{I}_{Cl} es:

$$\begin{aligned} \tilde{I}_{Cl}^r(t+1) = & sgn \left[P^t(\sigma_{ChAcc}) b_{\tau_{ICFTR}}^t G^r(w_{ICFTR}, D) \Delta\mu_{ICFTR}(t) \right. \\ & + 2P^t(\sigma_{CFTR}, \sigma_{ChAcc}, \sigma_{PKA}) b_{\tau_{SLC26}}^t G^r(w_{SLC26}, D) \Delta\mu_{SLC26}(t) \\ & \left. + P^t(\sigma_{ChAcc}) b_{\tau_{SLCAE}}^t G^r(w_{SLCAE}, D) \Delta\mu_{SLCAE}(t) \right], \end{aligned} \quad (6.10)$$

donde el modificador del transportador de cloro P^t se define como sigue:

$$P^t(X) = \begin{cases} 4 & \text{si } \sigma_{CFTR} \wedge \sigma_{PKA} \wedge \sigma_{ChAcc} = 1 \\ 2 & \text{si } \sigma_{CFTR} \wedge \sigma_{PKA} \wedge \neg\sigma_{ChAcc} = 1 \\ 1 & \text{en otro caso} \end{cases} \quad (6.11)$$

6.8.2. Flujo de bicarbonato

La regulación del nodo integrador de flujo de bicarbonato \tilde{I}_{HCO3} es:

$$\begin{aligned} \tilde{I}_{HCO3}^r(t+1) = & sgn \left[P^t(\sigma_{ChAcc}) b_{\tau_{ICFTR}}^t G^r(w_{ICFTR}, D) \Delta\mu_{ICFTR}(t) \right. \\ & - P^t(\sigma_{CFTR}, \sigma_{ChAcc}, \sigma_{PKA}) b_{\tau_{SLC26}}^t G^r(w_{SLC26}, D) \Delta\mu_{SLC26}(t) \\ & - P^t(\sigma_{ChAcc}) b_{\tau_{SLCAE}}^t G^r(w_{SLCAE}, D) \Delta\mu_{SLCAE}(t) \\ & \left. + P^t(\sigma_{ChAcc}) b_{\tau_{NBC}}^t G^r(w_{NBC}, D) \Delta\mu_{NBC}(t) \right], \end{aligned} \quad (6.12)$$

donde el modificador del transportador de bicarbonato $P^t(X)$ se define de la misma forma que el de cloro.

6.8.3. Flujo de sodio

La regulación del nodo integrador de sodio \tilde{I}_{Na} es:

$$\begin{aligned} \tilde{I}_{\text{Na}}^r(t+1) = & \text{sgn} \left[b_{\tau_{\text{NaR}}}^t G^r(w_{\text{NaR}}, D) \Delta\mu_{\text{NaR}}(t) \right. \\ & + b_{\tau_{\text{IENaC}}}^t G^r(w_{\text{IENaC}}, D) \Delta\mu_{\text{IENaC}}(t) \\ & \left. + P^t(\sigma_{\text{ChAcc}}) b_{\tau_{\text{NBC}}}^t G^r(w_{\text{NBC}}, D) \Delta\mu_{\text{NBC}}(t) \right], \end{aligned} \quad (6.13)$$

donde el modificador del transportador de bicarbonato $P^t(X)$ se define de igual forma que el de cloro.

6.9. Miscelanea de nodos

El nodo de inositol trifosfato (IP3) incrementará su concentración en el citosol (estado 1) mientras Ca_i permanezca alto (estado 1) y cAMP permanezca alto (estado 1).

El nodo del canal de calcio sensible a IP3 de los depositos de calcio (IP3R) promoverá una corriente de calcio al citosol (estado 1) mientras IP3 permanezca alto (estado 1) y Ca_i permanezca bajo (estado 0) en el citosol.

El nodo de la bomba de calcio de los depositos de calcio (SPCA) se activará (estado 1) mientras haya una alta concentración de calcio intracelular (estado 1) promoviendo una corriente de calcio desde el citosol hacia el interior de los depositos de calcio.

El nodo de las bombas de calcio de la pieza principal del flagelo (PMCA) se activará (estado 1) mientras haya una concentración de calcio intracelular alta (estado 1) promoviendo una corriente desde el citosol hacia el exterior de la célula [13].

Bibliografía

- [1] Alejandro Aguado, Daniel Priego-Espinoza, Jesús Espinal, Alberto Darszon y Gustavo Martínez-Mekler. “Rasgos de Criticalidad y Complejidad en la Fecundación.” En: *INTERdisciplina* (2019). ISSN: 2395-969X.
- [2] Jesús Espinal y col. “Discrete Dynamics Model for the Sperm-Activated Ca^{2+} Signaling Network Relevant to Sperm Motility”. En: *PLoS One* 6.8 (ago. de 2011). Ed. por Christopher V. Rao, e22619. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0022619.
- [3] Jesús Espinal-Enriquez, Alberto Darszon, Adán Guerrero y Gustavo Martínez-Mekler. “In silico determination of the effect of multi-target drugs on calcium dynamics signaling network underlying sea urchin spermatozoa motility.” En: *PloS one*. (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0104451.
- [4] Reinhard Seifert y col. “The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm”. En: *The EMBO journal* 34.3 (2015), págs. 379-392.
- [5] Jesús Espinal, Daniel Alejandro Priego-Espinoza, Alberto Darszon, Carmen Beltrán y Gustavo Martínez-Mekler. “Network model predicts that CatSper is the main Ca^{2+} channel in the regulation of sea urchin sperm motility.” En: *Scientific Reports*. (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-03857-9.
- [6] M C Chang. “Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes”. En: *Nature* 168.4277 (oct. de 1951), págs. 697-698. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/168697b0.
- [7] C R Austin. “The ‘Capacitation’ of the Mammalian Sperm”. En: *Nature* 170.4321 (ago. de 1952), págs. 326-326. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/170326a0.
- [8] Yutaka Yoda, Minesuke Yokoyama y Tosiro Hosi. “Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro I. in vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm”. En: *Japanese J. Anim. Reprod.* 16.4 (1971), págs. 147-151. ISSN: 0453-0551. DOI: 10.1262/jrd1955.16.147.
- [9] Alberto Darszon, Takuya Nishigaki, Carmen Beltran y Claudia L Treviño. “Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa”. En: *Physiol. Rev.* 91.4 (oct. de 2011), págs. 1305-1355. ISSN: 0031-9333. DOI: 10.1152/physrev.00028.2010.
- [10] Cynthia R. Ward y Bayard T. Storey. “Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay”. En: *Dev. Biol.* 104.2 (1984), págs. 287-296. ISSN: 00121606. DOI: 10.1016/0012-1606(84)90084-8.

