



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad De Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Cambios en el potencial de membrana en
espermatozoides, aspectos moleculares y relevancia
fisiológica en la fecundación de mamíferos.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Paula Ania Balestrini

Director: Dr. Mariano Gabriel Buffone

Director Adjunto: Dr. Dario Krapf

Consejera de estudios: Dra. Cecilia Varone

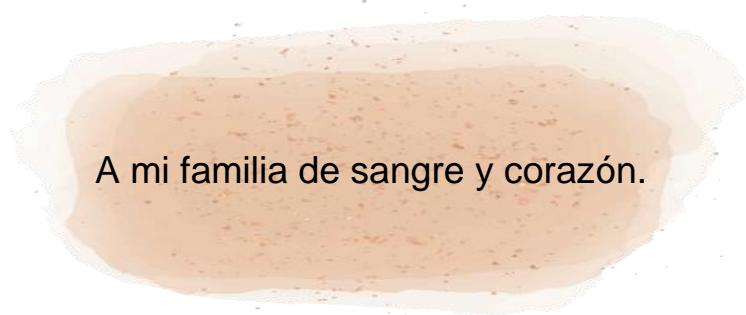
Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Reproducción, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

22 de Diciembre del 2022 - Buenos Aires

“Success is not final, failure is not fatal: It is the courage to continue that counts.”

“El éxito no es final, errar no es fatal: lo que cuenta es el coraje para continuar”

Winston Churchill



A mi familia de sangre y corazón.

Los resultados de esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones en revistas internacionales:

1. "Role of calcium oscillations in sperm physiology." Mata-Martínez E, Sánchez-Cárdenas C, Chávez JC, Guerrero A, Treviño CL, Corkidi G, Montoya F, Hernandez-Herrera P, Buffone MG, **Balestrini PA**, Darszon A. *Biosystems*. 2021 Nov;209:104524. doi: 10.1016/j.biosystems.2021.104524. Epub 2021 Aug 26.
2. "Membrane hyperpolarization abolishes calcium oscillations that prevent induced acrosomal exocytosis in human sperm." **Balestrini PA**, Sanchez-Cardenas C, Luque GM, Baro Graf C, Sierra JM, Hernández-Cruz A, Visconti PE, Krapf D, Darszon A, Buffone MG. *FASEB J*. 2021 Jun;35(6):e21478. doi: 10.1096/fj.202002333RR.
3. "Machine-learning algorithm incorporating capacitated sperm intracellular pH predicts conventional in vitro fertilization success in normospermic patients." Gunderson SJ, Puga Molina LC, Spies N, **Balestrini PA**, Buffone MG, Jungheim ES, Riley J, Santi CM. *Fertil Steril*. 2021 Apr;115(4):930-939. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.10.038. Epub 2021 Jan 15.
4. "Seeing is believing: Current methods to observe sperm acrosomal exocytosis in real time." **Balestrini PA**, Jabłoński M, Schiavi-Ehrenhaus LJ, Marín-Briggiler CI, Sánchez-Cárdenas C, Darszon A, Krapf D, Buffone MG. *Mol Reprod Dev*. 2020 Oct 28. doi: 10.1002/mrd.23431. Online ahead of print. PMID: 33118273 Review
5. "Determination of a Robust Assay for Human Sperm Membrane Potential Analysis." Carolina Baro Graf, Carla Ritagliati, Cintia Stival, **Paula A. Balestrini**, Mariano G. Buffone y Darío Krapf. *Front. Cell Dev. Biol.*, 11 June 2019 | <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00101>
6. "Molecular Basis of Human Sperm Capacitation." Puga Molina LC, Luque GM, **Balestrini PA**, Marín-Briggiler CI, Romarowski A, Buffone MG. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Jul 27;6:72. doi: 10.3389/fcell.2018.00072. eCollection 2018. Review.
7. "Only a subpopulation of mouse sperm displays a rapid increase in intracellular calcium during capacitation." Luque GM, Dalotto-Moreno T, Martín-Hidalgo D, Ritagliati C, Puga Molina LC, Romarowski A, **Balestrini PA**, Schiavi-Ehrenhaus LJ, Gilio N, Krapf D, Visconti PE, Buffone MG. *J Cell Physiol*. 2018 Dec;233(12):9685-9700. doi: 10.1002/jcp.26883. Epub 2018 Jun 28.
8. "CFTR/ENaC-dependent regulation of membrane potential during human sperm capacitation is initiated by bicarbonate uptake through NBC." Puga Molina LC, Pinto NA, Torres NI, González-Cota AL, Luque GM, **Balestrini PA**, Romarowski A, Krapf D, Santi CM, Treviño CL, Darszon A, Buffone MG. *J Biol Chem*. 2018 Jun 22;293(25):9924-9936. doi: 10.1074/jbc.RA118.003166. Epub 2018 May 9.

AGRADECIMIENTOS:

A **Mariano**. Gracias por transmitirme tu pasión por la ciencia e investigación, por incentivar me a siempre ir por más. Por tu dirección y formación. Por enseñarme que siempre hay que presentarse a todo; el que no arriesga no gana. Por todas esas veces que creíste en mí y apostaste en mi futuro, y todas las oportunidades que me brindaste sin dudar. Por todas las palabras de aliento que me brindaste. Pero por sobre todas las cosas, abrirme las puertas a tu laboratorio, y al grupo humano hermoso que trabaja con vos, muchísimas gracias!

A mis instructoras de viaje **Guille, Ani y Lis**. Gracias por recibir a este paracaidista que venía de la placenta y no tenía ni idea de que era un espermatozoide. A **Lis**, por enseñarme todo lo que sabes y más. Te estoy eternamente agradecida por cada minuto que me brindaste para planificar y diseñar experimentos juntas. Gracias por tu generosidad y apoyo incondicional. A **Ani**, la felicidad de tenerte de vuelta en el lab no tiene explicación. Te admiro muchísimo, la fuerza y energía que tenés se transmite en cada proyecto que afrontas, siempre con mucha determinación. Agradezco haber tenido la oportunidad de aprender de vos y de trabajar codo a codo juntas. Por sobre todas las cosas, siempre estar dispuesta a brindar tus manos, mente y ojos, sobre todo para corregir esta tesis, gracias por tu ayuda incondicional te adoro amiga! A **Guille**, mi norte, mi ejemplo a seguir, ante la más mínima duda es “qué haría Guille”. Tu poder de abstracción y tu atención a los detalles siempre me deslumbra. Gracias por escucharme, aconsejarme y encaminarme. Gracias por transmitirme todo lo que sabes. Te quiero muchísimo, tu felicidad es la mía amiga, gracias por ser mi guía y luz en este camino.

A mis compañeras de aventura **Jami y Marti**. Cuando entraron al lab dejé de ser hija única e inmediatamente gane dos hermanas para el resto de mi vida. A **Jami**, gracias por divertirte conmigo armando hipótesis sin pies ni cabeza, las cuales pondremos algún día en nuestro podcast “hablando sin saber”. Por tu curiosidad genuina que siempre hace que nos replanteemos lo que hacemos. Tenés una mente brillante y un corazón enorme, te quiero mucho mucho. A **Marti**, mi mell, estoy segura de que nos separaron al nacer y solitas nos reencontramos. Siempre dispuesta a escucharme, ayudarme y mandarme algún meme para que

nos riamos. Qué lindo atravesar este camino juntas, aprendiendo una de la otra. Sos todo lo que está bien, y sé que te esperan grandes cosas amiga. Gracias por prestarme tus ojos detallistas para corregir esta tesis. Te quiero infinito punto multicolor.

A las grandes adquisiciones del team buffone, **Mati, Nati, Nechu y Lu**. La sangre nueva del team, que revitaliza y llena de energía. Gracias por cada consejo y ayuda. Nada más lindo que saber que está este equipo haciéndote el aguante. Los quiero mucho.

A **Clari**, gracias por tus consejos, las discusiones científicas y tu buena predisposición.

Al laboratorio del **Dr Darszon**, en particular a **Claudia Sanchez**, gracias a su colaboración aprendí muchísimo y pude desarrollar gran parte de los resultados del capítulo I.

A mi Lepteam **Ceci, Juli, Rodri, Male y Aye**. Gracias por formarme, cuando todavía ni soñaba con hacer un doctorado. Fueron mi primera familia científica y no pude haber tenido más suerte! Los quiero.

A mis amigas de la vida, **Maggie, Montse, Sofi, Ami y Cata**. Por festejarme todos mis logros y bancarme en mis ausencias.

A mis amigas de la Facu, **Cata, Vicki, Sofi G, Pau, Sofi S, Guada, Celes**, Mechí y **Estefi**. Son lo más lindo que me dio la FCEN. Agradecida de que por más que todas seguimos caminos diferentes, seguimos compartiendo una amistad inquebrantable.

A mi familia de corazón **flia Tinajero Arias**. Gracias por siempre brindar calma, cariño y palabras de aliento.

A mi familia de sangre y corazón, **Ma, Pa, Sebi y Omi**. Por creer en mí, por darme todas las oportunidades del mundo e incentivar me a ir por más. Son la familia que me tocó y que elegiría una y mil veces. Los quiero mucho.

A mi vida entera, **JD**. Gracias por tu apoyo incondicional, por navegar juntos una vida entera. Por todos los planes y el futuro increíble que nos espera. Por la familia multi-especie que formamos que me dan sostén cuando más los necesito.

En especial quiero agradecer a la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**, de la UBA, por formarme durante todos estos años.

Al **IBYME** por recibirme con las puertas abiertas, haciéndome sentir en casa y por mantener un ambiente laboral de colaboración.

Por último, quiero agradecer a las entidades que financiaron esta tesis. A la **Male Contraceptive Initiative (MCI)** por financiar mi estadía en el laboratorio del Dr Darszon. A la **Gates Foundation**, por apoyar mi participación en el curso *Frontiers in Reproduction* (FIR), a partir del cual no solo gane muchísimo conocimiento, si no también amistades. Al **CONICET** por financiar el desarrollo de esta tesis.

RESUMEN

La capacitación (CAP) es un proceso fundamental que deben atravesar los espermatozoides para adquirir capacidad fecundante. Durante este proceso se activan vías de señalización que llevan a la exocitosis acrosomal (EA). Uno de los cambios moleculares tempranos de la CAP asociado a la EA es la hiperpolarización del potencial de membrana (Em). Trabajos previos observaron que la hiperpolarización del Em es necesaria y suficiente para preparar a los espermatozoides murinos para realizar la EA en presencia de un inductor. Por otro lado, se observó que ratones *Knock-out* (KO) para el canal de potasio específico de espermatozoides SLO3, no hiperpolarizan el Em y son infértils. Trabajos recientes en humanos, describieron una correlación entre el éxito en la fecundación *in vitro* (FIV) y la hiperpolarización del Em.

En esta tesis, nos propusimos estudiar cuál es el mecanismo molecular que impide que un espermatozoide no capacitado (NC) realice la EA; y cuál es el rol del Em durante la CAP en condiciones *in vivo*. Utilizamos espermatozoides humanos NC hiperpolarizados farmacológicamente con Valinomicina (Val) o Amiloride. La inducción de la EA se realizó con compuestos fisiológicos como progesterona (Prog) y Cloruro de potasio (KCl) y farmacológicos como el ionóforo de calcio A23187. Mediante la técnica *Pisum sativum*, encontramos que los espermatozoides NC hiperpolarizados farmacológicamente son capaces de realizar la EA y al bloquear la hiperpolarización del Em en espermatozoides CAP se inhibe la EA. Indicando que la hiperpolarización del Em es necesaria y suficiente para que espermatozoides humanos realicen la EA. Mediante ensayos de célula única, se monitoreó en simultáneo el estado acrosomal y los movimientos de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), dado su participación reportada para iniciar los procesos de exocitosis. Se observó que el mecanismo que impide que los espermatozoides NC realicen la EA es que presentan un patrón de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de tipo oscilatorio. La hiperpolarización farmacológica modula la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, disminuyendo el número de células con un patrón oscilatorio, permitiendo que los espermatozoides estén listos para realizar la EA. Por lo tanto, proponemos que la modulación de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a través de la hiperpolarización del Em asociada a la CAP es el principal mecanismo para transformar una célula que no responde a los estímulos en una que sí lo hace.

Luego, para evaluar el rol fisiológico de la hiperpolarización del Em *in vivo*, utilizamos un nuevo modelo de ratón transgénico: RGM-SLO3 (Ratón rojo y verde: RGM) ratones macho KO para el canal SLO3, que previamente fueron cruzados con una línea transgénica que posee espermatozoides con marca EGFP (verde) en el acrosoma y DsRed2 (rojo) en las mitocondrias. El RGM-SLO3, nos permite monitorear el estado acrosomal de los espermatozoides y su migración a lo largo del tracto reproductor femenino realizando apareos entre los machos KO o *wild-type* (WT) con hembras WT. Se corroboró que en los espermatozoides de machos KO no se induce la EA cuando se los trata con A23187, ni tampoco cuando se los trata con Prog. La pre-incubación con Val permitió que los espermatozoides de machos KO induzcan la EA en presencia de Prog y A23187. Al realizar los apareos encontramos que aunque la cantidad de espermatozoides presentes en el epidídimos y el número de espermatozoides que ingresa a la unión útero-tubárica es similar entre ratones KO y WT, el número de espermatozoides que ingresan al *isthmus oviductal* es menor cuando el macho es KO. Sorprendentemente, se encontraron espermatozoides provenientes de machos KO en la *ampulla*, el sitio de fecundación pero estos mayoritariamente poseen acrosoma intacto a diferencia del WT donde todos los espermatozoides observados se encuentran reaccionados. Finalmente, estudiamos si los espermatozoides que llegan reaccionados a la *ampulla* son capaces de fecundar a los oocitos. Se observó la presencia de embriones de dos células en el KO pero al evaluar el estadio de blastocisto y de 2 pronúcleos no observamos desarrollo. En base a estos resultados, concluimos que: 1) el potencial de membrana espermático contribuye a la selección de los espermatozoides que ingresan y colonizan el oviducto y es esencial para la EA *in vivo*; 2) la EA no es necesaria para que los espermatozoides migren hacia el sitio de fecundación; 3) espermatozoides de los ratones RGM-SLO3 KO que llegan a la *ampulla* no son capaces de fecundar, sugiriendo que la hiperpolarización del Em es necesaria para eventos que ocurren luego de la penetración de la zona pelúcida.

