Biologia de la reproducció
Vol. 17, p. 71-77 (2022)

LES AQUAPORINES SÓN ESSENCIALS PEL MANTENIMENT DE L'ORGANITZACIÓ DE LA MEMBRANA LIPÍDICA I DE LA MOTILITAT ESPERMÀTIQUES DURANT LA CAPACITACIÓ

Ariadna Delgado-Bermúdez[1,2], Jordi Ribas-Maynou[1,2], Elisabeth Pinart[1,2], Sergi Bonet[1,2], Marc Yeste[1,2,3,*]

[1]Grup de recerca en Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana (TechnoSperm), Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA), Universitat de Girona. Carrer Maria Aurèlia Capmany, 61. Campus Montilivi, 17003 Girona.
[2]Unitat de Biologia Cel·lular, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona. Carrer Maria Aurèlia Capmany, 69. Campus Montilivi, 17003 Girona.
[3]Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Passeig de Lluís Companys, 23. 08010 Barcelona.
*Autor corresponent: marc.yeste@udg.edu

Resum

Les aquaporines (AQPs) són una família de canals transmembrana que permeten el transport d'aigua i de petits soluts a través de les membranes cel·lulars. La seva funció als espermatozoides està relacionada amb l'adaptació als canvis d'osmolaritat i la motilitat espermàtica. La capacitació és un procés que permet als espermatozoides adquirir la capacitat de fecundar, i es desencadena gràcies a la interacció amb el tracte reproductor femení. L'objectiu d'aquest estudi és determinar el paper de les diferents AQPs durant la capacitació espermàtica in vitro utilitzant diferents inhibidors. El sulfat de coure (CuSO4), un inhibidor específic de l'AQP3, només va causar un augment dels nivells intracel·lulars d'espècies reactives d'oxigen (ROS), fet que suggereix que aquesta proteïna no és essencial per la capacitació. El clorur de mercuri ($HgCl_2$), un inhibidor inespecífic de totes les AQPs excepte l'AQP7, va produir un increment del desordre lipídic de membrana i una disminució de la motilitat espermàtica. Finalment, la sulfadiazina de plata (AgSDZ), un inhibidor inespecífic de totes les AQPs, va provocar els mateixos efectes que el $HgCl_2$, a més d'una alteració dels nivells de fosforilació de tirosines. Aquests resultats evidencien la importància de totes les AQPs en el manteniment de la motilitat i en l'organització dels lípids de membrana durant la capacitació. Caldran futures investigacions per esbrinar els mecanismes d'interacció de les AQPs amb les vies de senyalització intracel·lulars que regulen la motilitat i la capacitació espermàtiques.

Abstract

Aquaporins (AQPs) are a family transmembrane channels that allow the transport of water and small solutes across cell membranes. Their main roles in sperm are related to osmoadaptation and sperm motility. Capacitation, which is a process that sperm must undergo to achieve fertilizing ability, is triggered through the interaction with the female environment. This study aimed to elucidate the potential role of different AQPs during in vitro sperm capacitation using different inhibitors. Cooper sulfate ($CuSO_4$), a specific inhibitor of AQP3, only caused an increase in intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), which suggested that this protein is not crucial for sperm capacitation. Mercury chloride ($HgCl_2$), an unspecific inhibitor of all AQPs except for AQP7, produced an increase in membrane lipid disorder and led to a decrease in sperm motility. Finally, silver sulfadiazine (AgSDZ), an unspecific inhibitor of all AQPs, generated the same effects than $HgCl_2$, but also altered tyrosine phosphorylation levels. These findings evidence the importance of all AQPs in the maintenance of motility and lipid membrane organisation during capacitation. Further research aimed to unveil how AQPs modulate the intracellular signaling pathways regulating sperm capacitation and acrosome reaction is warranted.