- [11] Ryuzo Yanagimachi. "Mammalian Fertilization". En: *Physiol. Reprod.* Ed. por E. Knobil y J. D. Neill. 2.^a ed. New York, NY: Raven Press, 1994, págs. 189-317. ISBN: 9780781700863.
- [12] R. Yanagimachi. "The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation." En: *J. Reprod. Fertil.* 23.1 (oct. de 1970), págs. 193-6. ISSN: 0022-4251. DOI: 10.1530/jrf.0.0230193.
- [13] Gunther Wennemuth, Donner F Babcock y Bertil Hille. "Calcium clearance mechanisms of mouse sperm." En: *J. Gen. Physiol.* 122.1 (jul. de 2003), págs. 115-28. ISSN: 0022-1295. DOI: 10.1085/jgp.200308839.
- [14] Enrique O Hernández-González y col. "Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation." En: *J. Biol. Chem.* 282.33 (ago. de 2007), págs. 24397-406. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M701603200.
- [15] Ignacio A Demarco y col. "Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation." En: *J. Biol. Chem.* 278.9 (feb. de 2003), págs. 7001-9. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M206284200.
- [16] Jessica Escoffier, Dario Krapf, Felipe Navarrete, Alberto Darszon y Pablo E Visconti. "Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation". En: *J. Cell Sci.* 125.2 (ene. de 2012), págs. 473-485. ISSN: 0021-9533. DOI: 10.1242/jcs.093344.
- [17] P E Visconti y col. "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation." En: *Development* 121.4 (abr. de 1995), págs. 1129-37. ISSN: 0950-1991.
- [18] Pablo E Visconti y col. "Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway." En: *Development* 121.4 (abr. de 1995), págs. 1139-50. ISSN: 0950-1991.
- [19] William J. Blake y col. "Noise in eukaryotic gene expression". En: *Nature* 422.6932 (abr. de 2003), págs. 633-7. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature01546.
- [20] Alex Sigal y col. "Variability and memory of protein levels in human cells". En: *Nature* 444.7119 (nov. de 2006), págs. 643-646. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature05316.
- [21] Marc R. Birtwistle, Alexander Von Kriegsheim, Maciej Dobrzyński, Boris N. Kholodenko y Walter Kolch. "Mammalian protein expression noise: Scaling principles and the implications for knockdown experiments". En: *Mol. Biosyst.* 8.11 (2012), págs. 3068-3076. ISSN: 1742206X. DOI: 10.1039/c2mb25168j.
- [22] Jacob Beal. "Biochemical complexity drives log-normal variation in genetic expression". En: *Eng. Biol.* 1.1 (2017), págs. 55-60. DOI: 10.1049/enb.2017.0004.
- [23] Lis C. Puga Molina y col. "Molecular Basis of Human Sperm Capacitation". En: *Front. Cell Dev. Biol.* 6.July (2018), págs. 1-23. DOI: 10.3389/fcell.2018.00072.

- [24] S.A. Kauffman. “Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets”. En: *J. Theor. Biol.* 22.3 (mar. de 1969), págs. 437-467. ISSN: 00225193. DOI: 10.1016/0022-5193(69)90015-0.
- [25] Bryan C. Daniels y col. “Criticality Distinguishes the Ensemble of Biological Regulatory Networks”. En: *Phys. Rev. Lett.* 121.13 (2018), pág. 138102. ISSN: 10797114. DOI: 10.1103/PhysRevLett.121.138102.
- [26] Enrique Balleza y col. “Critical Dynamics in Genetic Regulatory Networks: Examples from Four Kingdoms”. En: *PLoS One* 3.6 (jun. de 2008). Ed. por Sui Huang, e2456. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0002456.
- [27] Jorge G. T. Zañudo, Maximino Aldana y Gustavo Martínez-Mekler. “Boolean Threshold Networks: Virtues and Limitations for Biological Modeling”. En: *Inf. Process. Biol. Syst.* Ed. por Niiranen S. y Ribeiro A. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011, págs. 113-151. ISBN: 978-3-642-19620-1. DOI: 10.1007/978-3-642-19621-8_6.
- [28] Claudine Chaouiya, Ouerdia Ourrad y Ricardo Lima. “Majority Rules with Random Tie-Breaking in Boolean Gene Regulatory Networks”. En: *PLoS One* 8.7 (jul. de 2013). Ed. por Jesus Gomez-Gardenes, e69626. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0069626.
- [29] W S McCulloch y W Pitts. “A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity: The bulletin of mathematical biophysics”. En: *Bull. Math. Biophys.* 5.4 (1943), págs. 115-133. ISSN: 0007-4985. DOI: 10.1007/BF02478259.
- [30] A Hodgkin y A Huxley. “A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.” En: *J. Physiol.* (1952), págs. 500-544. DOI: 10.1113/jphysiol.1952.sp004764.
- [31] Jingsheng Xia y Dejian Ren. “The BSA-induced Ca²⁺ influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent.” En: *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7 (ene. de 2009), pág. 119. ISSN: 1477-7827. DOI: 10.1186/1477-7827-7-119.
- [32] Gerardo Orta y col. “CatSper channels are regulated by protein kinase A”. En: *J. Biol. Chem.* 293.43 (2018), págs. 16830-16841. ISSN: 1083351X. DOI: 10.1074/jbc.RA117.001566.
- [33] Guillermina M. Luque y col. “Only a subpopulation of mouse sperm displays a rapid increase in intracellular calcium during capacitation”. En: *J. Cell. Physiol.* 233.12 (2018), págs. 9685-9700. ISSN: 10974652. DOI: 10.1002/jcp.26883.
- [34] Y Zeng, J a Oberdorf y H M Florman. “pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO₃(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation.” En: *Dev. Biol.* 173.2 (feb. de 1996), págs. 510-20. ISSN: 0012-1606.
- [35] Yang Zeng, Edward N. Clark y Harvey M. Florman. *Sperm Membrane Potential: Hyperpolarization during Capacitation Regulates Zona Pellucida-Dependent Acrosomal Secretion.* 1995. DOI: 10.1006/dbio.1995.1304.

- [36] J. Escoffier y col. “Flow Cytometry Analysis Reveals That Only a Subpopulation of Mouse Sperm Undergoes Hyperpolarization During Capacitation”. En: *Biol. Reprod.* 92.April (2015), págs. 1-11. ISSN: 0006-3363. DOI: 10.1095/biolreprod.114.127266.
- [37] Ana M Salicioni y col. “Signalling pathways involved in sperm capacitation.” En: *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65 (ene. de 2007), págs. 245-59.
- [38] Julio César Chávez y col. “SLO3 K⁺ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm.” En: *J. Biol. Chem.* 289.46 (nov. de 2014), págs. 32266-75. ISSN: 1083-351X. DOI: 10.1074/jbc.M114.607556.
- [39] Michael a Nolan y col. “Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility.” En: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101.37 (2004), págs. 13483-8. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0405580101.
- [40] W. M. Xu y col. “Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility”. En: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104.23 (2007), págs. 9816-9821. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0609253104.
- [41] Julio C Chávez y col. “Ion Permeabilities in Mouse Sperm Reveal an External Trigger for SLO3-Dependent Hyperpolarization”. En: *PLoS One* 8.4 (abr. de 2013). Ed. por Alexander J. Travis, e60578. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0060578.
- [42] Xu-hui Zeng, Chengtao Yang, Sung Tae Kim, Christopher J Lingle y Xiaoming Xia. “Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K⁺ current in mouse spermatozoa.” En: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108.14 (abr. de 2011), págs. 5879-84. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1100240108.
- [43] Enrique O Hernández-González y col. “Sodium and Epithelial Sodium Channels Participate in the Regulation of the Capacitation-associated Hyperpolarization in Mouse Sperm”. En: *J. Biol. Chem.* 281.9 (mar. de 2006), págs. 5623-5633. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M508172200.
- [44] Pablo Martínez-López y col. “Mouse sperm K⁺ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels.” En: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381.2 (abr. de 2009), págs. 204-9. ISSN: 1090-2104. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.02.008.
- [45] Cintia Stival y col. “Src Kinase Is the Connecting Player between Protein Kinase A (PKA) Activation and Hyperpolarization through SLO3 Potassium Channel Regulation in Mouse Sperm.” En: *J. Biol. Chem.* 290.30 (jul. de 2015), págs. 18855-64. ISSN: 1083-351X. DOI: 10.1074/jbc.M115.640326.
- [46] Lis C. Puga Molina y col. “Essential Role of CFTR in PKA-Dependent Phosphorylation, Alkalinization, and Hyperpolarization During Human Sperm Capacitation”. En: *J. Cell. Physiol.* October (2016). ISSN: 00219541. DOI: 10.1002/jcp.25634.
- [47] Nicola Bernabò, Mauro Mattioli y Barbara Barboni. “The spermatozoa caught in the net: the biological networks to study the male gametes post-ejaculatory life.” En: *BMC Syst. Biol.* 4 (ene. de 2010), pág. 87. ISSN: 1752-0509. DOI: 10.1186/1752-0509-4-87.