Palabras clave: potencial de membrana, exocitosis acrosomal, capacitación, oviducto.

ABSTRACT

Membrane potential changes in sperm cells, molecular and physiological relevance in mammalian fertilization.

Capacitation (CAP) is a fundamental process that spermatozoa must undergo to acquire fertilizing capacity. During this process, several signaling pathways are induced that lead to acrosomal exocytosis (AE). One of the early molecular events associated with CAP is hyperpolarization of the membrane potential (Em). Previous work on murine spermatozoa found that Em hyperpolarization is necessary y sufficient to prepare non-capacitated (NC) sperm to perform EA in the presence of an inducer. On the other hand, it was observed that Knock-out (KO) mice for the sperm-specific potassium channel SLO3 do not hyperpolarize the Em y are infertile. Lastly, more recent work in humans described a correlation between success in *in vitro* fertilization (IVF) y Em hyperpolarization.

In this thesis, we set out to study the molecular mechanism that prevents NC sperm from performing AE; y what is the role of the Em during CAP. We induced hyperpolarization pharmacologically, in NC human sperm, with Valinomycin (Val) or Amiloride. AE induction was carried out with physiological compounds such as progesterone (Prog) y KCl y with the pharmacological compound A23187. Then, the acrosomal status was evaluated using the *Pisum sativum* technique. We found that pharmacologically hyperpolarized NC sperm are able to undergo AE y that blocking Em hyperpolarization in CAP sperm inhibits AE. These results indicate that Em hyperpolarization is necessary y sufficient for human spermatozoa to perform AE. On the other hand, given the participation of intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in initiating exocytic processes, single cell assays to simultaneously monitor the acrosomal status y $[\text{Ca}^{2+}]_i$ movements were performed. We found that the mechanism that prevents NC spermatozoa from carrying out AE is that they present an oscillatory-type of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pattern. Pharmacological hyperpolarization modulates the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response, decreasing the number of cells with an oscillatory pattern of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, allowing spermatozoa to be ready to induce AE when treated with Prog or KCl. Therefore, we propose that the modulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations, through capacitation-associated membrane hyperpolarization, is the main mechanism that promotes a cell switch from a non-responsive sperm cell into one that responses to stimuli.

To evaluate the physiological role of Em hyperpolarization y to assess the relevance of AE during sperm migration in the female reproductive tract, we generated a new transgenic mouse model by mating female SLO3 KO mice, with male transgenic mice expressing EGFP in their acrosome y DsRed2 in the mitochondria. This new transgenic mouse, RGM-SLO3 (Red y Green Mouse: RGM), allowed us to observe the acrosomal status while sperm migrate through the female reproductive tract by performing matings between RGM-SLO3 KO or RGM-SLO3 Wild-Type (WT) males y WT female mice. First, we found that RGM-SLO3 KO males mated less than the RGM-SLO3 WT. More interestingly, although the concentration of sperm in the epididymis y utero-tubal junction was similar between RGM-SLO3 WT y RGM-SLO3 KO males, the number of sperm reaching the oviduct *isthmus* was lower when the male was RGM-SLO3 KO. Surprisingly, both RGM-SLO3 WT y RGM-SLO3 KO sperm reached the *ampulla*, the site of fertilization. However, unlike the RGM-SLO3 WT sperm, most RGM-SLO3 KO sperm were acrosome-intact. Next, we evaluated if acrosome-reacted sperm that have reached the *ampulla* were able to fertilize the oocytes. Although we found, for the KO, a small percentage of two-cell stage embryos, we did not observe blastocyst nor 2 pronuclear stages. Based on these results we conclude that: 1) sperm Em hyperpolarization contributes to the selection of sperm that enter y colonize the oviduct y is essential for AE *in vivo*; 2) the AE is not necessary for sperm migration to the *ampulla*; y 3) acrosome-reacted sperm from the RGM-SLO3 KO mice that reached the *ampulla* are not able to fertilize suggesting that Em hyperpolarization is necessary for events occurring after penetration of the *zona pellucida*.

Key words: membrane potential, acrosomal exocytosis, capacitation, oviduct.

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i: Calcio intracelular

1C: embriones de una célula

2C: embriones de dos células

2-PN: dos pronúcleos

Ami: Amiloride

AMP: ampolla

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

CAP: Capacitación / capacitados / medio capacitante

CatSper: Canal de calcio específico de espermatozoides

CO: *cumulus oophorus*

COCs: complejo *cumulus*-oocito

EA: Exocitosis acrosomal

Em: potencial de membrana

HA: movilidad hiperactivada

hCG: gonadotropina coriónica humana

HET: Heterocigota

IA: isthmus superior

IB: isthmus bajo

IM: isthmus medio

IVF/FIV: fecundación in vitro.

KO: Knock-out

MAE: Membrana Acrosomal Externa

MAI: Membrana Acrosomal Interna

MII: metafase 2

MP: membrana plasmática

NC: no capacitante / no capacitados

ON: Over-night

pHi: pH intracelular

PKA: Proteína quinasa A

PMSG: pregnant mare's serum gonadotropin (gonadotropina coriónica equina)

Prog: Progesterona

PVS: espacio perivitelino

RGM: Red Green Mouse (Ratón rojo y verde)

ROI: región de interés

sAC: Adenilato ciclase soluble

SLO3: Canal de potasio específico de espermatozoides

sNHE: Transportador Na⁺/H⁺ específico de espermatozoides

SO: Swim-Out

Spz: espermatozoide

SU: Swim-up

UTJ: unión útero-tubárica

Val: Valinomicina

WT: Wild-type

ZP: zona pellucida

ÍNDICE

ABREVIATURAS	x
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
El espermatozoide	2
Espermatogénesis	2
Morfología y función espermática	3
Maduración espermática y epidídimos	5
Capacitación	7
Membrana plasmática (MP):.....	8
Distribución de iones:.....	9
Adenilato ciclase y proteína quinasa A (PKA):.....	12
Remodelación del citoesqueleto de actina:.....	13
Metabolismo celular:	13
pH citoplasmático (pH _i):	14
Potencial de membrana (Em):.....	15
Canal de potasio específico de espermatozoides SLO3	19
Hiperactivación	22
Exocitosis Acrosomal	25
Transporte espermático en el tracto reproductor femenino	31
Fecundación	37
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	41
Objetivo:.....	41
Hipótesis:.....	41
CAPÍTULO I: LA HIPERPOLARIZACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA ELIMINA LAS OSCILACIONES DE CALCIO QUE INHIBEN LA EA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.....	42
Materiales y Métodos	43
Reactivos:	43
Medio de cultivo para espermatozoides:.....	43
Capacitación espermática:	43
Determinación del potencial de membrana por citometría de flujo:	45
Extracción de proteínas e inmunotransferencia:	46
Exocitosis acrosomal:	46
<i>Live imaging</i> en célula única de espermatozoides:.....	48
Análisis estadístico:	49
Introducción	50
Hipótesis y Objetivos:.....	53

Resultados	54
La Valinomicina promueve la hiperpolarización del Em en espermatozoides humanos no capacitados.....	54
La adición de ionóforo de Ca^{2+} A23187, progesterona o K^+ aumentó el porcentaje de EA solo en espermatozoides hiperpolarizados	58
La inhibición de la hiperpolarización del Em impidió la EA inducida por agonistas	59
La hiperpolarización del Em modifica la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides no capacitados.....	60
La adición de Prog o K^+ aumentó significativamente el número de espermatozoides que tienen un aumento transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$	63
Solo los espermatozoides que mostraron un aumento transitorio o sostenido de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a Prog o K^+ pueden realizar la EA.	67
Discusión	73
CAPÍTULO II: LA HIPERPOLARIZACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA ES NECESARIA PARA LA MIGRACIÓN, LA INDUCCIÓN DE LA EA Y LA FECUNDACIÓN <i>IN VIVO</i>.	78
Materiales y Métodos	79
Reactivos:	79
Animales:.....	79
Medios de cultivo para espermatozoides y desarrollo embrionario:	79
Obtención y capacitación espermática:	80
Determinación de la exocitosis acrosomal murina (EA) <i>in vitro</i> mediante citometría de flujo:	80
Análisis de movilidad espermática murina (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA):....	81
Recolección de imágenes <i>in vivo</i> de la migración espermática:	83
Determinación de la formación de pronúcleos:.....	84
Evaluación del desarrollo embrionario a blastocisto <i>in vitro</i> :.....	84
Análisis Estadístico:	85
Introducción	86
Hipótesis y Objetivos.....	89
Resultados	90
Generación y validación de espermatozoides transgénicos que carecen de canales SLO3 y que contienen EGFP/DsRed2.	90
<i>Knock-Out</i> del gen SLO3 alteró el comportamiento de apareamiento de los ratones macho.....	93
Espermatozoides del ratón SLO3 KO pueden migrar a través del oviducto y llegar a la <i>ampulla</i> de forma similar a los del WT.....	94
La mayoría de los espermatozoides de ratones SLO3 KO llegan al sitio de fecundación con un acrosoma intacto.....	97
Los espermatozoides de ratones SLO3-KO no fertilizan <i>in vivo</i>	101

Discusión	104
CONCLUSIÓN.....	109
PERSPECTIVAS A FUTURO	112
BIBLIOGRAFÍA.....	113

INTRODUCCIÓN GENERAL

La fecundación es un proceso por el cual dos gametas haploides, el espermatozoide (gameta masculina) y el oocito (gameta femenina), interactúan, se reconocen y fusionan con el fin de establecer el genotipo de un nuevo individuo, y de esta manera perpetuar la especie (Okabe, 2013). En particular, el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la fecundación en especies con reproducción sexual interna, especialmente en mamíferos, fue realizado por primera vez en 1959 por M.C. Chang (Chang, 1959), gracias al desarrollo de estrategias que permitieron por primera vez la realización exitosa de la fecundación *in vitro* (FIV). A diferencia de animales con reproducción externa donde los primeros estudios sobre fecundación datan de 1853-1877 (Hertwig, 1875; Newport, 1853). Es por esto que, en gran parte, los mecanismos involucrados en la fecundación en mamíferos aún son desconocidos (Okabe, 2013; Parrington et al., 2019).

La fecundación incluye la maduración de ambas gametas, migración de la gameta masculina desde su lugar de formación, el testículo, hasta el tracto reproductor femenino donde ocurre la fusión del espermatozoide con el oocito y la formación del zigoto. Estudiar en profundidad estos procesos y los eventos moleculares involucrados resulta indispensable para comprender distintas problemáticas asociadas a la propagación de la vida. En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la infertilidad como una enfermedad que afecta a 1 de cada 10 parejas en el mundo. Donde al menos un 30% se debe a componente masculino, 30% a componente femenino y el porcentaje restante se debe a infertilidad idiopática o de componente mixto, tanto femenino como masculino (Mascarenhas et al., 2012; Skakkebaek et al., 2016). Asimismo, los métodos anticonceptivos masculinos utilizados, preservativos y vasectomías, solo responden al 21% de los anticonceptivos utilizados actualmente (Long et al., 2021), generando una carga adicional en la mujer. Por último, la cría de animales destinados a distintos tipos de industria, así como a la preservación de la biodiversidad, enfrenta nuevos desafíos (Barratt et al., 2010; Darszon et al., 2011; Tulsiani y Abou-Haila, 2008).

En este trabajo nos abocamos a extender el conocimiento relacionado a la fisiología de la gameta masculina, utilizando como modelo de estudio el espermatozoide murino y humano.

A continuación, en el marco de los objetivos de esta tesis, se describen brevemente las principales características morfológicas del espermatozoide de mamíferos y los eventos fisiológicos que le ocurren antes y durante la fecundación.

El espermatozoide

El espermatozoide es la única célula producida en un organismo que cumple su función en otro organismo. Desde los túbulos seminíferos, pasando por el epidídimo donde madura y son almacenados previo a su eyaculación (Robaire et al., 2006). Luego, una vez eyaculados deben viajar a través del tracto reproductor femenino, donde ocurre la CAP, hasta la *ampulla*, el reservorio de los oocitos, el sitio de la fecundación (Yanagimachi, 1994a). A lo largo de esta tesis se detallará el proceso de capacitación espermática, necesario para la fecundación.

Espermatogénesis

En mamíferos post-puberales, los espermatozoides son el producto de un complejo proceso denominado espermatogénesis, el cual puede ser subdividido en tres grandes etapas: 1) una inicial de auto-renovación y proliferación mitótica de espermatogonias (células germinales diploides: entre las cuales se encuentran las células madres espermatogonias) 2) sucedida de dos divisiones meióticas de espermatoцитos a espermátidas (células haploides), 3) finalizando con la diferenciación de espermátidas a espermatozoides (espermatozoogénesis). Todas ellas tienen lugar dentro de los túbulos seminíferos de los testículos y son coordinadas a través de una interacción estrecha entre las células germinales y somáticas (Leydig y Sertoli) presentes en el tejido (Figura 1) (Fayomi y Orwig, 2018; Komeya et al., 2018).