INTRODUCCIÓ

Les aquaporines (AQPs) són proteïnes canal que permeten el transport d'aigua i de petits soluts a través de les membranes cel·lulars, que són de naturalesa amfipàtica (revisat per Yeste *et al.*, 2017). En els mamífers, aquesta família inclou 13 membres que es classifiquen en funció de la seva homologia i permeabilitat: les AQPs ortodoxes només són permeables a l'aigua; les aquagliceroporines (GLPs) també són permeables al glicerol i a petites molècules; i les superAQPs presenten variacions estructurals respecte els altres grups i són permeables a l'aigua i al glicerol. A més, algunes AQPs també són permeables al H_2O_2 (revisat per Ribeiro *et al.*, 2021).

En els espermatozoides de porcí s'han identificat l'AQP3, l'AQP7, l'AQP11 (Prieto-Martínez *et al.*, 2014, 2015) i l'AQP9 (Vicente-Carrillo *et al.*, 2016). La seva funció principal és l'adaptació als canvis d'osmolaritat per evitar canvis sobtats de volum. Per això, les AQPs són especialment rellevants quan els espermatozoides entren en contacte amb el tracte femení, que és hipoosmòtic (Chen and Duan, 2011). La capacitat d'osmoadaptació dels espermatozoides, doncs, condiciona l'èxit dels esdeveniments post-ejaculació, com l'activació de la motilitat espermàtica (revisat per Yeste *et al.*, 2017). El mecanisme de regulació del volum de les cèl·lules a través de les AQPs es basa en la interacció amb canals iònics. Quan es produeix un augment de volum per l'entrada d'aigua en presència d'un medi hipotònic, els canals iònics mecanosensors s'obren, i el corrent iònic de sortida provoca una força motriu que permet també la sortida d'aigua (Hill and Shachar-Hill, 2015).

La capacitació és el procés pel qual els espermatozoides adquireixen la capacitat fecundant després de l'ejaculació. Les concentracions creixents de bicarbonat i calci al llarg del tracte femení permeten l'activació de la via de la proteïna quinasa A (PKA), que incrementa els nivells de fosforilació de tirosines. Com a resultat del flux de ions, la membrana s'hiperpolaritza i n'augmenta la fluïdesa, i també s'hiperactiva la motilitat. Finalment, la reacció acrosòmica es desencadena per un augment de la concentració de progesterona (revisat per Puga Molina *et al.*, 2018). Tenint en compte l'estricta relació entre els corrents iònics i el flux d'aigua a través de les AQPs, així com la importància del flux de ions durant la capacitació, és possible que les AQPs tinguin un paper rellevant durant aquest procés.

Els metalls de transició s'han utilitzat com a inhibidors d'AQPs per l'estudi de la seva funció en diferents tipus cel·lulars (Haddoub *et al.*, 2009). El sulfat de coure ($CuSO_4$) és un inhibidor de l'AQP3 que s'uneix de manera específica a tres residus extracel·lulars d'aquesta proteïna. El clorur de mercuri ($HgCl_2$) és un inhibidor inespecífic que modifica covalentment un residu de cisteïna present al porus de la majoria de les AQPs (Hirano *et al.*, 2010) excepte a l'AQP7; per tant, aquesta AQP és resistent al mercuri (Ishibashi *et al.*, 1997). Finalment, la sulfadiazina de plata (AgSDZ) és un inhibidor inespecífic de totes les AQPs, que probablement bloqueja el canal, ja que la mida del ió de plata (2.5 Å) és pràcticament igual a la del porus (2.8 Å) (Niemietz i Tyerman, 2002).

L'objectiu d'aquest estudi és esbrinar el paper de les diferents AQPs durant la capacitació espermàtica utilitzant el porcí com a model, a través de la seva inhibició amb sals de metalls de transició.

MATERIAL I MÈTODES

Mostres biològiques. En aquest estudi es van utilitzar un total de 32 mostres de verros Piétrain. Les fraccions espermàtiques de les ejaculacions es van diluir en un diluent comercial (Vitasem LD; Magapor SL, Saragossa, Espanya), i es van emmagatzemar a 17°C. Les mostres es van combinar entre elles en grups de quatre, es van repartir en quatre alíquotes diferents, i es van centrifugar. Després de descartar el medi, els espermatozoides es van resuspendre en medi de capacitació (Recuero *et al.,* 2021), els diferents inhibidors es van afegir en funció del tractament i les mostres es van incubar a 38°C i 5% CO_2. Per tal d'induir la reacció acrosòmica, es va afegir progesterona (0,01 mg/mL) després de 4 h d'incubació, i les mostres es van incubar durant una hora més.