- [48] Nicola Bernabo. “Computational Modeling of Spermatozoa Signal Transduction Pathways: Just a Computer Game or a Reliable Tool in Studying Male Gametes Function?” En: *J. Comput. Sci. Syst. Biol.* 06.04 (2013), págs. 194-205. ISSN: 09747230. DOI: 10.4172/jcsb.1000117.
- [49] Nicola Bernabò, Luana Greco, Alessandra Ordinelli, Mauro Mattioli y Barbara Barboni. “Capacitation-Related Lipid Remodeling of Mammalian Spermatozoa Membrane Determines the Final Fate of Male Gametes: A Computational Biology Study”. En: *Omi. A J. Integr. Biol.* 19.11 (2015), págs. 712-721. ISSN: 1536-2310. DOI: 10.1089/omi.2015.0114.
- [50] Thomas Schreiber. “Measuring information transfer”. En: *Phys. Rev. Lett.* 85.2 (2000), págs. 461-464. ISSN: 00319007. DOI: 10.1103/PhysRevLett.85.461.
- [51] Bryan C Daniels y col. “Criticality distinguishes the ensemble of biological regulatory networks”. En: *Physical review letters* 121.13 (2018), pág. 138102.
- [52] Christian Torres-Sosa, Sui Huang y Maximino Aldana. “Criticality is an emergent property of genetic networks that exhibit evolvability”. En: *PLoS computational biology* 8.9 (2012), e1002669.
- [53] Yuriy Kirichok, Betsy Navarro y David E Clapham. “Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel”. En: *Nature* 439.7077 (feb. de 2006), págs. 737-740. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature04417.
- [54] Chengtao Yang, X.-H. Zeng, Yu Zhou, X.-M. Xia y Christopher J Lingle. “LRRC52 (leucine-rich-repeat-containing protein 52), a testis-specific auxiliary subunit of the alkalization-activated Slo3 channel”. En: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108.48 (nov. de 2011), págs. 19419-19424. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1111104108.
- [55] Betsy Navarro, Yuriy Kirichok y David E Clapham. “KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential”. En: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104.18 (mayo de 2007), págs. 7688-7692. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0702018104.
- [56] M Schreiber y col. “Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes.” En: *J. Biol. Chem.* 273.6 (feb. de 1998), págs. 3509-16. ISSN: 0021-9258.

Capítulo 7

Material suplementario

7.1. Tablas de las funciones regulatorias

Las tablas correspondientes a las funciones regulatorias de los nodos son proporcionadas como un archivo comprimido .tar en el material suplementario de arXiv:submit/2906789 [q-bio.CB] 29 Oct 2019. Si para algún regulador mencionado arriba en el apéndice no aparece en su respectiva tabla, es debido a que su participación no cambia significativamente los resultados de las ecuaciones.

7.2. Figuras suplementarias

7.2.1. Series de tiempo usadas en la validación del modelo

En la Sec. 3.1, las entradas de la Tab. 3.1 y la Tab. 3.2 resumen las tendencias cualitativas observadas en las series de tiempo mostradas en las Figs. 7.1 a la 7.7.

7.2.2. Ejemplos de series de tiempo de espermatozoides individuales capacitados y no capacitados

La Fig. 7.8 muestra las variables selectas y el nodo integrador para espermatozoides capacitados y no capacitados.

7.2.3. Series de tiempo promediadas sobre subpoblaciones de espermatozoides capacitados y no capacitados

La Fig. 7.9 muestra las variables selectas promediadas de subpoblaciones de espermatozoides capacitados y no capacitados provenientes de una población inicial total.