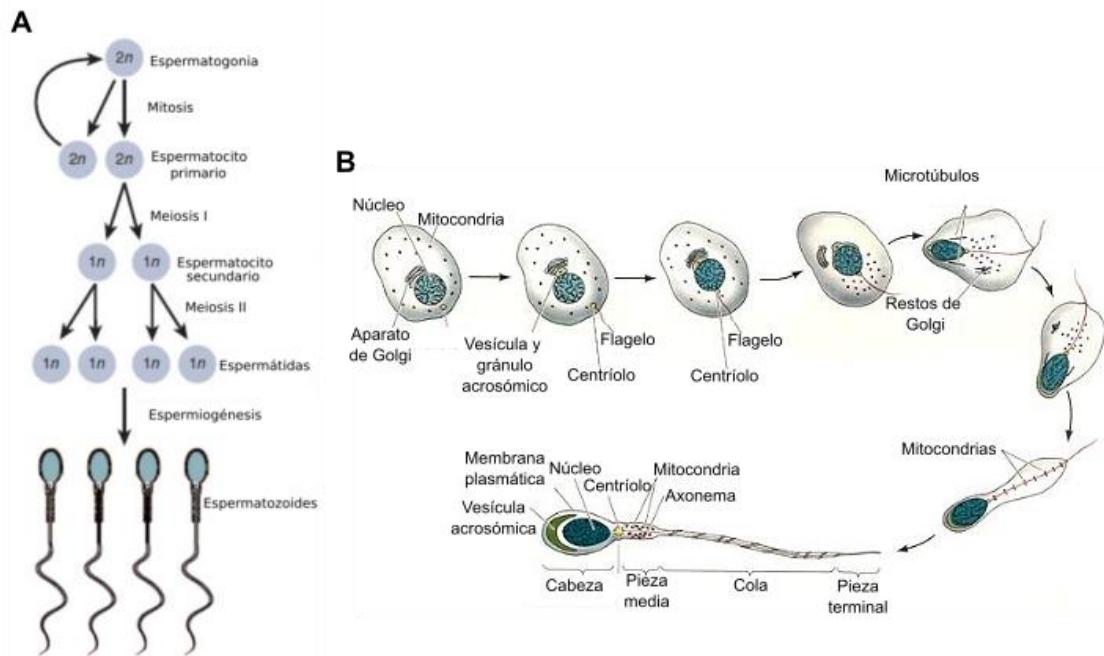


Figura 1: Espermatogénesis y espermogénesis. A) Primera fase proliferativa: Espermatogonias tienen dos caminos: una la de la auto-renovación (mantienen su estado de célula madre) y el segundo luego de la proliferación por divisiones mitóticas comienzan a diferenciarse dando lugar a los espermatocitos primarios. Luego, suceden dos divisiones reduccionales meióticas; a partir de un espermatocito primario se generan 4 espermátidas. B) En la última fase, la espermogénesis, las espermátidas maduras sufren un proceso de diferenciación donde se polariza la célula (núcleo migra a un polo), se condensa y elonga el núcleo, se forma el acrosoma (a partir del aparato de Golgi), se desarrolla el flagelo (el centrosoma da lugar a dos centriolos, uno se ubica en el cuello dando lugar al flagelo) y por último se reduce el citoplasma. Adaptado de Gilbert, S.F., Biología del Desarrollo.

Morfología y función espermática

Los espermatozoides son células móviles, altamente especializadas que poseen una clara polaridad determinada por sus dos estructuras morfológicas principales: la cabeza y el flagelo, las cuales se encuentran unidas por el cuello (Figura 2) (Eddy, 2006). La cabeza contiene al núcleo y al acrosoma. El núcleo posee el material genético compuesto por un número determinado de cromosomas específico de cada especie. Durante la diferenciación de las espermátidas, las histonas que comúnmente se asocian al ADN son reemplazadas casi en su totalidad por protaminas, pequeñas proteínas nucleares ricas en arginina, resultando en una cromatina altamente condensada y por ende transcripcionalmente inactiva (Figura 1) (Balhorn, 2007). El acrosoma (*akros*: extremo, *soma*: cuerpo) consiste en una vesícula secretoria ubicada entre el núcleo y la membrana plasmática (MP) de la región apical de la cabeza.

Se forma a partir de la fusión de vesículas provenientes del aparato de Golgi (Figura 1) (Martínez-Menárguez et al., 1996). La luz del acrosoma está delimitada por una membrana en la que se pueden describir dos regiones, la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana acrosomal interna (MAI). La MAE se encuentra en estrecha proximidad a la MP, mientras que la MAI se posiciona junto a la membrana nuclear (Eddy, 2006). El lumen acrosomal contiene componentes solubles y una estructura particulada que se denomina matriz acrosomal (Figura 2) (Buffone et al., 2008; Foster et al., 1997; Kim et al., 2001; Westbrook-Case et al., 1994). En la región más basal de la cabeza, definiendo el fin de la misma y el comienzo del flagelo, se encuentra el cuello. En esta región se localizan dos centriolos, uno proximal situado cerca del núcleo y otro más distal, que da origen a los microtúbulos del axonema flagelar. Este axonema está ubicado en el centro del flagelo y lo recorre a lo largo de toda su extensión. El mismo tiene una típica estructura “9+2” que consiste en nueve pares de microtúbulos que circundan y están conectados a un par central (Figura 1 y 2) (Lindemann y Lesich, 2016). Los pares de microtúbulos periféricos son unidades que contienen una espiga (o rayo) radial que proyecta hacia el par central y dos brazos de dineínas, siendo estas últimas ATPasas que producen la fuerza motriz necesaria para que el espermatozoide se desplace (Lindemann y Lesich, 2016). El axonema se encuentra rodeado de nueve fibras densas externas (Olson y Linck, 1977; Rivkin et al., 2008) y componentes estructurales especializados en base a los cuales el flagelo puede ser dividido en tres regiones: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Figura 2). En la pieza media, primera porción contigua al cuello, se encuentran las mitocondrias organizadas en una configuración de doble-hélice alrededor del axonema (Gervasi et al., 2018; Otani et al., 1988). Como en las células somáticas, estas mitocondrias contribuyen a la generación de energía necesaria para el mantenimiento de los procesos fisiológicos del espermatozoide. La pieza principal constituye alrededor de dos tercios del flagelo, con una longitud muy variable dependiendo de la especie y se caracteriza por la presencia de una vaina fibrosa que rodea a las fibras densas externas y al axonema (Figura 2). Esta vaina funciona como un andamio para proteínas que participan en numerosas vías de señalización, colaborando con la compartimentalización de las mismas (Lishko et al., 2012). Entre ellas, se destaca la presencia de

numerosas proteínas de la vía de la glicolisis necesaria para la producción de ATP para la movilidad del flagelo (Goodson et al., 2012). La pieza media y la pieza principal están separadas por una estructura de septina denominada anillo o *anulus*, que evita la difusión de las proteínas de la MP entre estos dos dominios flagelares (Kwitny et al., 2010). La pieza terminal, en cambio, está compuesta por axonema desnudo; en esta región los microtúbulos finalizan a distintos niveles, rodeados de escaso citoplasma y MP (Figura 2).

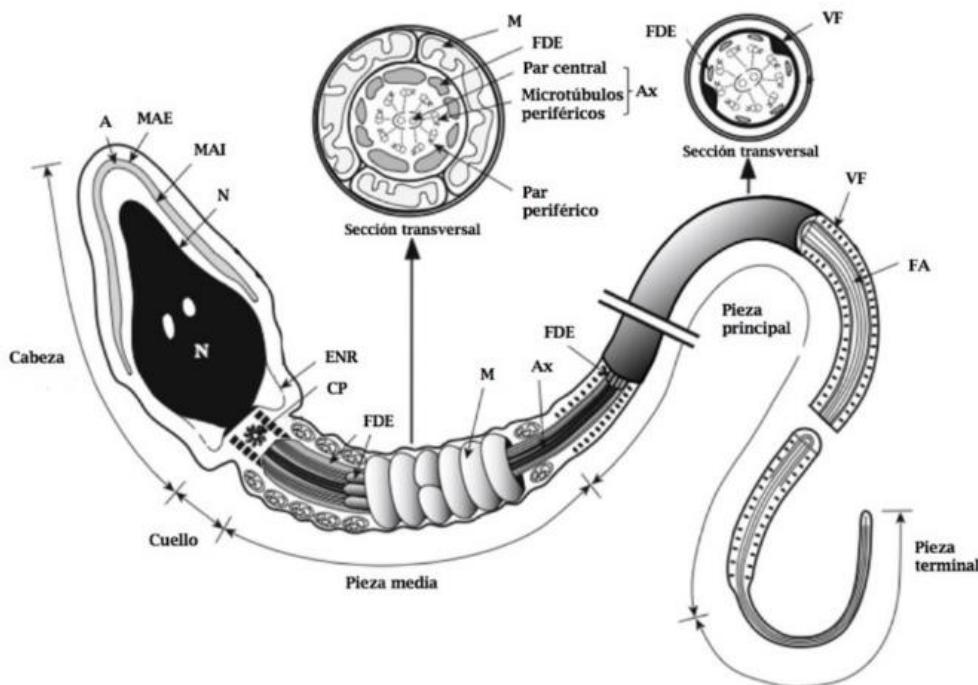


Figura 2: Esquema representativo de un espermatozoide de mamífero. Cabeza: núcleo (N), acrosoma (A), membrana acrosomal externa (MAE), membrana acrosomal interna (MAI), envoltura nuclear redundante (ENR). Cuello: centriolo proximal (CP). Pieza media: mitocondrias (M), axonema (Ax), fibras densas externas (FDE). Pieza principal: vaina fibrosa (VF), filamento axial (FA). Pieza terminal. Se muestran secciones transversales de la pieza media y la pieza principal. Tomado y modificado de (Toshimori, 2009).

Maduración espermática y epidídimo

En mamíferos los espermatozoides testiculares se consideran funcionalmente inmaduros debido a su incapacidad de nadar progresivamente y de interactuar con el complejo *cumulus-oocito* (COC) (Jones y Lopez, 2013). Es durante su tránsito por el epidídimo, un órgano ductal altamente especializado, donde ocurre la maduración espermática (Zhou et al., 2018). Asimismo, el epidídimo funciona como reservorio espermático. Éste órgano puede ser dividido en 4 regiones según su anatomía y funcionalidad (Robaire et al., 2006): segmento inicial (región adyacente al testículo; reabsorción de fluido testicular,

concentración de espermatozoides) (Abe et al., 1984); *caput* o cabeza (región proximal al testículo; producción y secreción de proteínas; pequeña población de espermatozoides comienza a nadar progresivamente y adquirir capacidad de reconocer al oocito) (Aitken et al., 2007; Chevrier y Dacheux, 1992), *corpus* o cuerpo (región media; espermatozoides continúan su maduración) y el *cauda* o cola (región distal al testículo; espermatozoides maduros; gran lumen y pH ácido, el cual mantiene a los espermatozoides quiescentes formando de esta manera el reservorio de espermatozoides maduros) (Figura 3) (Robaire et al., 2006).

Una de las funciones epididimarias más evidentes es el transporte de los espermatozoides desde la *rete testis* hasta el *vas deferens* (Figura 3), donde el tiempo estimado de transporte puede durar entre 10 y 15 días en roedores y entre 2 y 4 días en humanos (Bedford, 1994; Johnson y Varner, 1988). Contracciones rítmicas del músculo liso, más frecuentes en el *caput* pero con mayor amplitud en el *cauda*, y las cillas del epitelio epididimal colaboran en dirigir el tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo (Elfgren et al., 2018). A su vez, uniones estrechas entre las células epiteliales del epidídimo forman una barrera protectora que confiere inmuno-tolerancia para prevenir una respuesta auto-inmune frente antígenos espermáticos (los cuales se expresan principalmente a partir de la pubertad donde el sistema inmune ya se encuentra maduro, por lo tanto sus antígenos son reconocidos como foráneos) (Da Silva y Barton, 2016; Da Silva et al., 2011; Fijak et al., 2018; Voisin et al., 2019).

El epidídimo contiene un ambiente luminal ácido lo cual facilita la transferencia de proteínas secretadas por las células epiteliales de dicho órgano como vesículas extracelulares llamadas epididimosomas (Barrachina et al., 2022; Sullivan, 2015; Yanagimachi et al., 1985; Zhou et al., 2018). Un estudio del proteoma de espermatozoides murinos colectados de las tres regiones anatómicas epididimarias determinó la identidad y número de proteínas que se incorporan o remueven de las células durante su tránsito por cada segmento: los espermatozoides de *caput* y *corpus*, se encuentran enriquecidos en elementos relacionados a la reorganización lipídica, mientras que los de *cauda* se caracterizan por poseer proteínas de reconocimiento espermatozoide-oocito y de movilidad (Skerget et al., 2015). Debido a que los espermatozoides son transcripcional y tradicionalmente silentes, el aporte proteico y de RNA

pequeños no codificantes es crucial para la maduración espermática (Zhou et al., 2018). A su vez, el pH ácido del lumen mantiene quiescentes a los espermatozoides al inhibir canales y transportadores específicos de los espermatozoides (Kirichok et al., 2006; Navarro et al., 2007; Navarro et al., 2008; Visconti, 2009; Visconti et al., 2011). Asimismo, se describió la presencia de factores decapacitantes, como por ejemplo SPINK3, secretado por las vesículas seminales el cual impide la hiperpolarización del Em y el influxo de calcio a través de CatSper (Nicolli et al., 2022; Zalazar et al., 2020).

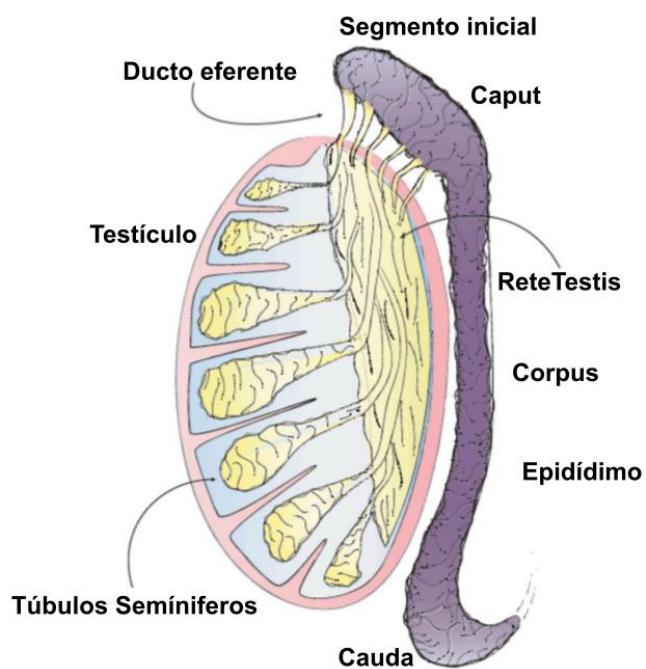


Figura 3: Anatomía testicular y epididimaria. Adaptada de (James et al., 2020).