Inhibidors d'aquaporines. En aquest estudi es van utilitzar tres inhibidors d'AQPs diferents: sulfat de coure ($CuSO_4$; Sigma Aldrich; Saint Louis, MO, EUA), clorur de mercuri ($HgCl_2$; Sigma Aldrich) i sulfadiazina de plata (AgSDZ; Sigma Aldrich). Les concentracions finals dels diferents inhibidors es van determinar a partir d'experiments preliminars basats en estudis previs (Niemietz i Tyerman, 2002; Yeung *et al.*, 2009; Reca *et al.*, 2018): $CuSO_4$ a 100 mM; $HgCl_2$ a 20 mM; i AgSDZ a 5 mM.

Avaluació de la qualitat i funció espermàtiques. En diferents temps d'incubació (0, 120, 240, 250, 300 min) es van dur a terme anàlisis de motilitat, citometria de flux i Western Blot.

Motilitat espermàtica. La motilitat es va analitzar utilitzant un sistema computeritzat d'anàlisi espermàtica (CASA) i el programari ISAS (Integrated Sperm Analysis System; Proiser SL, València, Espanya). Els espermatozoides es van considerar mòbils (TMOT, %) si presentaven una velocitat de la trajectòria mitjana (VAP, µm/s) superior a 10 µm/s, i mòbils progressius (PMOT, %) si l'índex de rectitud (STR, %) era superior al 45%. Per cada mostra, es van avaluar un mínim de 1.000 espermatozoides.

Citometria de flux. Les mostres es van marcar amb les combinacions de fluorocroms adients per a cada paràmetre i es van incubar a 38°C a la foscor. El citòmetre Cell Lab Quanta™ SC (Beckman Coulter; Fullerton; CA, EUA) es va utilitzar per l'anàlisi de la viabilitat espermàtica (SYBR/iodur de propidi, IP), la integritat de la membrana acrosòmica (PNA/IP), el desordre lipídic de membrana (merocianina-540, M540), els nivells intracel·lulars d'espècies reactives d'oxigen (ROS) (H_2DCFDA/IP) i de calci (Fluo-3AM/Yo-Pro-1) i el potencial de membrana mitocondrial (JC1), d'acord amb el protocol de Recuero *et al.* (2021). Es van analitzar tres rèpliques de 10.000 espermatozoides per cada tractament i temps.

Western Blot. Els nivells de fosforilació de tirosines es van evaluar mitjançant Western Blot d'acord amb el protocol de Recuero *et al.* (2021). L'anticòs primari utilitzat va ser *4G10® Anti-Phosphotyrosine Antibody [mouse monoclonal cocktail IgG2b*; Sigma Aldrich; 1:5,000; (v:v)], i el secundari, *Rabbit anti-mouse conjugated with HRP* [ref. P0260; Agilent, Santa Clara, CA, EUA; 1:10,000 (v:v)]. Es van analitzar dues rèpliques per mostra. Es van quantificar els patrons de bandes amb el programari Image Studio™ Lite (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, Alemanya), i les intensitats es van normalitzar utilitzant els valors de proteïna total.