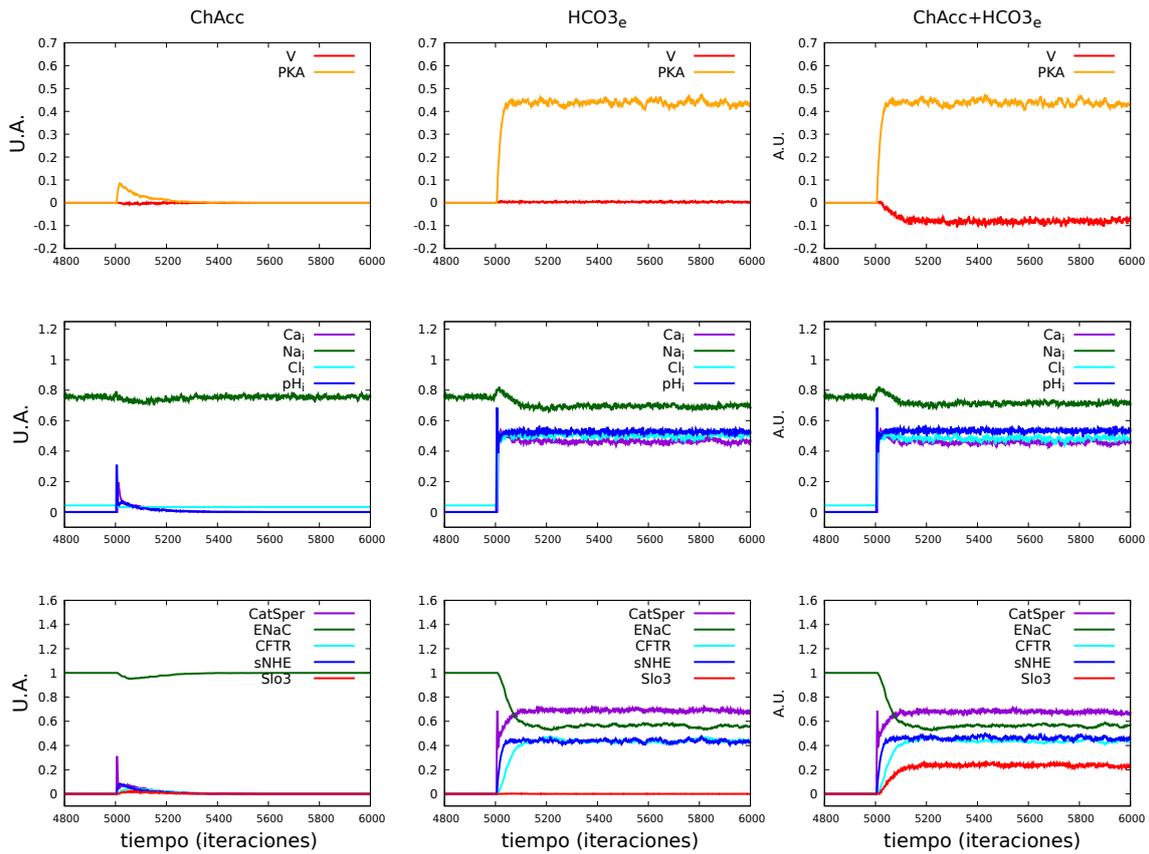


Figura 7.1: Series de tiempo promediadas de las variables de interés en una población silvestre. Se muestran las simulaciones de tres tipos diferentes de estímulos, los cuales comienzan a tiempo $t=5 \times 10^3$: sólo ChAcc (primera columna), sólo bicarbonato (segunda columna), los dos estímulos simultáneamente (tercera columna). Las tendencias cualitativas de cada variable fueron usadas para calibrar el modelo y se resumen en la Sec. 3.1. El tamaño de la población fue de 2×10^3 espermatozoides sin variabilidad en sus transportadores iónicos.

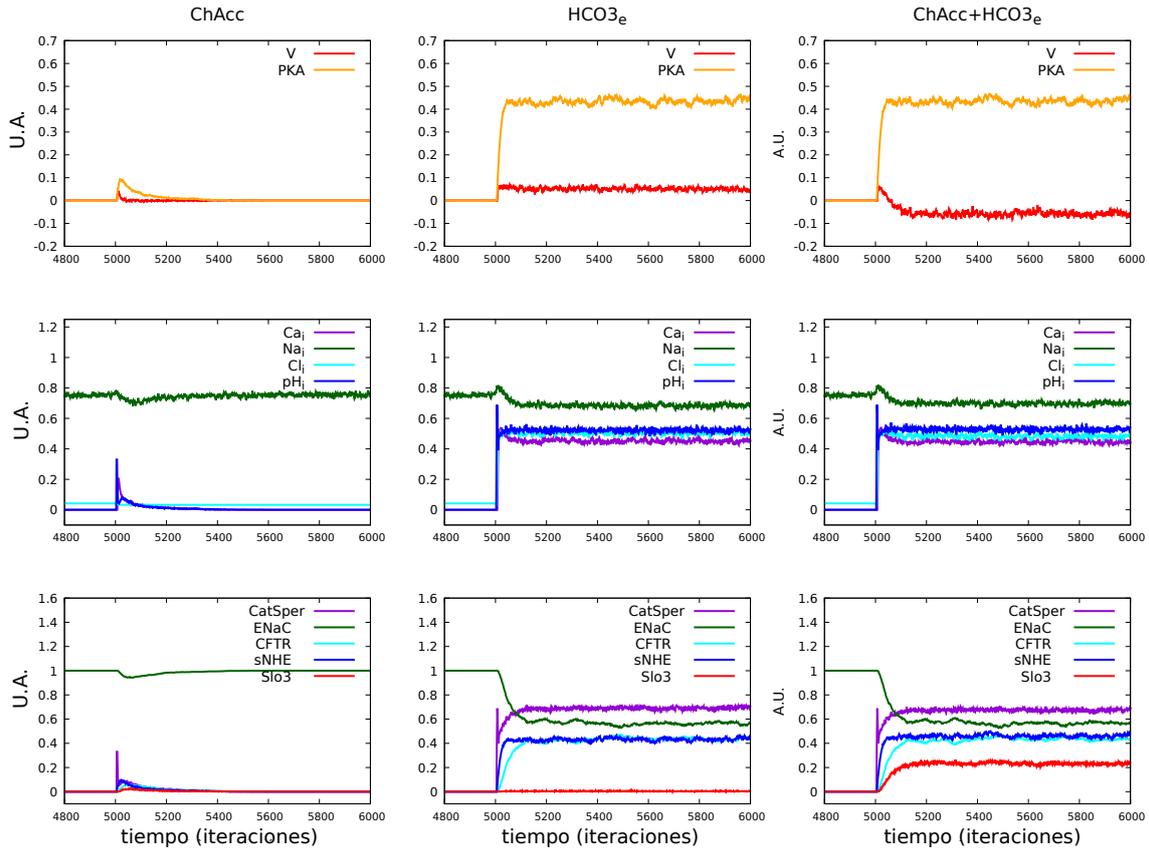


Figura 7.2: Series de tiempo promediadas de las variables de interes en una poblaci3n silvestre. Se muestran simulaciones de tres tipos de est3mulos, el cual comienza a tiempo $t=5 \times 10^3$: s3lo ChAcc (primera columna), s3lo bicarbonato (segunda columna), o los dos est3mulos simult3neamente (tercera columna). Las tendencias cualitativas de cada variable fueron usadas para calibrar el modelo y se resumen en la Sec. 3.1. El tama1o de la poblaci3n fue de 2×10^3 espermatozoides, los pesos de los transportadores i3nicos fueron muestreados de una distribuci3n Gaussiana con desviaci3n est3ndar $D = 0,25$.