Capacitación

Durante la maduración epididimaria los espermatozoides adquieren el potencial de fecundar al oocito, sin ser todavía efectivamente capaces de hacerlo. En 1951, dos investigadores, de manera independiente, llegaron a la misma conclusión: para que los espermatozoides maduros sean capaces de fecundar deben residir un tiempo en el tracto reproductor femenino. Durante su pasaje por el tracto reproductor femenino, los espermatozoides atraviesan una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos a los que se englobó bajo el término de capacitación (Austin, 1952; Chang, 1951). Este descubrimiento llevó al desarrollo

de medios definidos que al emular las condiciones del tracto femenino permitió realizar la primera fecundación *in vitro* primero en hámster, luego en ratón y por último en humanos (Steptoe y Edwards, 1978; Toyoda et al., 1971; Yanagimachi y Chang, 1963). La utilización de medios definidos permitió la caracterización de dos eventos fundamentales de la capacitación: 1) la adquisición de un tipo de movilidad con un batido flagelar asimétrico y de gran amplitud, el cual se llamó movilidad hiperactivada (HA) (Yanagimachi, 1970); 2) la habilidad de realizar la exocitosis acrosomal (EA) (Austin y Bishop, 1958), donde se secreta el contenido de una única vesícula, el acrosoma, dejando expuesta la membrana acrosomal interna (Yanagimachi, 1989; Yanagimachi, 1994a). Ambos eventos son indispensables para la fecundación y serán detallados más adelante.

In vivo, la capacitación comienza cuando los espermatozoides eyaculados ingresan al tracto reproductor femenino y termina cuando el espermatozoide penetra al oocito. Los cambios bioquímicos suceden de manera secuencial en las distintas regiones del tracto desde el ingreso de los espermatozoides eyaculados hasta que éstos alcanzan al oocito. Esta activación secuencial de vías de señalización también es necesaria para adquirir la habilidad de fecundar *in vitro* (Visconti, 2009). Considerando la complejidad de este proceso, es sorprendente que el mismo pueda ser emulado en un medio simple y definido, conteniendo un suministro limitado de electrolitos (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} y PO_4^{3-}), metabolitos energéticos (glucosa, piruvato y lactato), y un aceptor de colesterol, generalmente albúmina sérica bovina (BSA) (Toyoda et al., 1971). Aunque a la fecha, todavía no se ha generado una definición global de la capacitación, se ha avanzado en el conocimiento de su naturaleza biológica, implicancia fisiológica y sus mecanismos de inducción (Bailey, 2010; Okabe, 2013; Stival et al., 2016; Visconti et al., 2011).

A grandes rasgos, las modificaciones bioquímicas asociadas a la capacitación ocurren a nivel de:

Membrana plasmática (MP):

- Redistribución de proteínas integrales de membrana, cambios en la proporción de proteínas de membrana y difusión de lípidos (Gadella, 2008; Wolf et al., 1986).

- Remoción de factores decapacitantes: moléculas que se originan en las secreciones testiculares, epididimarias, prostáticas y de la vesícula seminal, que entran en contacto con los espermatozoides a través del plasma seminal y se postula que previenen su capacitación prematura (Cross, 1996; Kawano y Yoshida, 2007; Kawano et al., 2008). Un ejemplo son las glicoproteínas no covalentemente unidas a la superficie de la membrana con alto contenido de ácido siálico. Se ha demostrado que la presencia de este ácido correlaciona positivamente con la protección contra la fagocitosis en el tracto femenino, pero negativamente con la capacidad de los espermatozoides para unirse a la zona *pellucida* (ZP) del oocito (Ma et al., 2012; Oliphant y Brackett, 1973).
- Aumento de la fluidez de la MP debido principalmente a la remoción de colesterol (Davis, 1981; Gadella, 2008; Jones et al., 2007), así como modificaciones en su distribución y la de otros esteroles (Lishko et al., 2012). El aumento en la fluidez de la membrana impacta sobre la apertura de distintos canales iónicos.

Distribución de iones:

Después de la eyaculación, durante su tránsito por el tracto femenino, los espermatozoides se exponen a nuevas concentraciones de iones extracelulares y osmolaridad, respecto de aquellas a las que estaban expuestos en el fluido seminal (Visconti et al., 2011). Esto provoca cambios en la concentración intracelular de iones, tales como Ca^{2+} , HCO_3^- , Cl^- , Na^+ y K^+ , entre otros (Darszon et al., 2007; Kirichok y Lishko, 2011; Lishko et al., 2012). El cambio en la composición intracelular de estos iones conlleva a la activación de la vía adenilato cilcasa – AMPc – PKA; la remodelación del citoesqueleto; activación o inhibición de fosfatasas, quinasas y proteasas; la alcalinización del pH citoplasmático (pH_i); cambios en el metabolismo celular y la hiperpolarización del potencial de membrana (Em). Como el foco de esta tesis está en el Em , la homeostasis del ion K^+ durante este proceso será detallado en otro apartado.

HCO_3^- :

Tanto en el tracto reproductor femenino como en los medios que soportan la capacitación la concentración de HCO_3^- (~25mM) es mucho más alta que en el epidídimo (2-4 mM) (Okamura y Sugita, 1983; Okamura et al., 1985),

favoreciendo de esta manera el ingreso de este anión al interior de las células (Delgado-Bermúdez et al., 2022). Existen varios transportadores de HCO_3^- presentes en la MP de los espermatozoides, entre ellos el co-transportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ o NBC (Demarco et al., 2003) y el anti-transportador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Lishko et al., 2012; Zeng et al., 1996) (Figura 4). Recientemente, se ha identificado un co-transportador de Na^+ , K^+ y Cl^- , denominado NKCC. Se postula que a través de este canal se estaría generando un aumento intracelular de Cl^- (Wertheimer et al., 2008), lo cual permitiría la activación del anti-transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ estimulando el ingreso sostenido de HCO_3^- al espermatozoide (Chávez et al., 2012). El aumento en la concentración intracelular de HCO_3^- , junto a la salida de protones (H^+) a favor del gradiente hacia el espacio extracelular, contribuyen a un aumento en el pH_i (Demarco et al., 2003; Zeng et al., 1996). A su vez, la presencia de anhidrasas carbónicas en el interior celular metabolizan el HCO_3^- de manera reversible ($\text{OH}^- + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) (José et al., 2015; Wandernoth et al., 2010). Por último, nuestro grupo encontró que el ingreso inicial de HCO_3^- al espermatozoide es vía NBC pero luego el ingreso sostenido se encuentra regulado por el canal regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) el cual se encuentra asociado a los canales SLC26, intercambiadores de Cl^- y HCO_3^- , colaborando de esta manera a la alcalinización e hiperpolarización de los espermatozoides (Puga Molina et al., 2017; Puga Molina et al., 2018a; Xu et al., 2007).

Na^+ y Cl^- :

Los niveles intracelulares de Na^+ se regulan a través de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ (NHE) (Garcia y Meizel, 1999; Wang et al., 2003), la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Lishko et al., 2012), el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el canal de Na^+ epitelial (ENaC) (Figura 4). El espermatozoide posee una Na^+/K^+ ATPasa con una subunidad $\alpha 4$ específica de espermatozoides, la cual la hace un blanco interesante para el desarrollo de métodos anticonceptivos (Jimenez et al., 2012; Syeda et al., 2020). Se ha reportado que durante la capacitación, el ENaC se cierra, aportando de esta manera a la hiperpolarización del Em (Escoffier et al., 2012; Puga Molina et al., 2018a) (Figura 4) debido a que el cierre de ENaC permite la apertura del canal CFTR. En cuanto al Cl^- , se han descrito dos transportadores presentes en espermatozoides de mamíferos: CFTR (Puga

Molina et al., 2017; Puga Molina et al., 2018a), y el ya mencionado NKCC (Wertheimer et al., 2008).

Ca^{2+} :

El mantenimiento y regulación de la homeostasis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es clave en varios aspectos de la fisiología espermática. Esto involucra bombas y canales en la membrana plasmática o en el interior celular en los reservorios de Ca^{2+} (el acrosoma, las mitocondrias y la envoltura nuclear redundante en el cuello) los cuales importan, exportan o secuestran cationes de calcio (Clapham, 2007; Correia et al., 2015; Darszon et al., 2011; Ferreira et al., 2021; Jimenez-Gonzalez et al., 2006). El eflujo de Ca^{2+} a través de la MP se encuentra regulado por la bomba de Ca^{2+} ATPasa (PMCA) y un intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), los cuales sacan el calcio de la célula o dentro de los reservorios de calcio (Michelangeli et al., 2005). Por otro lado, el influjo de Ca^{2+} está dado principalmente por el canal de Ca^{2+} específico de espermatozoides, CatSper. Este canal es dependiente de pH_i , levemente voltaje dependiente y regulado por ligandos presentes en el fluido oviductal (Hwang et al., 2019; Kirichok et al., 2006; Lishko y Kirichok, 2010; Lishko et al., 2011). Particularmente en humanos se encontró que este canal se encuentra regulado por progesterona (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011). Otros canales de Ca^{2+} voltajes dependientes (Cav) fueron descriptos en espermatozoides, pero su rol en la fisiología espermática no es claro (Wennemuth et al., 2000). Por último, la movilización de Ca^{2+} de los reservorios se encuentra mediada por receptores de tipo inositol trisfósfato y receptores de rianodina (IP3R y RyR) (Darszon et al., 2011; Visconti et al., 2011).

La modulación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provee una manera de transformar información del espacio extracelular al intracelular de una manera sensible y rápida, por lo que el Ca^{2+} es un segundo mensajero fundamental (Carafoli y Krebs, 2016). Los patrones de respuesta de Ca^{2+} a estímulos específicos pueden variar en su amplitud, frecuencia, duración y locación, siendo picos transitorios, repetitivos o en forma de oscilaciones (Mata-Martínez et al., 2021). En particular, las oscilaciones de Ca^{2+} han sido asociadas al batido flagelar en espermatozoides de hámster y humanos (Corkidi et al., 2017; Suarez et al., 1993), a la quimiotaxis en organismos marinos (Ramírez-Gómez et al., 2019; Strünker et al., 2015;

Torrezan-Nitao et al., 2021) y a la regulación de la EA (Mata-Martínez et al., 2018; Sánchez-Cárdenas et al., 2014a).

Adenilato ciclase y proteína quinasa A (PKA):

La temprana exposición a HCO_3^- durante la capacitación resulta en un rápido incremento de los niveles intracelulares de AMPc (Harrison y Miller, 2000). Este incremento induce la actividad de PKA (Harrison, 2004), la cual alcanza niveles máximos al minuto luego de haber incubado a los espermatozoides en un medio capacitante (Stival et al., 2015). Se describió que el rápido incremento en AMPc se debe a la participación del HCO_3^- y del Ca^{2+} , ambos presentes en el medio capacitante, sugiriendo la participación de la adenilato ciclase (AC) (Garbers et al., 1982; Jaiswal y Conti, 2003). En el espermatozoide se expresan dos clases de adenilato ciclase: la transmembranal (ACm o ADCY1-9) y la soluble (sAC o ADCY10). La primera se localiza en la cabeza del espermatozoide (Wertheimer et al., 2013), mientras que la segunda, aún no ha sido debidamente establecido (Hess et al., 2005). En 1999, Levin y Buck reportaron la presencia de una AC soluble (sAC) en espermatozoides, activada por la presencia de HCO_3^- en los medios capacitantes, la cual induce el rápido incremento en AMPc (Buck et al., 1999; Chen et al., 2000). Aunque la presencia de sAC fue descrita previamente y encontrada en fracción soluble de extractos testiculares (Braun y Dods, 1975; Kornblihtt et al., 1981), en espermatozoides maduros se reportó que su actividad se encuentra asociada a la MP (Visconti et al., 1990). Si bien el mecanismo por el cual sAC es transferida de la fracción soluble a la particulada no se conoce, se postula que la importancia de este movimiento entre fracciones de la sAC puede estar asociado a generar microdominios localizados de AMPc, por lo tanto, afectando la actividad de PKA dentro de esos microdominios (Baro Graf et al., 2020b). Por otro lado, se observó que sNHE es necesario para la expresión de sAC, siendo posible que el complejo module el pH_i y el HCO_3^- (Wang et al., 2007).

Como mencionamos previamente el aumento de AMPc activa sucesivamente a la PKA (Harrison, 2004). PKA consta de cuatro subunidades: dos catalíticas (PKA-C) y dos regulatorias (PKA-R) (Taylor et al., 2013). PKA-R une AMPc permitiendo que PKA-C una ATP y sea capaz de transferir un fosfato en residuos Ser/Thr. Al ser una quinasa de alto espectro, su localización subcelular restringe

su actividad (Torres-Quesada et al., 2017). Participa en diversos eventos moleculares como la fosforilación de blancos de PKA (pPKA) y consecuente aumento en la fosforilación de residuos en tirosina (pY) (Buffone et al., 2006; Liu et al., 2006; Visconti et al., 2002) mediada por la activación indirecta de tirosin quinasas, como la tirosin quinasa FER (Alvau et al., 2016; Craig et al., 2001). Ambos parámetros pPKA y pY han sido extensamente correlacionados con la capacitación (Visconti et al., 2011). Recientemente, un nuevo estudio realizado *in vivo* reportó que los espermatozoides que se encuentran en la *ampulla*, tienen CatSper1 intacto, realizaron la EA y no presentan pY (Ded et al., 2020). Además, ratones KO para FER son fértiles aún sin presentar pY durante la capacitación. Estos resultados cuestionan la relevancia de la pY durante la capacitación *in vitro* e *in vivo*. La participación de PKA se ha asociado a otros eventos también como la hiperpolarización del Em (Stival et al., 2015), la alcalinización citoplasmática (Matamoros-Volante y Trevino, 2020; Puga Molina et al., 2017; Wang et al., 2007) y el ingreso de Ca^{2+} al interior celular mediante la activación de CatSper en espermatozoides murinos (Orta et al., 2018). A su vez, se describió la importancia de PKA para la adquisición de la movilidad HA (Burton et al., 1999; Xu et al., 2018) y para la EA (De Jonge et al., 1991; Stival et al., 2018; Tsirulnikov et al., 2019). Aunque la participación de PKA durante la EA ocurriría a través de la hiperpolarización del Em, también se ha descripto la participación de una vía dependiente de AMPc e independiente de PKA, mediado por EPACs (Lucchesi et al., 2016).