Anàlisi de les dades. Els resultats es van analitzar a través del programari IBM SPSS Statistics 25.0 (Armonk, NY, EUA). La distribució de les dades i l'homoscedasticitat es van determinar a través dels tests Shapiro–Wilk i Levene, respectivament. Cada paràmetre es va analitzar amb un model lineal mixt. El punt temporal (0, 120, 240, 250, o 300 min) va ser el factor intra-subjecte, els tractaments (control, $CuSO_4$, $HgCl_2$ o AgSDZ) van ser el factor d'efectes fixes (inter-subjecte), i el grup de mostres (1–8) va ser el d'efectes aleatoris. Les comparacions dos a dos es van avaluar amb el test post-hoc Sidak, i el nivell de significació es va establir a $P \leq 0{,}05$.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Efecte de la inhibició de les AQPs amb $CuSO_4$ sobre la capacitació i la reacció acrosòmica

En presència de $CuSO_4$, un inhibidor específic de l'AQP3 (Zelenina *et al.*, 2004), les mostres van presentar nivells significativament elevats de ROS ($P<0{,}05$) durant tota la incubació (Figura 1D). L'AQP3 és una peroxiporina (Miller *et al.*, 2010) i, per tant, permet el pas de H_2O_2. És important destacar que les ROS tenen un paper clau en l'estimulació de la capacitació, però nivells massa elevats poden tenir un efecte inhibidor de la senyalització intracel·lular que hi està implicada (revisat per Aitken, 2017). L'absència d'efectes en la resta de paràmetres de qualitat i funcionalitat espermàtica avaluats (Figura 1A-C; Taula 1) indica que l'AQP3 té un paper marginal durant la capacitació espermàtica i la reacció acrosòmica i que, probablement, altres AQPs en poden compensar la funció.

Taula 1. Percentatges de motilitat total, d'espermatozoides vius i d'espermatozoides viables amb nivells elevats de calci; ràtio de fluorescència del JC1, que indica la proporció de mitocondris amb alt potencial de membrana mitocondrial (PMM); nivells de fosforilació de tirosines totals i de la banda de 175 kDa. Dades expressades com a: mitjana ± error estàndard. Les lletres (a,b) indiquen diferències significatives ($P \leq 0,05$) dins d'un punt temporal.

Temps (min)	Control	$CuSO_4$	$HgCl_2$	AgSDZ	Control	$CuSO_4$	$HgCl_2$	AgSDZ
	Motilitat total (%)				**Ràtio $JC1_{agg}/JC1_{mon}$ (alt PMM)**			
0	62.71±2.33	62.71±2.33	62.71±2.33	62.71±2.33	1,34±0,08	1,34±0,08	1,34±0,08	1,34±0,08
120	35.60±3.73[a]	40.13±3.76[a]	22.09±2.05[b]	19.29±2.52[b]	1,33±0,10	1,35±0,11	1,27±0,10	1,22±0,08
240	30.87±3.15	35.27±3.77	21.01±2.81	13.54±2.47	1,23±0,09	1,19±0,09	1,12±0,09	1,15±0,07
250	16.24±2.28	17.11±2.70	10.00±1.15	7.67±1.04	1,58±0,18	1,37±0,10	1,24±0,10	1,25±0,10
300	16.11±2.64	14.96±2.45	8.09±1.07	7.65±1.28	1,34±0,06	1,30±0,08	1,18±0,08	1,20±0,08
	Viabilitat (%)				**Nivells totals de fosforilació de tirosines**			
0	72,07±3,94	72,07±3,94	72,07±3,94	72,07±3,94	3,01±0,40	3,01±0,40	3,01±0,40	3,01±0,40
120	38,49±5,63[a]	53,35±4,84[b]	36,52±5,22[a]	40,90±4,75[a]	2,84±0,53	2,26±0,26	1,88±0,17	2,58±0,34
240	31,35±3,39	42,62±4,34	35,92±2,29	42,10±2,50	1,66±0,35	2,50±0,29	1,66±0,22	2,74±0,41
250	27,30±2,49	31,28±2,73	28,03±2,31	33,66±1,94	1,82±0,25	3,07±0,46	2,25±0,24	6,38±3,23
300	26,75±1,83	30,43±1,96	26,70±1,57	32,34±1,82	1,72±0,11	4,12±0,86	3,35±0,18	4,99±1,09
	Espermatozoides vius amb nivells elevats de calci (%)				**Nivells de fosforilació de tirosines - banda 175 kDa**			
0	12,49±2,11	12,49±2,11	12,49±2,11	12,49±2,11	0,29±0,11	0,29±0,11	0,29±0,11	0,29±0,11
120	29,23±7,55	18,32±2,75	37,50±7,47	32,92±6,61	0,17±0,04	0,15±0,01	0,12±0,00	0,16±0,03
240	34,71±7,72	21,19±5,31	36,56±9,26	22,22±5,35	0,10±0,03	0,14±0,02	0,09±0,02	0,17±0,04
250	26,56±5,56	16,47±2,56	26,25±5,20	18,95±4,69	0,11±0,03[a]	0,24±0,06[a,b]	0,17±0,03[a,b]	0,44±0,25[b]
300	28,02±6,28	19,27±3,25	29,15±6,04	21,35±4,67	0,10±0,01	0,28±0,07	0,23±0,02	0,30±0,07