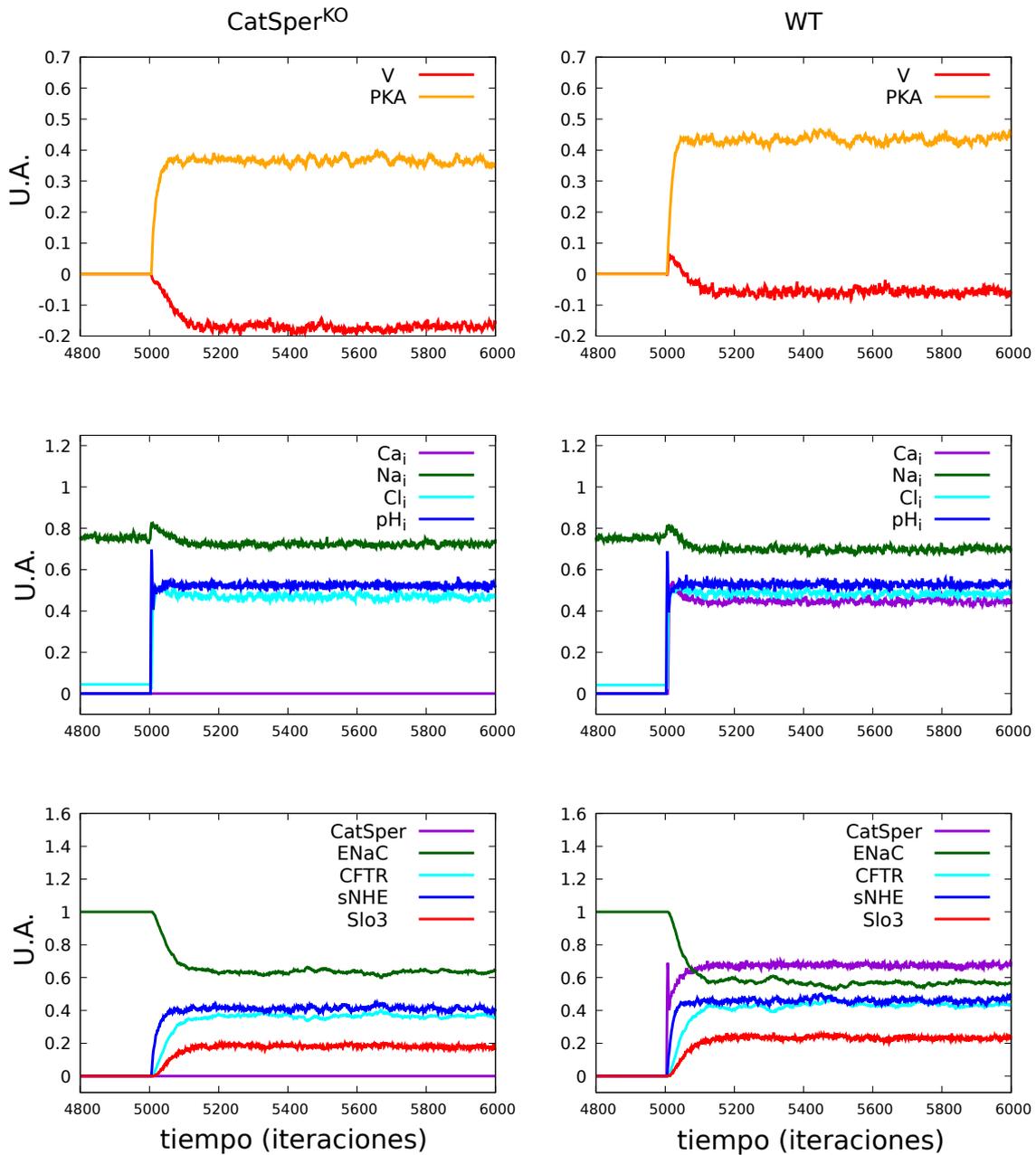


Figura 7.3: Variables de interes en caso de *CatSper* KO (ChAcc y bicarbonato agregado al medio extracelular) usadas en la Sec. 3.1 a fin de calibrar el modelo. El potencial de membrana V se hiperpolariza, el calcio intracelular Ca_i va a niveles basales, el sodio intracelular Na_i disminuye, el cloro intracelular Cl_i , el bicarbonato intracelular HCO_3_i y el pH_i intracelular se incrementan. La actividad de PKA se incrementa. Población de 2×10^3 espermatozoides, los pesos de los transportadores ionicos fueron muestreados de una distribución Gaussiana con desviación estándar $D = 0,25$.

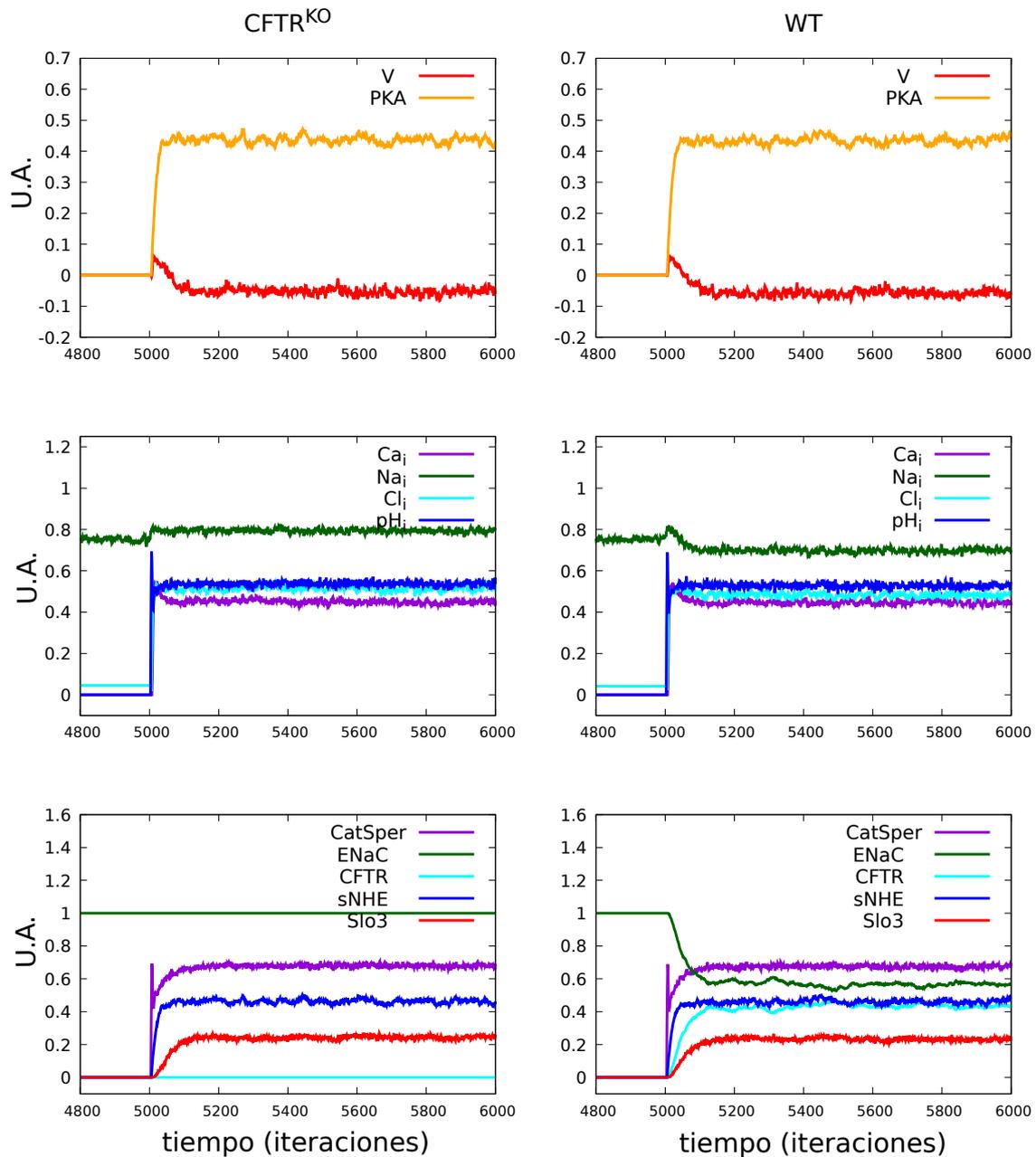


Figura 7.4: Variables de interés en el caso de CFTR KO (ChAcc y bicarbonato agregado al medio extracelular) usadas en la Sec. 3.1 a fin de calibrar el modelo. Potencial de membrana V hiperpolarizado, el sodio intracelular Na_i va hacia niveles basales, el calcio intracelular Ca_i , el cloro intracelular Cl_i , el bicarbonato intracelular HCO_3_i y el pH_i intracelular se incrementan. La actividad de PKA se incrementa. Población de 2×10^3 espermatozoides, los pesos de los transportadores iónicos fueron muestreados de una distribución Gaussiana con desviación estándar $D = 0,25$.