Remodelación del citoesqueleto de actina:

Durante la capacitación se observa un incremento en la polimerización de actina, de G-actina (monomérica o globular) a F-actina (polimérica o filamentosa), tanto en la cabeza como en el flagelo del espermatozoide (Brener et al., 2003; Finkelstein et al., 2010; Romarowski et al., 2015). Mediante el uso de microscopía de súper-resolución, se reportaron cambios dinámicos en estructuras de actina bien definidas en diferentes regiones de la cabeza espermática (Romarowski et al., 2018).

Metabolismo celular:

La capacitación espermática depende de la colaboración entre las vías de señalización y el metabolismo (Goodson et al., 2012). El ATP es sustrato de las

bombas (por ejemplo: Na^+/K^+ ATPasa y la bomba de Ca^{2+} PMCA4) y de la sAC. La sAC se considera un sensor metabólico ya que su funcionamiento depende del ATP presente (Chang y Oude-Elferink, 2014). En espermatozoides de mamíferos, los cambios en el patrón de movilidad, como la HA, están basados en el consumo de ATP producido por la glicólisis (Miki et al., 2004). Asimismo, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa también se encuentran activos (Goodson et al., 2012; Tourmente et al., 2022). El medio capacitante contiene nutrientes que son metabolizados por estas vías como la glucosa (glicólisis, ciclo Krebs y fosforilación oxidativa) y el piruvato (ciclo Krebs y fosforilación oxidativa) (Toyoda et al., 1971). Estudios recientes realizados en espermatozoides murinos evaluaron el rol de cada uno de estos componentes, encontraron que la privación de nutrientes inmovilizaba a los espermatozoides. Interesantemente, la recuperación de la movilidad tras el agregado de los nutrientes omitidos mejoraba la FIV cuando se los comparaba con espermatozoides incubados constantemente en un medio completo. Además, observaron un desarrollo embrionario más eficiente y un mayor porcentaje de crías luego de transferencias embrionarias (Navarrete et al., 2019). Por último, ensayos similares fueron realizados con espermatozoides humanos (Marín-Briggiler et al., 2021). En este trabajo, encontraron que durante el paso de hambreando los espermatozoides no dejan de moverse, aunque los parámetros asociados a la movilidad, como la HA, se mejoran con la reincorporación de nutrientes (Marín-Briggiler et al., 2021). Este protocolo de hambreando seguido de recuperación podría utilizarse como una nueva estrategia en la clínica para mejorar las tasas de desarrollo embrionario y preñez seguidas de técnicas de reproducción asistida como la FIV.

pH citoplasmático (pH_i):

El cambio en la concentración de HCO_3^- y H^+ a lo largo del tracto reproductor femenino, inducen la alcalinización del pH_i asociada a la capacitación en espermatozoides mamíferos (Nishigaki et al., 2014; Zeng et al., 1996). Los principales canales encargados de mantener el pH_i son el intercambiador NHE y el canal CFTR en espermatozoides murinos; y el canal Hv1 en espermatozoides humanos (Chávez et al., 2012; Lishko y Kirichok, 2010; Miller et al., 2016; Wang et al., 2003; Xu et al., 2007). El canal Hv1 está presente en la pieza principal del flagelo espermático, y es el principal conductor de protones en espermatozoides

humanos. La despolarización del Em induce la apertura de este canal (Figura 5) y está ausente en espermatozoides murinos (Lishko y Kirichok, 2010). Dentro de la familia de intercambiadores de Na^+/H^+ (SLC9) se encuentra un miembro específico de espermatozoides (sNHE), el cual es voltaje dependiente y se expresa en la pieza principal de espermatozoides murinos y humanos (Hernández-Garduño et al., 2022; Wang et al., 2003). Por otro lado, el canal NBC modula el ingreso inicial de HCO_3^- mientras que el canal CFTR por asociación al canal SLC26 mantiene el ingreso de HCO_3^- sostenido (Puga Molina et al., 2018a). A su vez, tanto CFTR como SLC26 necesitan ser fosforilados por PKA para inducir la alcalinización del citoplasma (Ko et al., 2004; Sorum et al., 2015), de esta manera la actividad de PKA es esencial para la regulación del pH_i (Puga Molina et al., 2017). Por último, anhidrasas carbónicas presentes en el citoplasma catalizan de manera reversible la hidratación de CO_2 a HCO_3^- ($\text{OH}^- + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) (Nishigaki et al., 2014).

La alcalinización del citoplasma ha sido correlacionada con el éxito en la FIV, se observó que aquellos pacientes con pH_i más alcalinos tenían mayor éxito en FIV (Gunderson et al., 2020). Asimismo, se observó que todos los donantes con paternidad comprobada alcalinizaban su pH_i durante la capacitación, mientras que donantes sin fertilidad comprobada presentaban distintos patrones de cambio de pH a lo largo de la capacitación (algunos acidificaban su pH_i , otros no cambiaban y unos pocos alcalinizaban) (Matamoros-Volante et al., 2020).

Finalmente, la alcalinización del pH_i está asociada a la apertura de los canales CatSper y SLO3 (Kang et al., 2021).

Potencial de membrana (Em):

La espermiogénesis concluye con la polarización morfológica del espermatozoide (Figura 1) (Eddy, 2006). Durante la capacitación el espermatozoide adquiere la movilidad HA, restringida al flagelo y la capacidad de ser inducido por un estímulo para realizar la EA, en la cabeza, siendo ambos eventos fundamentales para la fecundación (Yanagimachi, 1994a; Yanagimachi, 1994b). Aunque la célula sea morfológicamente polarizada, eventos celulares que ocurren en la cola tienen efectos regulatorios en la cabeza. Mediante la inyección de colorantes fluorescentes se observó la libre difusión de estos a lo

largo de toda la célula demostrando que ambos compartimentos, aunque morfológicamente distintos, se encuentran conectados (Navarro et al., 2007). De esta manera las vías de señalización que comienzan en un compartimento pueden afectar al otro por libre difusión de compuestos solubles como el Ca^{2+} , cambios en el pH citoplasmático y el potencial de membrana (Em).

El Em depende de la diferencia de concentración y carga iónica intracelular y extracelular. La diferencia está sujeta a la permeabilidad de la membrana plasmática la cual define el Em. La permeabilidad de la membrana a cada ion depende del gradiente establecido y del estado metabólico de la célula (Chávez et al., 2013; Rettinger et al., 2022) y los principales iones que regulan el potencial de membrana son el K^+ , el Na^+ y el Cl^- (Puga Molina et al., 2018b; Ritagliati et al., 2018). Cuando no se perturba, el balance del flujo de iones, gradientes y permeabilidad resulta en el potencial eléctrico conocido como el Em de reposo. El potencial de equilibrio de cualquier ion puede medirse mediante la ecuación de Nernst. En particular, durante la CAP el Em en espermatozoides sigue la dinámica del K^+ (Chávez et al., 2013). El flujo de iones a través de la membrana debe ser mediado por transportadores ya que los lípidos presentes en la membrana generan un ambiente hidrofóbico que impide el flujo de cargas. Los transportadores se dividen en dos grandes categorías: 1) de transporte pasivo a favor del gradiente electroquímico, canales; 2) transporte activo que a su vez puede ser dividido en dos categorías, el transporte activo primario contra el gradiente, en esta categoría entran las bombas ATPasas, o activo secundario donde el cotransporte de un ion de igual carga, antiporter, o de distinta carga, sinporter, permite el pasaje de cargas sin gasto energético (Rettinger et al., 2022).

Durante la capacitación, el ingreso de HCO_3^- , seguido de un aumento de Ca^{2+} y alcalinización del citoplasma, induce la apertura de canales de potasio específicos de espermatozoides, involucrados en la regulación del potencial de membrana (KSper), permitiendo de esta manera la salida del K^+ a favor de su gradiente electroquímico generando un balance neto negativo en el interior celular (Figura 4) (Brenker et al., 2014; Navarro et al., 2007). Se describió que a mayores concentraciones de HCO_3^- mayor porcentaje de espermatozoides se hiperpolarizan y que la hiperpolarización del Em se encuentra río debajo de la

vía AMPc-PKA (Escoffier et al., 2015). Previo a la capacitación los espermatozoides presentan un Em despolarizado (~ -35mV) (Linares-Hernández et al., 1998) y durante la capacitación, se observa una hiperpolarización del Em (~ -70mV), debido a un aumento de cargas negativas en el interior celular, llevando el Em basal al potencial de equilibrio del ion K⁺ (-90mV) (Arnoult et al., 1999; De La Vega-Beltran et al., 2012; Demarco et al., 2003; Espinosa y Darszon, 1995; Santi et al., 2010; Zeng et al., 1995). En concordancia, el espermatozoide encuentra diferentes concentraciones de iones desde el testículo hasta el tracto reproductor femenino. Por ejemplo, la concentración del K⁺ extracelular varía desde 110 mM en el ducto deferente (Hinton et al., 1981), 12-63 mM en el plasma seminal (Okamura et al., 1986; Owen, 2005) y 4.5-21 mM en fluido uterino humano (Aguilar y Reyley, 2005; Borland et al., 1977; David et al., 1973; Lippes et al., 1972; Lopata et al., 1976). Estos cambios, principalmente el del ion K⁺, se traducen en cambios en el Em del espermatozoide regulados por los Ksper (Navarro et al., 2007). Existen distintos canales permeables al potasio como los canales KNCQ1, la Na⁺/K⁺-ATPasa, SLO1 y SLO3 (Gao et al., 2021; Mcdermott et al., 2015; Ritagliati et al., 2018; Schreiber et al., 1998). Los canales Ksper, en particular el canal SLO3, tienen un rol central en esta tesis por lo que se los describirá con mayor detalle en otro apartado.

Como describimos previamente, la hiperpolarización del Em asociada a la capacitación ocurre debido a un aumento en la concentración neta de cargas negativas en el interior celular, debido a la salida de K⁺. Este fenómeno se observó en diversas especies como espermatozoides murinos, bovinos, equinos y humanos (Escoffier et al., 2012; Hernández-González et al., 2007; López-González et al., 2014; Zeng et al., 1995). Tanto en espermatozoides humanos como murinos se observó que a lo largo de la capacitación solo una subpoblación se hiperpolariza durante la capacitación (Arnoult et al., 1999; López-González et al., 2014). A su vez, el porcentaje de células que se hiperpolarizan es muy variable entre individuos en distintas muestras (Escoffier et al., 2015). A pesar de que solo una subpoblación espermática se hiperpolariza, se demostró que la hiperpolarización del Em es necesaria y suficiente para preparar a los

espermatozoides murinos para ser inducidos a realizar la EA (De La Vega-Beltran et al., 2012).

Por último, recientemente dos trabajos de manera independiente correlacionaron la hiperpolarización del Em durante la capacitación con el éxito ante la FIV (Baro Graf et al., 2020a; Calzada y Tellez, 1997; Puga Molina et al., 2020), demostrando la importancia de este evento de la fisiología espermática en la fecundación.

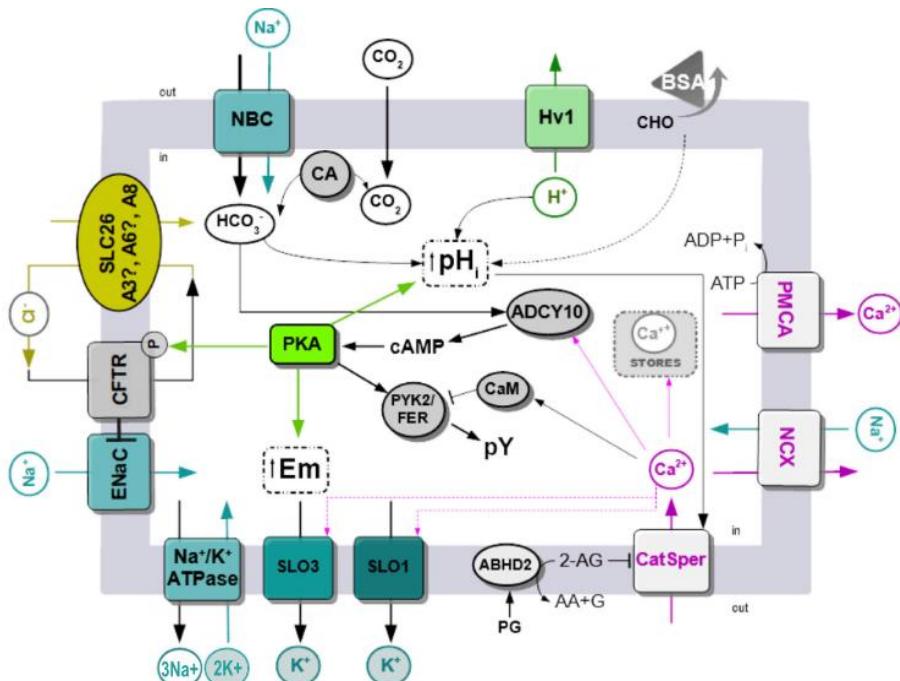


Figura 4: Modelo simplificado de vías de señalización y flujos de iones involucrados en la capacitación de espermatozoides humanos. Cuando los espermatozoides son colocados en medio capacitante, la BSA remueve colesterol (CHO) de la MP modificando sus propiedades. La sAC (AC soluble o ADCY10) es estimulada rápidamente por la acción de HCO_3^- . El HCO_3^- ingresa a la célula a través del cotransportador NBC y del anti-transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, y su incremento intracelular combinado con el eflujo de H^+ a través del transportador NHE, generan un aumento en el pH_i . La alcalinización del citoplasma activa, por un lado al canal SLO3, generando una corriente de K^+ que resulta en la hiperpolarización de la MP, y por el otro, estimula la apertura de CatSper, por donde ingresa Ca^{2+} sostenidamente. El cierre del ENaC y la activación de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, también contribuyen a la hiperpolarización. El AMPc elevado por acción de la sAC activa a la PKA, desencadenando una cascada de fosforilación. Todos estos acontecimientos, en conjunto, provocan la inducción de la hiperactivación (HA) y la exocitosis acrosomal (EA). La contribución de los canales de Cav y de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aún no están completamente esclarecidos. La bomba PMCA moviliza Ca^{2+} hacia el espacio extracelular, y participa en la homeostasis de este ion. Adaptado del review (Puga Molina et al., 2018b).