Efecte de la inhibició de les AQPs amb $HgCl_2$ sobre la capacitació i la reacció acrosòmica

El $HgCl_2$ és un inhibidor de totes les AQPs excepte l'AQP7 (Ishibashi *et al.*, 1997; Hirano *et al.*, 2010). La PMOT de les mostres tractades amb $HgCl_2$ va ser significativament menor a la del control des dels 120 min d'incubació ($P<0,05$; Figura 1A). Tot i això, la TMOT només es va alterar significativament al cap de 120 min d'incubació ($P<0,05$; Taula 1). D'altra banda, el tractament amb $HgCl_2$ va causar un major desordre lipídic de membrana des dels 250 min d'incubació ($P<0,05$), tot i que des dels 120 min ja s'observava una clara tendència a l'alça (Figura 1B). A partir dels 240 min, les mostres tractades amb $HgCl_2$ també van presentar alteracions de la membrana acrosòmica ($P<0,05$; Figura 1C). Els nivells intracel·lulars de calci, el potencial de membrana mitocondrial, la viabilitat i els nivells de fosforilació de tirosines no van presentar diferències amb el grup control. Els efectes del $HgCl_2$ sobre la fisiologia espermàtica van ser similars als observats en altres espècies com el caprí (Kushawaha *et al.*, 2020, 2021). El bloqueig de les AQPs seria el responsable d'un increment de volum de l'espermatozoide, que pot causar alteracions en la integritat de les membranes espermàtiques (plasmàtica i acrosòmica) i del citoesquelet, que provocarien les alteracions de la motilitat espermàtica.

Efecte de la inhibició de les AQPs amb AgSDZ sobre la capacitació i la reacció acrosòmica

La AgSDZ és un inhibidor de totes les AQPs (Niemietz i Tyerman, 2002). Els efectes observats en presència de AgSDZ durant la capacitació van ser semblants als del $HgCl_2$, amb alteracions en la TMOT (Taula 1), la PMOT, i la integritat acrosòmica ($P<0,05$; Figura 1A,C). Sorprenentment, el desordre lipídic de membrana no va augmentar en les mostres tractades amb AgSDZ, tot i que es va

observar una tendència a l'alça (Figura 1B). Els nivells intracel·lulars de calci, el potencial de membrana mitocondrial i la viabilitat tampoc es van veure alterats en comparació amb el grup control, però sí que es van observar variacions dels nivells de fosforilació de tirosines en bandes concretes (com la de 175 kDa) al cap de 250 min d'incubació (P<0,05; Taula 1). La fosforilació de tirosines, que és un dels esdeveniments que es produeixen durant la capacitació, és clau per la hiperactivació de la motilitat espermàtica i per la preparació de l'espermatozoide per la reacció acrosòmica (revisat per Puga Molina *et al.*, 2018). És possible que aquest efecte, que no s'observa en presència del $HgCl_2$, indiqui que l'AQP7, que és insensible a la inhibició per mercuri, compensi parcialment la funció de la resta d'AQPs. Però en presència d'AgSDZ, totes les AQPs estan inhibides i no hi ha possibilitat de compensació funcional.