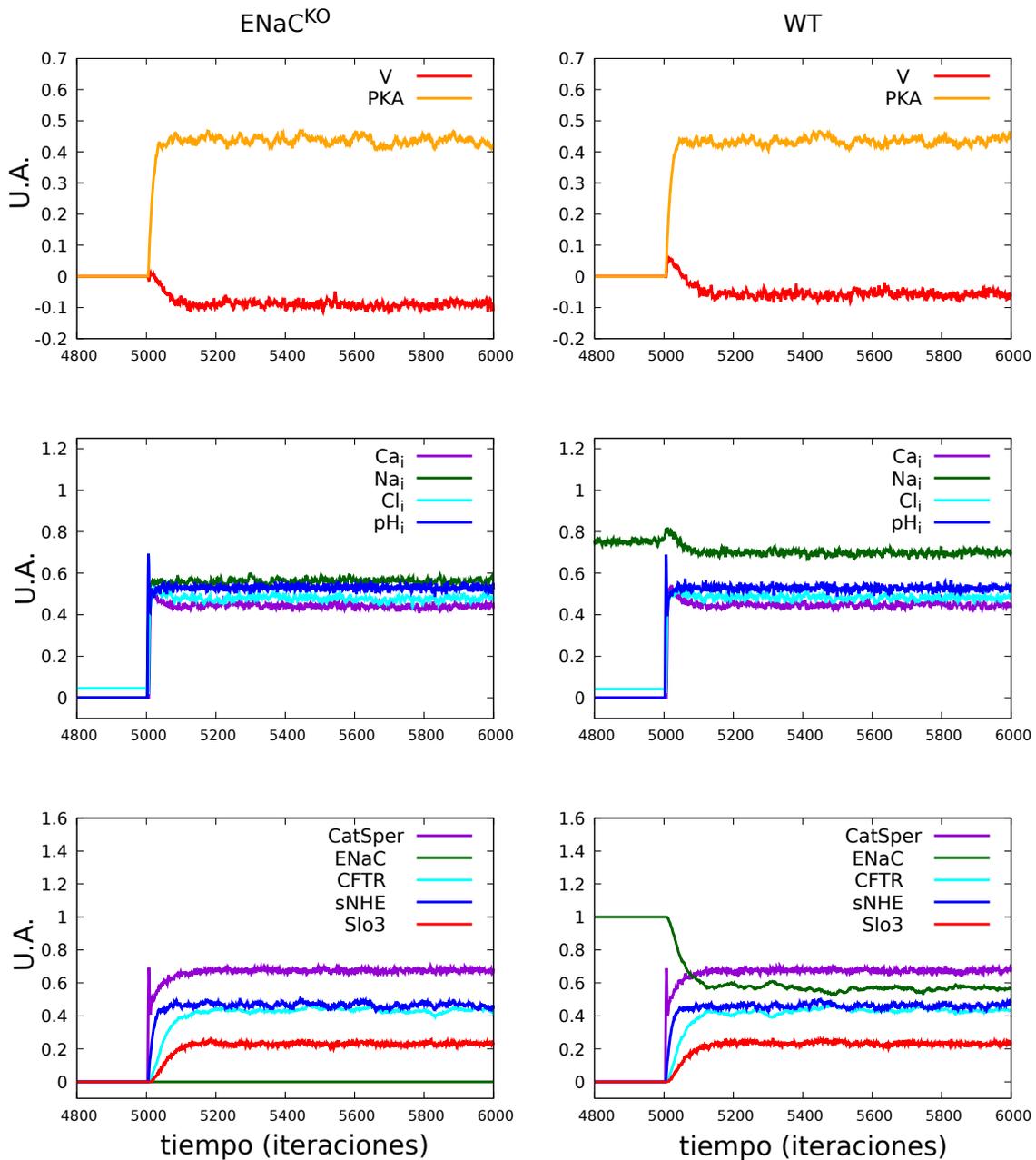


Figura 7.5: Variables de interes en el caso ENaC KO (ChAcc y bicarbonato agregados al medio extracelular) usadas en la Sec. 3.1 a fin de calibrar el modelo. Potencial de membrana V hiperpolarizado, el sodio intracelular Na_i disminuye, el calcio intracelular Ca_i , el cloro intracelular Cl_i , el bicarbonato intracelular HCO_3^- y el pH_i intracelular aumentan. La actividad de PKA se incrementa. Población de 2×10^3 espermatozoides, los pesos de los transportadores iónicos fueron muestreados de una distribución Gaussiana con desviación estándar $D = 0,25$.