Canal de potasio específico de espermatozoides SLO3

Como se mencionó anteriormente, en espermatozoides murinos, previo a la capacitación, el Em depende de la permeabilidad de los iones K^+ , Na^+ y Cl^- , pero la hiperpolarización del Em durante la capacitación se debe principalmente a la apertura de los canales KSper (Chávez et al., 2013). En 1998, Schreiber y colaboradores reportaron un nuevo canal de K^+ dependiente de voltaje y pH_i : SLO3, de expresión específicamente testicular (Schreiber et al., 1998).

Los canales SLO, son parte de una gran familia de canales voltaje dependientes que permiten el pasaje del K^+ a favor de su gradiente, lo cual resulta en la salida de K^+ de la célula generando la hiperpolarización del Em. Lo que hace únicos a estos canales es que requieren para su apertura la acción conjunta de cambios en el Em y ciertas señales intracelulares (Salkoff et al., 2006). Existen 3 miembros de la familia SLO: SLO1 dependiente de Ca^{2+} , SLO2 dependiente de Na^+ y SLO3 dependiente del pH_i (Salkoff et al., 2006). SLO1 se expresa en diversos tejidos y se encuentra en diversas especies (Hicks y Marrion, 1998; Knaus et al., 1994; Solaro y Lingle, 1992), mientras que SLO3 solo se encontró en mamíferos y es específico de espermatozoides. Ambos canales presentan alta homología de secuencia y se propuso que en mamíferos SLO3 es el resultado de la duplicación genética de SLO1 (Santi et al., 2009). La estructura de estos canales presenta cuatro subunidades α que forman el poro y cuatro subunidades β involucradas en la regulación, a su vez presentan una estructura citosólica llamada anillo de apertura (*gating ring*), la cual responde a las señales intracelulares (Ca^{2+} o pH_i) (Figura 5) (Leonetti et al., 2012). A su vez, se describió la presencia de subunidades accesorias como LRRC52, cuya expresión depende de SLO3. Esta subunidad modula la dependencia del canal al voltaje y pH_i . Ratones LRRC52 KO presentan infertilidad severa, debido a que el canal SLO3 no puede abrirse a voltajes de Em fisiológicos (-40mV a $pH=7-8$) (Zeng et al., 2015).

En humanos el rol del canal SLO3 no se encuentra del todo esclarecido (Ritagliati et al., 2018). Existe cierta controversia sobre la presencia del canal SLO1 y SLO3 (Figura 5). El canal SLO1 se expresa en todos los tejidos, es voltaje dependiente y su apertura depende de la concentración de Ca^{2+} , mientras que el canal SLO3 se observó que es levemente voltaje dependiente y la alcalinización del pH_i

induce la apertura de éste. Mediante estudios de *patch-clamp*, Mannowetz describió que el canal Ksper en humanos era dependiente de Ca^{2+} , su corriente podía ser inhibida con inhibidores farmacológicos para SLO1 y era levemente sensible a progesterona. A partir de estos resultados propuso que el principal canal en humanos es SLO1 (Mannowetz et al., 2013). Más adelante, Brenker identificó la presencia de SLO3 y de la subunidad LRRC52 (Zeng et al., 2015), involucrada en la respuesta al pH_i, en el flagelo de los espermatozoides humanos y encontró que Cofilium, inhibidor del canal SLO3, inhibía la corriente de Ksper en humanos (Brenker et al., 2014). Asimismo, otro estudio encontró que tanto inhibidores de SLO1 como de SLO3 disminuían la corriente de Ksper en igual medida, sugiriendo que ambos canales podrían estar involucrados en la regulación del Em (López-González et al., 2014). Por otro lado, las características del canal SLO3 humano son diferentes a las descritas en espermatozoides murinos. Se observó que SLO3 humano es levemente regulado por la alcalinización del pH_i y más dependiente de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático (Brenker et al., 2014). La regulación diferencial del canal SLO3 en humanos y ratones se asemeja a lo observado en el canal CatSper, donde en espermatozoides humanos es dependiente de progesterona y no así en murinos (Miller et al., 2016). Estudios recientes donde se evaluó la conservación de la secuencia de SLO3 encontraron un polimorfismo que podría conferirle al canal SLO3 humano sensibilidad a Ca^{2+} (Geng et al., 2017). Por otro lado, algunos autores proponen que el canal Ksper en humano está compuesto por heterodímeros que comprenden tanto subunidades de SLO1 como de SLO3 (Mansell et al., 2014; Sánchez-Carranza et al., 2015). En humanos, nuestro laboratorio también identificó la presencia del canal ENaC y CFTR en espermatozoides y describió que la activación del canal CFTR, dependiente de PKA, contribuye a la hiperpolarización del Em (Puga Molina et al., 2017). Estudios recientes describieron un nuevo canal de potasio involucrado en la regulación del Em, el canal KCNQ1 (Gao et al., 2021).

Por otro lado, mediante la generación del ratón deficiente del canal SLO3, (depleción de los dos primeros exones codificantes o el exón 27 del gen SLO3/KCNU1), dos trabajos independientes demostraron que este canal es el principal involucrado en la hiperpolarización del Em durante la capacitación. A

su vez, demostraron la dependencia del pH_i del canal y encontraron que estos espermatozoides tienen defectos en la movilidad progresiva, no inducen la EA cuando se los enfrenta con un ionóforo de calcio, y presentan una osmorregulación defectuosa (presencia de morfología tipo horquilla). La FIV se encuentra severamente afectada, cuando se incuban a los espermatozoides con oocitos con o sin *zona pellucida*. No se obtuvieron crías de los apareos entre hembras WT con ratones KO, por lo que estos ratones son infértils (Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011). A su vez, Santi y colaboradores observaron que la inducción farmacológica de la hiperpolarización del Em con Valinomicina, un ionóforo de K⁺, permite a espermatozoides SLO3 KO inducir la EA cuando se los trata con A23187 (ionóforo de Ca²⁺), demostrando la relevancia de la hiperpolarización mediada por SLO3 en la EA. En este sentido, trabajos de nuestros colaboradores demostraron que la hiperpolarización del Em es necesaria y suficiente para que espermatozoides murinos induzcan la EA, al inducir la hiperpolarización del Em en espermatozoides no capacitados con agentes farmacológicos como la Valinomicina, el Amiloride o la Genisteína. Los autores proponen que el ingreso de HCO₃⁻ mediado por CFTR u otros canales, induce una hiperpolarización transiente del Em que es necesaria para que se active el canal sNHE, se induzca la alcalinización del pH_i necesaria para la activación de CatSper y de SLO3, induciendo la hiperpolarización del Em de manera estable (De La Vega-Beltran et al., 2012).

La hiperpolarización del Em se encuentra río debajo de la vía de AMPc-PKA y PKA regularía de manera indirecta el Em (Escoffier et al., 2012). Se describió que PKA activa la tirosina quinasa Src (cSrc) la cual es necesaria para la hiperpolarización del Em y subsecuente EA (Stival et al., 2015). Por otro lado, se encontró que la hiperpolarización del Em mediada por SLO3, seguida de una despolarización, es necesaria para la entrada de Ca²⁺ por CatSper (Chávez et al., 2014). Recalcando la importancia de este canal en los dos eventos fundamentales para la fecundación, la HA y la EA.

En esta tesis estudiaremos la relevancia del potencial de membrana en la regulación de la exocitosis acrosomal tanto en estudios *in vitro* e *in vivo*.

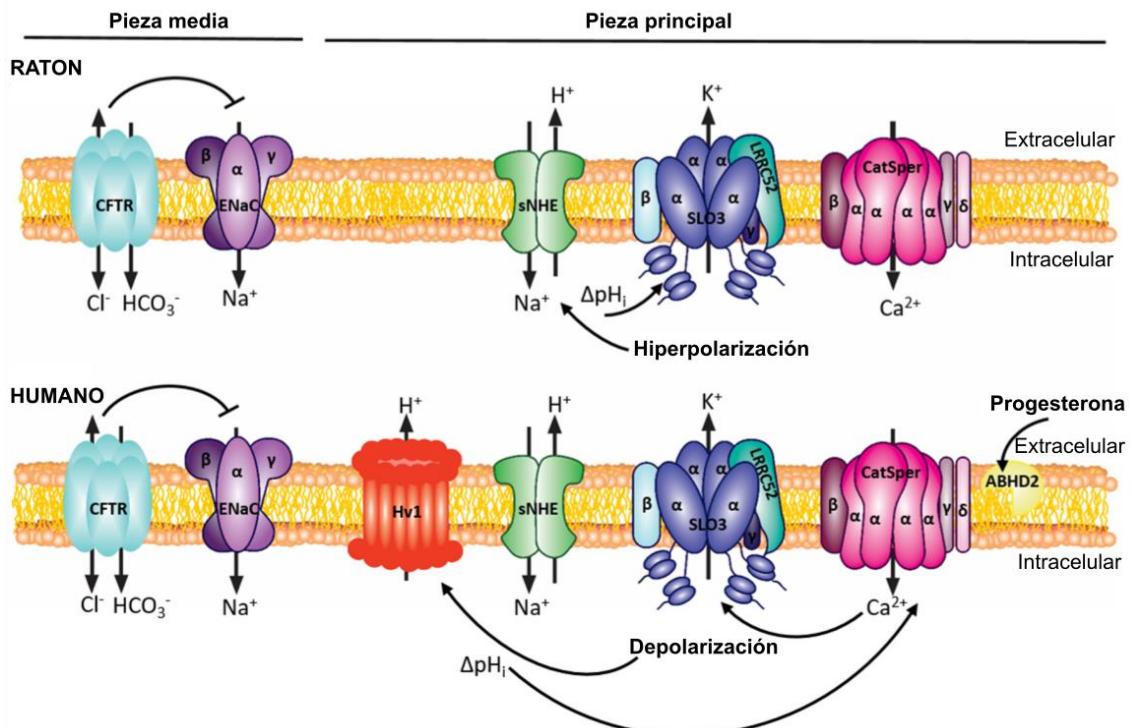


Figura 5: Modelo esquemático de los canales involucrados en la regulación del Em. Adaptada de (Ritagliati et al., 2018).

Hiperactivación

Como mencionamos previamente, el paso por el epidídimo otorga la movilidad activada a los espermatozoides. Esta movilidad se caracteriza por un batido flagelar simétrico que genera un desplazamiento lineal y progresivo (Figura 6) (Aitken et al., 2007). En 1970, Yanagimachi reportó que los espermatozoides de hámster adquirían un tipo de movilidad muy activa a medida que se los capacitaba *in vitro*. A su vez, observó que este movimiento hiper-activo se podía observar a través de la fina pared de la *ampulla oviductal* proporcionándole la movilidad necesaria al espermatozoide para llegar hasta los oocitos y atravesar las células del *cumulus* (Yanagimachi, 1970). El movimiento hiperactivado (HA) se caracteriza por presentar una gran amplitud, y asimetría en el batido flagelar. Asimismo, espermatozoides hiperactivados incubados en un medio de baja viscosidad presentan una trayectoria de movimiento circular o errático debido a la asimetría en el batido (Figura 6) (Darszon et al., 2011). En el tracto reproductor femenino, los espermatozoides entran en contacto con fluidos viscosos que tienen propiedades elásticas (fluido visco-elástico), como por ejemplo el moco cervical durante el estro (Tung et al., 2015), el fluido del oviducto (Jansen y Bajpai, 1982; Suarez et al., 1997), y la matriz del *cumulus oophorus* (CO) (Dunn

y Picologlou, 1976). El fluido visco-elástico puede reducir la velocidad del nado de los espermatozoides y a su vez, modificar la trayectoria del nado al afectar el batido flagelar. Suarez demostró en ensayos *in vitro* donde utilizó un fluido visco-elástico artificial, que tanto los espermatozoides HA de hámster y de ratón presentaban trayectorias de nado lineales a diferencia de lo observado en medios acuosos (Figura 6) (Suarez y Dai, 1992; Suarez et al., 1991).

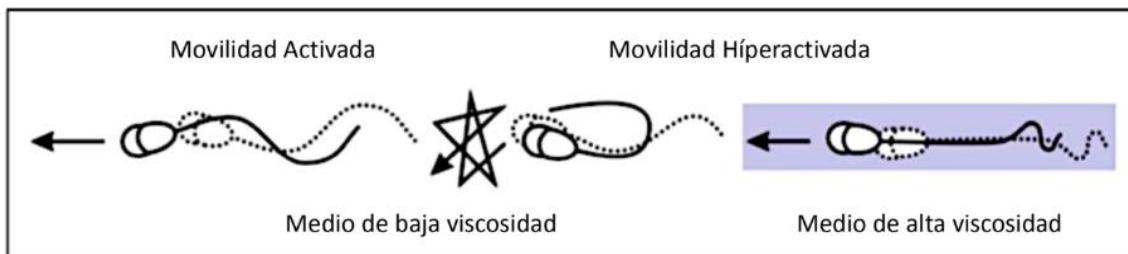


Figura 6. Movilidad hiperactivada. En un medio de baja viscosidad la movilidad activada se caracteriza por un batido flagelar simétrico que genera un desplazamiento progresivo, mientras que la hiperactivada, por un batido asimétrico y un desplazamiento circular o errático. En un medio de alta viscosidad, la hiperactivación resulta en un desplazamiento progresivo más eficiente. Tomado y modificado de (Darszon et al., 2011).