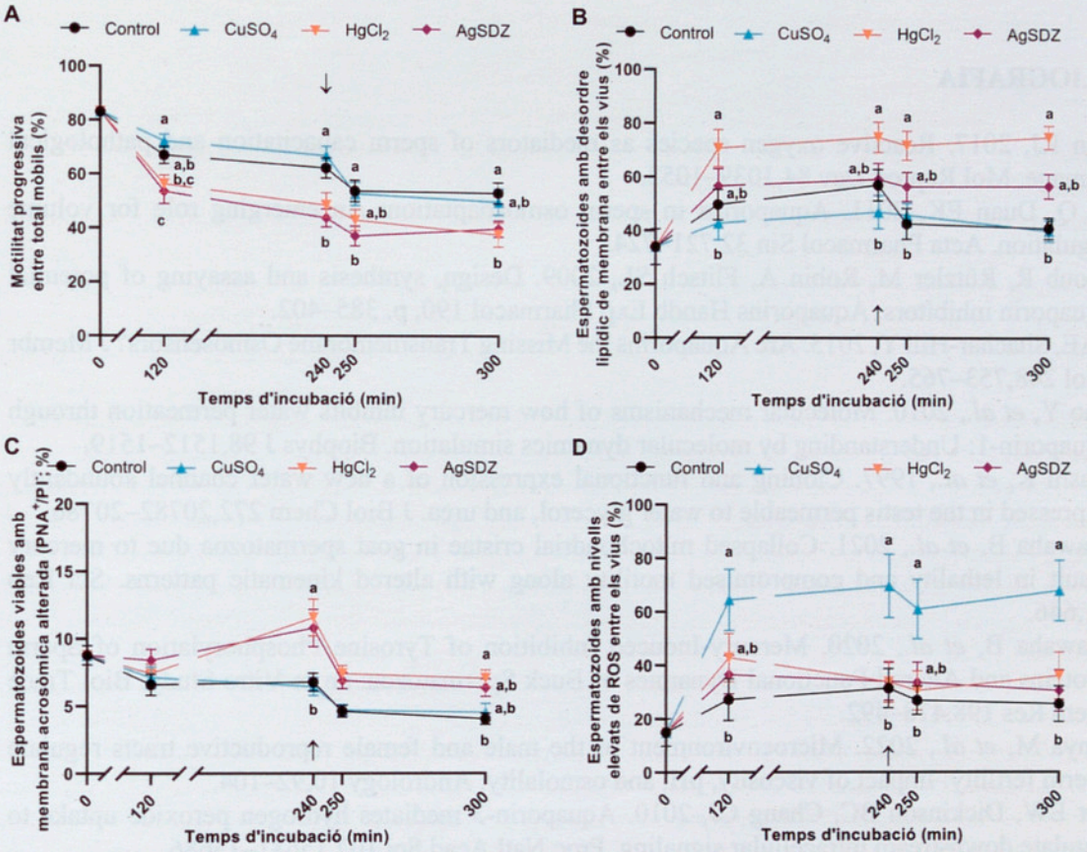

Figura 1. (A) Percentatges de motilitat progressiva dins de la població d'espermatozoides mòbils, **(B)** d'espermatozoides amb desordre lipídic de membrana dins de la població de vius, **(C)** d'espermatozoides viables amb alteració de la membrana acrosòmica i **(D)** d'espermatozoides amb nivells elevats de ROS entre els vius. Després de 240 min d'incubació, es va afegir progesterona (fletxa). Dades expressades com a: mitjana ± error estàndard. Les lletres (a-c) indiquen diferències significatives (P≤0,05) dins d'un punt temporal.

CONCLUSIÓ

La rellevància de les AQPs durant la capacitació espermàtica sembla estar relacionada amb la seva funció osmoreguladora. Tot i que l'AQP3 és clau per la regulació del flux de sortida de H_2O_2, la seva inhibició no sembla provocar una acumulació d'aquesta molècula amb efectes tòxics a nivell intracel·lular. D'altra banda, les AQPs en conjunt són importants pel manteniment de la organització lipídica de la membrana plasmàtica. A més, aquestes proteïnes semblen tenir un paper rellevant en les vies de senyalització intracel·lulars involucrades en la capacitació, i la seva inhibició durant

aquest esdeveniment té efectes que només són evidents després de l'addició de la progesterona per desencadenar la reacció acrosòmica.