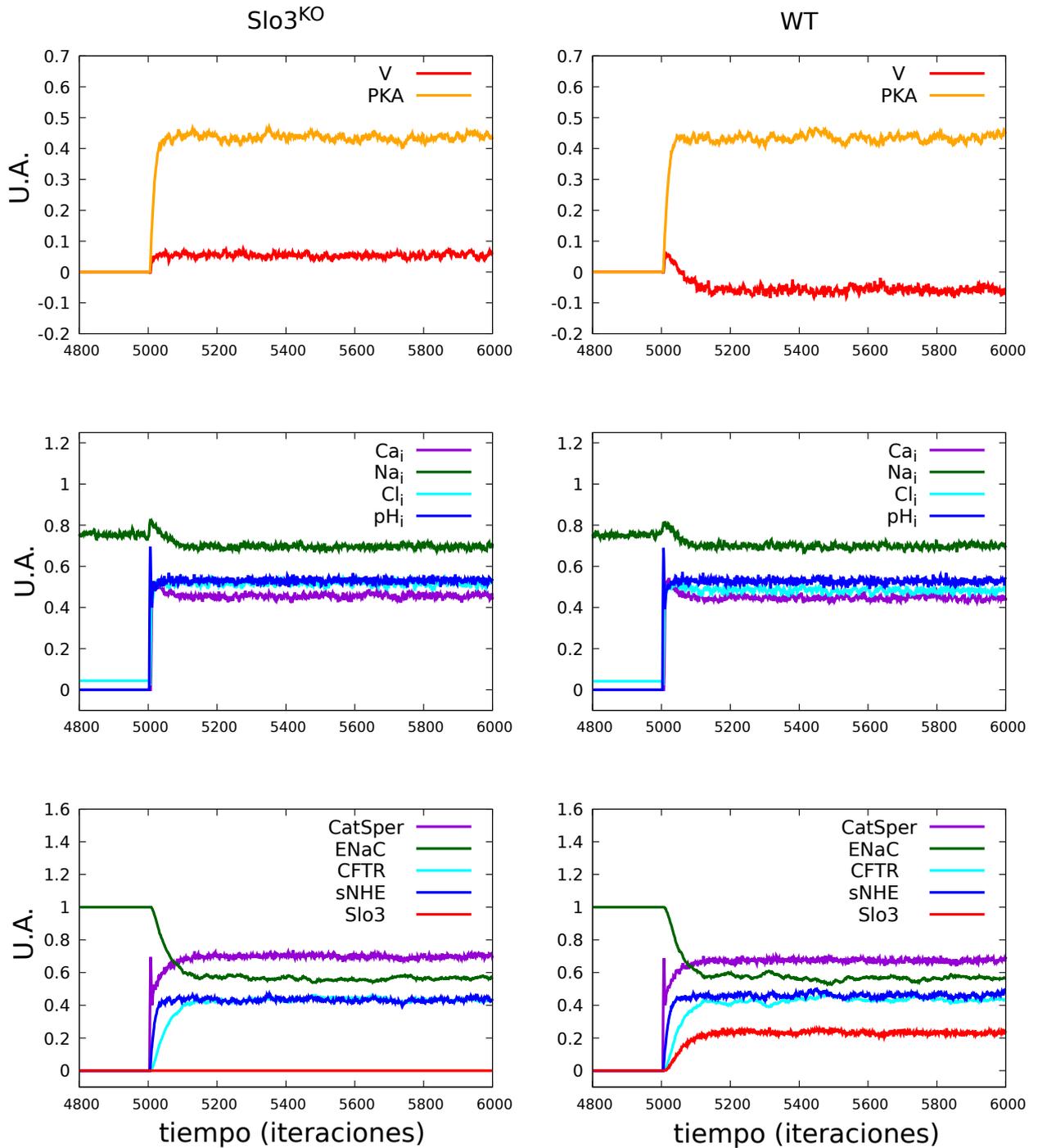


Figura 7.6: Variables de interés en el caso Slo3 KO (ChAcc y bicarbonato agregado al medio extracelular) usadas en la Sec. 3.1 a fin de calibrar el modelo. Potencial de membrana V depolarizado, el sodio intracelular Na_i disminuye, el calcio intracelular Ca_i , el cloro intracelular Cl_i , el bicarbonato intracelular HCO_3^- y el pH_i intracelular se incrementan. La actividad de PKA aumenta. Población de 2×10^3 espermatozoides, los pesos de los transportadores iónicos fueron muestreados de una distribución Gaussiana con desviación estándar $D = 0,25$.

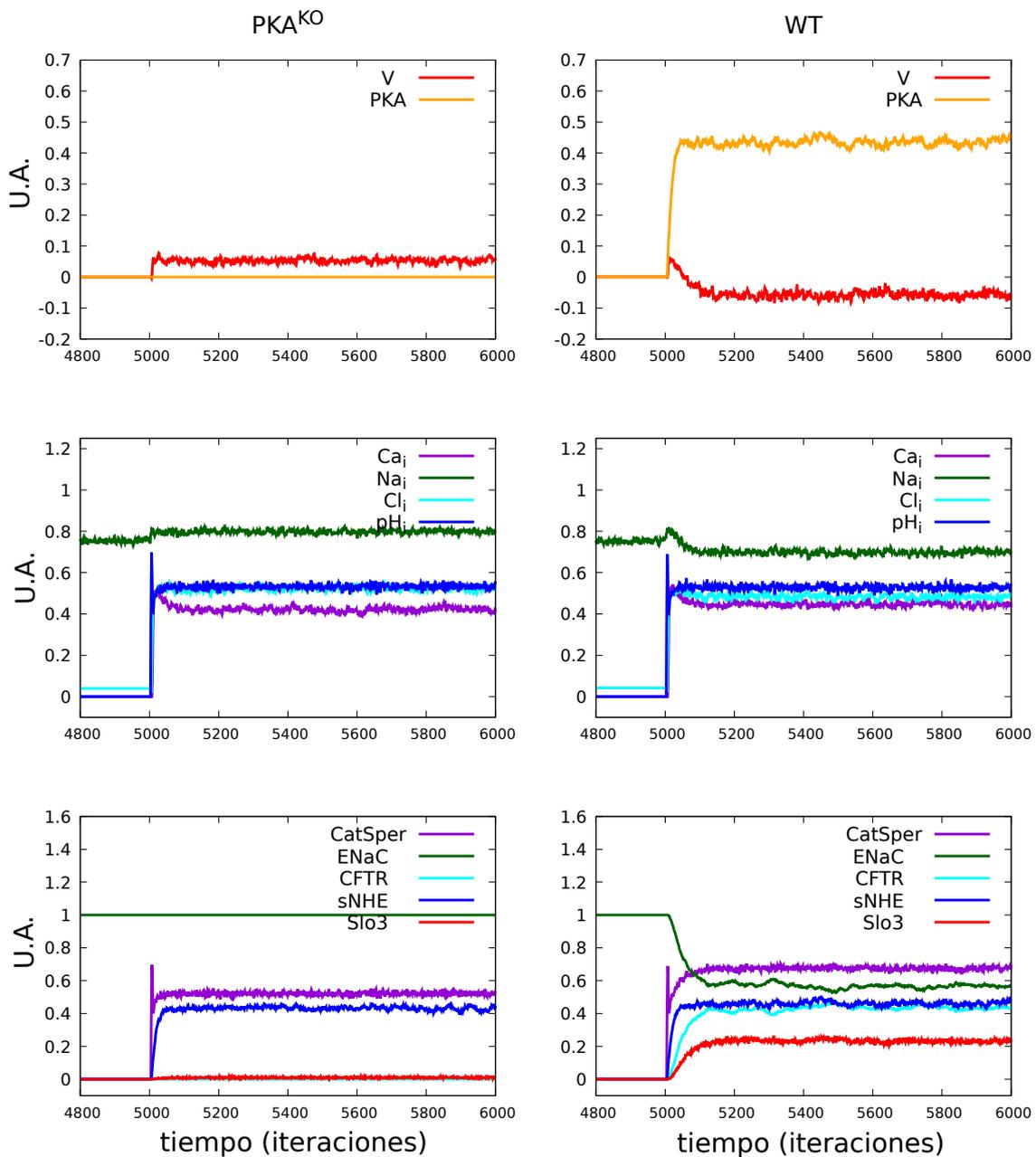


Figura 7.7: Variables de interes en caso de PKA KO (ChAcc y bicarbonato agregados al medio extracelular) usados en la Sec. 3.1 a fin de calibrar el modelo. Potencial de membrana V depolarizado, el calcio intracelular Ca_i , el sodio intracelular Na_i , el cloro intracelular Cl_i , el bicarbonato intracelular HCO_3_i y el pH_i intracelular aumentan. La actividad de PKA se mantiene en reposo. Población de 2×10^3 espermatozoides, los pesos de los transportadores iónicos fueron muestreados de una distribución Gaussiana con desviación estándar $D = 0,25$.