La movilidad HA es necesaria para que los espermatozoides logren desprenderse de las células epiteliales del *isthmus* (Figura 7) (Demott y Suarez, 1992). Se presume que esta característica visco-elástica del *cumulus* permitiría a los espermatozoides HA atravesarlo. Asimismo, la zona *pellucida* fue caracterizada como visco-elástica (Kiim y Kim, 2013).

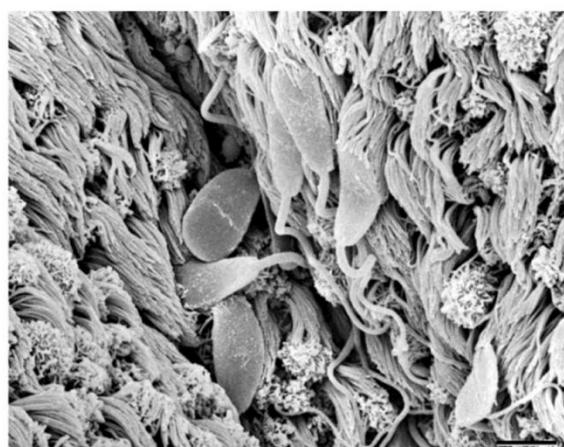


Figura 7: Espermatozoides de toro interactuando con las cílias de las células epiteliales del *isthmus*. Microscopía electrónica de barrido del isthmus oviductal. Espermatozoides se encuentran localizados en los surcos entre los pliegues secundarios de la mucosa oviductal. Tomado de (Lefebvre et al., 1995).

Durante la capacitación el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular modula la movilidad espermática y está asociado a la HA (Lishko et al., 2012). Se observó que niveles bajos de Ca^{2+} (10-40 nM) son necesarios para la movilidad espermática activada, pero durante la capacitación un aumento en los niveles de Ca^{2+} (100-300 nM) es requerido para la movilidad HA (Suarez, 2008b; Suarez et al., 1993). El Ca^{2+} actúa uniéndose a calaxinas las cuales inhiben la actividad de las dineinas en el axonema, resultando en un batido de alta amplitud y asimétrico (Shiba et al., 2008). La generación de ratones KO evidenció la relevancia de la regulación de este ión en la adquisición de la movilidad HA, como por ejemplo el ratón KO para el canal PMCA4b (Okunade et al., 2004; Schuh et al., 2004); ratones deficientes en la subunidad α_{1E} del canal $\text{CaV}2.3$ (Sakata et al., 2002); y el canal de Ca^{2+} específico de espermatozoides CatSper, cuyos espermatozoides KO para este canal son infértils (Quill et al., 2003; Ren et al., 2001). La apertura de CatSper, el principal canal de Ca^{2+} en espermatozoides, depende débilmente del voltaje pero fuertemente de la alcalinización del pH_i (Kirichok et al., 2006; Lishko et al., 2010) y en humanos, es dependiente de numerosos ligandos presentes en el fluido oviducal (Brenker et al., 2012; Tavares et al., 2013), como la progesterona (Prog) (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011). Recientemente también se identificó que la vía AMPc-PKA regula positivamente a CatSper (Orta et al., 2018). Avances en microscopía de súper-resolución permitieron evidenciar la disposición cuadrilateral de CatSper a lo largo de la pieza principal (Figura 8) (Chung et al., 2014; Chung et al., 2017). La distribución de CatSper determina la localización de otras proteínas involucradas en la capacitación como ser las proteínas fosforiladas en Tyr, las cuales se observan normalmente confinadas al axonema del flagelo. La disrupción de CatSper provoca la deslocalización de las mismas, sugiriendo que existe una conexión funcional entre las dos vías de señalización principales de la capacitación espermática (Chung et al., 2014). Estudios recientes mostraron que durante la capacitación CatSper1 sufre una degradación dependiente del influjo de Ca^{2+} y se encuentra asociada a la cascada de fosforilación de proteínas. Espermatozoides que presentan CatSper1 degradado correlacionan con la pY, en espermatozoides capacitados *in vitro* e *in vivo*. Por último, utilizando un modelo ex vivo, encontraron que aquellos espermatozoides que

atravesaron la unión útero-tubárica (UTJ) presentan CatSper1 intacto, demostrando que la presencia del canal intacto es indispensable para el tránsito de los espermatozoides a través de la UTJ hasta la *ampulla* (Ded et al., 2020).

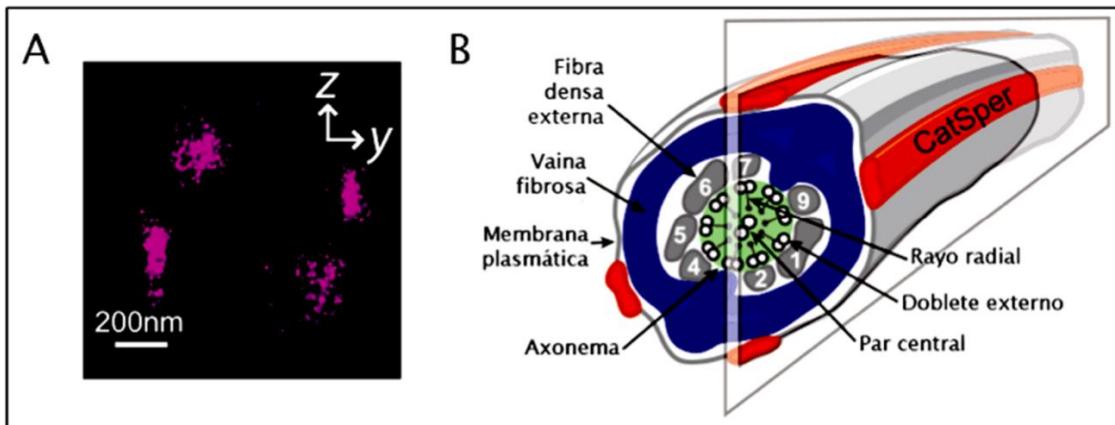


Figura 8. Localización del canal CatSper. A) Imagen representativa de microscopía 3D STORM (three-dimensional stochastic optical reconstruction microscopy). Se pueden observar los cuatro dominios de CatSper δ (proyección y-z) en una sección transversal del inicio de la pieza principal. B) Esquema del flagelo del espermatozoide donde se observa localización de los canales CatSper (rojo) en su arreglo lineal, y la posición relativa respecto de los elementos del citoesqueleto. Tomado y modificado de ((Chung et al., 2014)).

Finalmente, no se puede descartar la participación de la movilización de Ca^{2+} de los reservorios (el acrosoma, el ENR y las mitocondrias) ya que se ha reportado que la liberación de Ca^{2+} de los reservorios induce la movilidad HA (Achikanu et al., 2018; Alasmari et al., 2013; Mata-Martínez et al., 2021).

Exocitosis Acrosomal

La exocitosis acrosomal (EA) fue reportada por primera vez en 1952 en espermatozoides de erizo de mar (Dan, 1952), y rápidamente fue reconocida como un prerequisito para la fecundación (Austin y Bishop, 1958). Es un proceso de secreción regulada muy particular ya que a diferencia de otros procesos exocíticos: se secreta una única vesícula granular por célula; no existe reciclaje de la membrana; existen múltiples sitios de fusión entre la MAE y la MP; y es un proceso irreversible (Mayorga et al., 2007). Inicialmente se consideraba a la EA como una reacción binaria donde se parte de espermatozoides intactos y se obtienen espermatozoides reaccionados, pero una gran cantidad de estudios

comenzó a describir a la exocitosis acrosomal como un continuo, el cual comienza con la capacitación espermática (Figura 9) (Kim y Gerton, 2003).

Al igual que todo proceso de exocitosis, requiere la movilización de Ca^{2+} e involucra la activación de la maquinaria de fusión (Figura 9) (proteínas SNARE (De Blas et al., 2005), Rab3A (Lopez et al., 2007), a-SNAP (Rodríguez et al., 2011), NSF (Tomes et al., 2005), complexin (Roggero et al., 2007; Zhao et al., 2007), la proteína de unión a calcio synaptotagmin (Hutt et al., 2005; Michaut et al., 2001), calmodulin (Yunes et al., 2002) y dynamin (Reid et al., 2012)). A su vez, la EA depende del segundo mensajero AMPc, el cual interactúa con el intercambiador proteico directamente activable por AMPc (Epac) (Branham et al., 2006) activando la maquinaria de fusión e induciendo la movilidad de Ca^{2+} del acrosoma (Lucchesi et al., 2016). Resultados recientes, encontraron que la inducción de Epac con un análogo de AMPc induce un aumento de Ca^{2+} en la región de la pieza media que se propaga en forma de ondas, gatillando de esta manera la EA (Mata-Martínez et al., 2021). Una vez finalizada la EA, la cabeza del espermatozoide presenta un nuevo límite celular, la MAI, que se continúa con la MP (Figura 9) (Yanagimachi, 1994a). Estas alteraciones en la topología y composición de la membrana limitante son fundamentales para la interacción con la gameta femenina ya que se expone el segmento ecuatorial por el cual el espermatozoide se fusiona con el oolema (Ikawa et al., 2010; Inoue et al., 2011). Se ha descrito que durante la EA existe una movilización de ciertas proteínas esenciales para la fusión, como por ejemplo IZUMO1, la cual se localiza en la membrana acrosomal y relocaliza al segmento ecuatorial donde cumple su función como parte del complejo de fusión al oocito (Brukman et al., 2023; Inoue et al., 2005; Sosnik et al., 2009). La EA es un evento fundamental para la fecundación ya que alteraciones tanto en la formación del acrosoma como en su secreción llevan a la infertilidad o una subfertilidad severa (Dam et al., 2007; Kang-Decker et al., 2001; Lin et al., 2007).

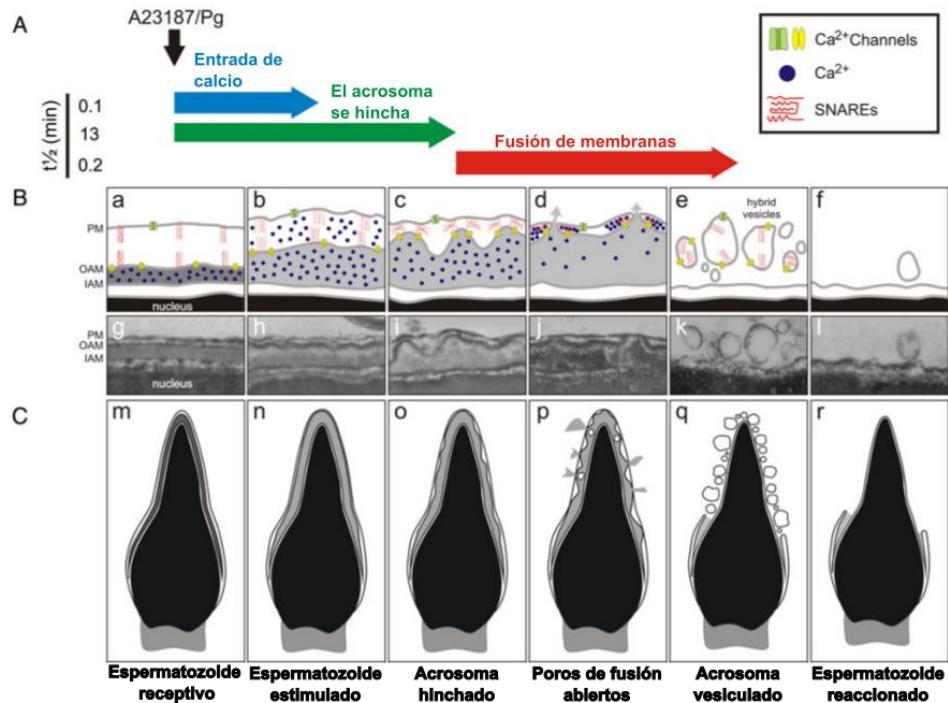


Figura 9: Modelado de la cinética de la AE. Espermatozoides receptivos (capacitados) sufren un aumento rápido del calcio citosólico el cual induce que se hinche el acrosoma. Eventualmente, la membrana acrosomal externa (OAM) se ancla a la membrana plasmática (PM). El aumento de Ca^{2+} causado por la apertura de canales en la OAM en la vecindad de la maquinaria de fusión, lleva a la apertura de los poros de fusión, conectando el compartimento extracelular con el lumen acrosomal. La expansión de estos poros lleva a la vesiculización del acrosoma. El tiempo medio para cada proceso se muestra en (A). Los cambios especulados en la topología de la membrana fueron ilustrados (B). Imágenes de microscopía electrónica representativas de cada paso se muestran en el panel inferior. Se muestran los cambios morfológicos que ocurren en la cabeza del espermatozoide durante la exocitosis (C). Modificado de (Sosa et al., 2015).