AGRAÏMENTS

Aquest treball s'ha realitzat gràcies al suport del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España (AGL2017-88329-R; PRE2018-083488) i de la Generalitat de Catalunya (2017-SGR-1229).

BIBLIOGRAFIA

Aitken RJ, 2017. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. Mol Reprod Dev 84,1039–1052.

Chen Q, Duan EK, 2011. Aquaporins in sperm osmoadaptation: An emerging role for volume regulation. Acta Pharmacol Sin 32,721–724.

Haddoub R, Rützler M, Robin A, Flitsch SL, 2009. Design, synthesis and assaying of potential aquaporin inhibitors. Aquaporins Handb Exp Pharmacol 190, p. 385–402.

Hill AE, Shachar-Hill Y, 2015. Are Aquaporins the Missing Transmembrane Osmosensors? J Membr Biol 248,753–765.

Hirano Y, *et al.*, 2010. Molecular mechanisms of how mercury inhibits water permeation through aquaporin-1: Understanding by molecular dynamics simulation. Biophys J 98,1512–1519.

Ishibashi K, *et al.*, 1997. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water glycerol, and urea. J Biol Chem 272,20782–20786.

Kushawaha B, *et al.*, 2021. Collapsed mitochondrial cristae in goat spermatozoa due to mercury result in lethality and compromised motility along with altered kinematic patterns. Sci Rep 11,646.

Kushawaha B, *et al.*, 2020. Mercury-Induced Inhibition of Tyrosine Phosphorylation of Sperm Proteins and Altered Functional Dynamics of Buck Spermatozoa: an In Vitro Study. Biol Trace Elem Res 198,478–492.

Lavanya M, *et al.*, 2022. Microenvironment of the male and female reproductive tracts regulate sperm fertility: Impact of viscosity, pH, and osmolality. Andrology 10,92–104.

Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ, 2010. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. Proc Natl Acad Sci 107,15681–15686.

Niemietz CM, Tyerman SD, 2002. New potent inhibitors of aquaporins: Silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin. FEBS Lett 531,443–447.

Prieto-Martínez N, *et al.*, 2015. Aquaporins in boar spermatozoa. Part II: detection and localisation of aquaglyceroporin 3. Reprod Fertil Dev 29,703–711.

Prieto-Martínez N, *et al.*, 2014. Aquaporins 7 and 11 in boar spermatozoa: detection, localisation and relationship with sperm quality. Reprod Fertil Dev 28,663–672.

Puga Molina LC, *et al.*, 2018. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. Front Cell Dev Biol 6,72.

Reca A, Szpilbarg N, Damiano AE, 2018. The blocking of aquaporin-3 (AQP3) impairs extravillous trophoblast cell migration. Biochem Biophys Res Commun 499,227–232.

Recuero S, *et al.*, 2021. Parkinson Disease Protein 7 (PARK7) Is Related to the Ability of Mammalian Sperm to Undergo In Vitro Capacitation. Int J Mol Sci 22,10804.

Ribeiro JC, *et al.*, 2021. Aquaporins and (in)fertility: More than just water transport. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis 1867,166039.

Vicente-Carrillo A, *et al.*, 2016. Membrane Stress During Thawing Elicits Redistribution of Aquaporin 7 But Not of Aquaporin 9 in Boar Spermatozoa. Reprod Domest Anim 51,665–79.

Yeste M, *et al.*, 2017. Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: Functional implications

and cryobiology. Reprod Domest Anim 52,12–27.
Yeung CH, *et al.*, 2009. Aquaporin Isoforms Involved in Physiological Volume Regulation of Murine Spermatozoa. Biol Reprod 80,350–357.
Zelenina M, *et al.*, 2004. Copper inhibits the water and glycerol permeability of aquaporin-3. J Biol Chem 279,51939–51943.