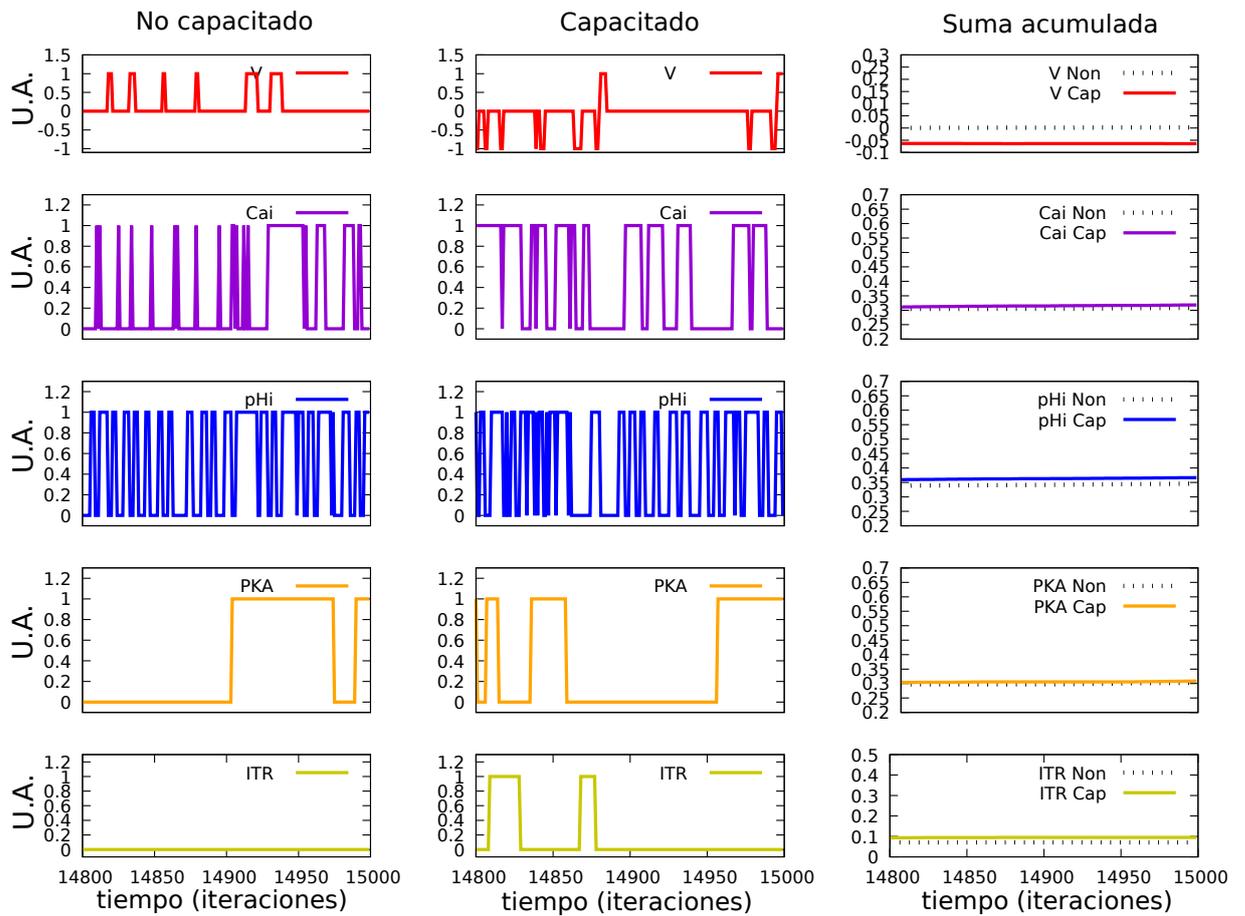


Figura 7.8: Ejemplo de las últimas 200 iteraciones de actividad de las variables selectas y nodo integrador proveniente de espermatozoides capacitados y no capacitados. Primera columna, variables selectas y nodo integrador de espermatozoides no capacitados. Segunda columna, variables selectas y nodo integrador de espermatozoides capacitados. Tercera columna, suma acumulada donde la línea continua corresponde a la variable selecta de los espermatozoides capacitados y la línea punteada corresponde a la variable selecta de los espermatozoides no capacitados. Las simulaciones fueron realizadas con variabilidad $D = 0,25$, ventana $W = 70$, umbral de integración $\theta = 0,15$, y umbral de actividad $\theta_c = 0,225$, durante 15×10^3 iteraciones.

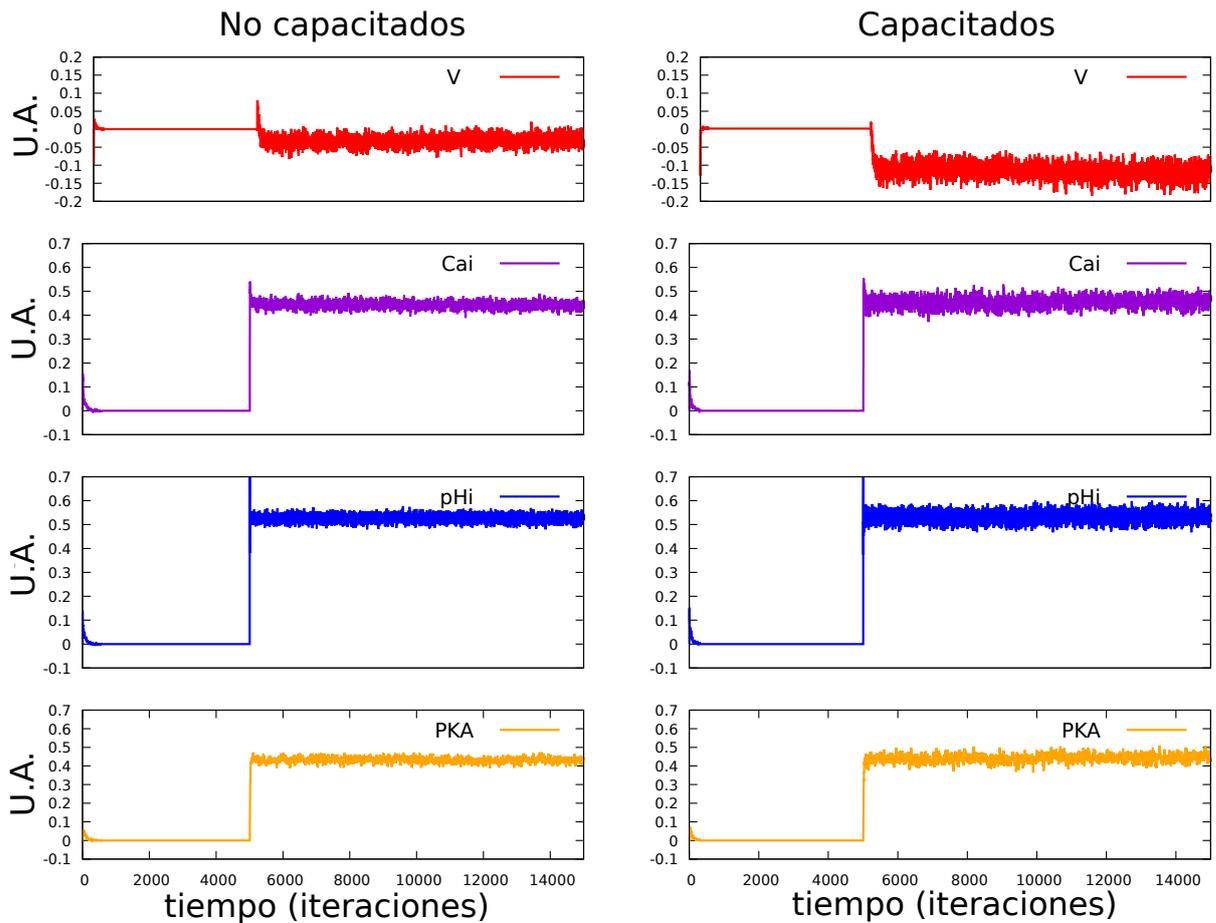


Figura 7.9: Ejemplo de variables selectas promediadas sobre subpoblaciones de espermatozoides no capacitados y capacitados. La primera columna, variables selectas de espermatozoides no capacitados de una población estimulada inicial dada. Segunda columna, variables selectas de espermatozoides capacitados de la misma distribución inicial dada. Las simulaciones fueron realizadas con variabilidad $D = 0,25$, ventana $W = 70$, umbral de integración $\theta = 0,15$, umbral de actividad $\theta_c = 0,225$ durante 15×10^3 iteraciones.