Como mencionamos, la EA es una secreción altamente regulada dependiente de Ca^{2+} y es gatillada en presencia de inductores, fisiológicos o farmacológicos (Buffone et al., 2014). Los ionóforos de Ca^{2+} (como el A23187 o la ionomicina) y los inhibidores de la calcio-ATPasa (SERCA; como la tapsigargina) que promueven la salida de Ca^{2+} de los reservorios, han sido ampliamente usados para inducir la EA en espermatozoides capacitados de manera farmacológica (Herrick et al., 2005; Rossato et al., 2001), mientras que proteínas de la zona pellucida (ZP) (Gupta y Bhandari, 2011; Marín-Briggiler et al., 2008; van Duin et al., 1994), GABA (Shi et al., 1997), glicina (Bray et al., 2002), péptido natriurético (Zamir et al., 1995), ATP (Torres-Fuentes et al., 2015), y la progesterona (Harper et al., 2008; O'Toole et al., 1996; Sánchez-Cárdenas et al., 2014b; Selvaraj et al., 2007) han sido utilizados como inductores fisiológicos (Figura 9). Existe un

porcentaje de la población de espermatozoides que realizan la EA de manera espontánea (10-20%), en ausencia de inductores en medio de cultivo. Los oocitos de mamíferos están rodeados de una matriz extracelular conocida como ZP (Figura 10) (Wassarman y Litscher, 2008). Esta matriz permite la comunicación entre ovocitos y células foliculares durante la ovogénesis, está involucrada en el reconocimiento y unión al espermatozoide, bloqueo de la polispermia y en la protección del embrión previo a la implantación (Benoff, 1997; Dean, 2004; Hoodbhoy y Dean, 2004; Sinowitz et al., 2001; Wassarman y Litscher, 2008; Yanagimachi, 1994a). La ZP está compuesta por glicoproteínas, su composición varía entre especies (Bleil y Wassarman, 1980; Ganguly et al., 2008; Goudet et al., 2008; Hedrick y Wardrip, 1987; Lefèvre et al., 2004). En la especie murina, la ZP está compuesta por tres glicoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3 (Figura 10) (Bleil y Wassarman, 1980). ZP4 está presente en el genoma murino como un pseudogen (Lefèvre et al., 2004). En humanos, las cuatro ZPs se encuentran presentes y funcionales (Gupta et al., 2009). Estas glicoproteínas son sintetizadas exclusivamente por el ovocito (Bleil y Wassarman, 1980). Se postuló que ZP1 (y ZP4 en humanos) provee de estructura 3D uniendo filamentos formados por heterodímeros de ZP2-ZP3, dando estabilidad y estructura a la ZP (Figura 10) (Greve y Wassarman, 1985). ZP2 une únicamente espermatozoides reaccionados, por lo que se le asignó el rol de unión secundario al espermatozoide (Bleil et al., 1988; Chakravarty et al., 2005; Chakravarty et al., 2008). A su vez, luego de la fecundación ocurre la exocitosis de gránulos corticales, la cual modifica la matriz de la ZP, particularmente por el clivaje de ZP2, evitando de esta manera la polispermia (Moller y Wassarman, 1989). La ZP3 solo en su forma solubilizada, donde se pierde la estructura conformacional nativa, se une específicamente a la región acrosomal e induce la EA tan eficazmente como el ionóforo de Ca^{2+} (Bleil y Wassarman, 1983; Litscher et al., 2009). En espermatozoides murinos, los receptores para la glicoproteína ZP3 se localizan sobre la región anterior de la cabeza del espermatozoide (Patrat et al., 2000) y se encuentran acoplados a proteínas G (Gi1 como Gi2), fosfolipasa C y tmACs (Xia y Ren, 2009). Esta vía empleada por ZP puede activar a los receptores de IP3 (IP3R) que al ser estimulados con IP3 promueven la liberación de Ca^{2+} desde el compartimiento acrosomal (Walensky y Snyder, 1995). Después de la activación inicial de señales que ocurre al momento del contacto

con las cubiertas del ovocito, existe un influjo sostenido de Ca^{2+} extracelular que es requerido para que ocurra la EA en el espermatozoide de ratón (O'Toole et al., 2000). Por muchos años, se postuló que los espermatozoides intactos debían unirse a la ZP, lo cual gatillaba la EA, se liberaba el contenido de la matriz acrosomal permitiendo de esta manera que los espermatozoides atravesen la ZP y puedan luego unirse al oocito (Saling, 1989; Saling et al., 1979). Este postulado derivó de numerosos estudios *in vitro* donde se utilizó ZP solubilizada a fines de estudiar este fenómeno (Cherr et al., 1986; Florman y Storey, 1982; Storey et al., 1984). Los resultados indicaban que, entre las glicoproteínas que conforman a la ZP, ZP3 era el principal inductor de la EA en espermatozoides de humano y ratón (Gupta y Bhandari, 2011). Sin embargo, al utilizar ZP intactas, Baibakov y colaboradores encontraron que la unión a la ZP no era suficiente para inducir la EA. En este trabajo ellos postularon que el pasaje por poros pequeños induciría la EA y no la interacción con las glicoproteínas, lo que se conoce como modelo mecano sensorial (Baibakov et al., 2007). Trabajos más recientes mostraron que los espermatozoides murinos inducen la EA antes de contactar la ZP (Jin et al., 2011). Estas observaciones trajeron consigo nuevas preguntas, cómo por ejemplo: 1) Cuál es la identidad del inductor fisiológico?; 2) Dónde ocurre la EA?; 3) Cuál es el rol de la EA y de los componentes de su matriz?

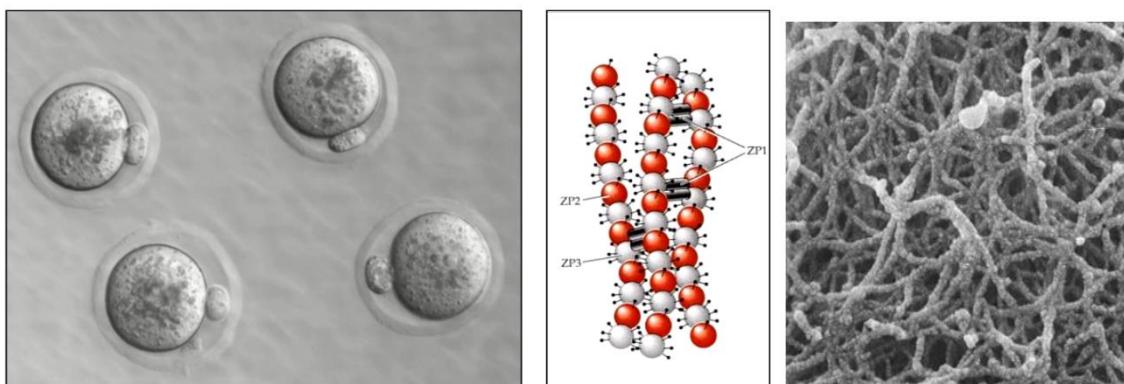


Figura 10: Zona pellucida (ZP). Ovocitos rodeados por la ZP (izquierda). Modelo de la estructura de la ZP murina (tomado de Wassarman, 1992) (medio). Microscopía electrónica de barrido de la ZP humana (tomado de (Familiari et al., 2006))

Ante la búsqueda de un posible inductor fisiológico de la EA es que comienza a tomar relevancia la hormona esteroidea Progesterona (Prog). Esta hormona

tiene un rol en la quimioatracción de espermatozoides al sitio de fecundación (Guidobaldi et al., 2008; Guidobaldi et al., 2017), induce el influjo de Ca^{2+} en espermatozoides (Publicover et al., 2007), gatillando respuestas fisiológicas esenciales para fecundación como la HA y la EA (Uhler et al., 1992). Existen tres fuentes de progesterona en el sistema reproductor femenino: 1) el cuerpo lúteo en el ovario produce altas cantidades de progesterona transportada al fluido oviductal por la vena ovárica y luego mediante la arteria uterina al oviducto (Hunter et al., 1983; Pharaon et al., 1991); 2) el epitelio oviductal (Richardson y Oliphant, 1981); 3) las células del *cumulus* que rodean al oocito luego de ser ovulado (Guidobaldi et al., 2008; Yamashita et al., 2003). La producción de Prog por las células del *cumulus* podría generar un gradiente químico desde el centro hasta la periferia y más allá del COC (Guidobaldi et al., 2008; Teves et al., 2009). La acción de Prog en la regulación génica a través de su receptor nuclear ha sido ampliamente caracterizada. Al ser los espermatozoides transcripcional y traduccionalmente silentes, la acción de Prog estaría mediada por un receptor no genómico (Thomas, 2008). En particular en espermatozoides humanos se descubrió que la Prog se une a la hidrolasa ABHD2 y su activación lleva a la depleción del endocanabinoide 2AG, el cual a su vez inhibe a CatSper. La remoción de 2AG mediada por Prog, lleva a la apertura de CatSper (Lishko et al., 2011; Miller et al., 2016). En espermatozoides murinos se describió que un aumento transitorio y específico de Ca^{2+} citoplasmático inducido por la Prog el cual se inicia en la cabeza promueve la EA, por lo tanto en espermatozoides murinos la progesterona no estaría actuando mediante CatSper (Romarowski et al., 2016a).

Como se detalló previamente, durante años se consideró que el sitio donde ocurría la EA era en contacto con la ZP, donde luego el contenido del acrosoma, rico en enzimas hidrolíticas, serviría para penetrar la ZP e ingresar al espacio peri-vitelino. La creación de ratones transgénicos que expresan EGFP en el acrosoma (Hasuwa et al., 2010) permitió por primera vez observar que la mayoría de los espermatozoides estaban reaccionados previos al contacto con la ZP (Jin et al., 2011) (Figura 11). Luego, utilizando ratones transgénicos con EGFP en el acrosoma y DsRed2 en las mitocondrias ubicadas en la pieza media del flagelo, se observó por primera vez *in vivo* la migración de los

espermatozoides a lo largo del oviducto y su estado acrosomal. Estos trabajos encontraron que la mayoría de los espermatozoides inducen la EA en los segmentos altos del *isthmus* oviductal, previo al contacto con los COCs ubicados en la *ampulla* (Hino et al., 2016; La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016).

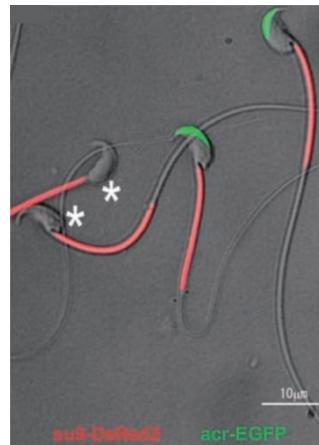


Figura 11: Espermatozoides murinos que expresan EGFP en el acrosoma (acr-EGFP) y DsRed2 en las mitocondrias (su9-DsRed2). Con asteriscos se marcan espermatozoides que realizaron la EA. Modificado de(Hasuwa et al., 2010).

En esta tesis estudiaremos el mecanismo por el cual los espermatozoides adquieren la capacidad de gatillar la EA. Asimismo, ahondaremos en el rol de la EA *in vivo*, evaluando la relevancia de su inducción en los segmentos altos del oviducto y su requerimiento para la migración dentro del tracto femenino.

Transporte espermático en el tracto reproductor femenino

Dependiendo de la especie, los espermatozoides maduros son depositados en la vagina (en humanos), cérvix (en cerdos) o directamente en el útero (en la mayoría de los roedores) (Coy et al., 2012). De millones de espermatozoides depositados en la vagina o útero solo unos cientos logran ingresar al oviducto (Yanagimachi, 1994a). De esta manera, el tracto modula la selección, supervivencia y capacitación de los espermatozoides que migren hasta el sitio de fecundación (Mahé et al., 2021). El oviducto se encuentra compuesto por la unión útero-tubárica (UTJ), *isthmus*, *ampulla* e infundíbulo, aunque trabajos recientes postulan que existe una 5 región la unión *ampulla-isthmus* (AIJ) (Figura 12) (Harwalkar et al., 2021).

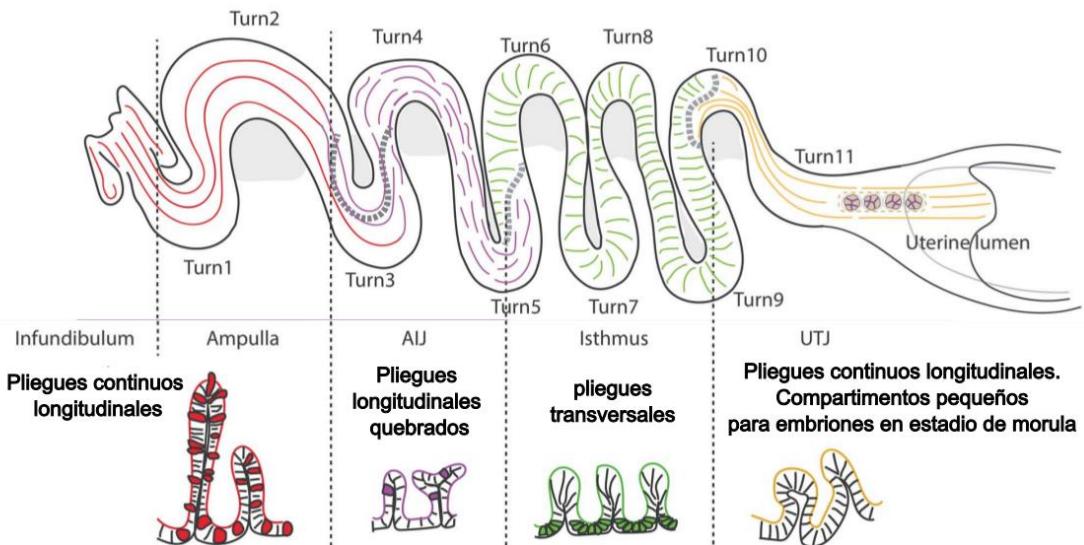


Figura 12: Diagrama del oviducto y morfología asociada a cada segmento. Se observan 5 regiones distintas, infundíbulo (región proximal al ovario), la ampolla (sitio de fecundación), AIJ: la unión ampulla-isthmus, isthmus (reservorio espermático) y UTJ: unión útero-tubárica. Tomada y modificada de Harwalkar *et al.*, 2021.

Numerosos reportes utilizando ratones transgénicos identificaron que un paso crítico a superar es el transporte a través de la UTJ, siendo esta la segunda gran barrera selectiva luego del cérvix (Figura 13) (Fujihara *et al.*, 2014; Fujihara *et al.*, 2018; Fujihara *et al.*, 2019; Larasati *et al.*, 2020). La anatomía de la UTJ varía considerablemente entre especies de mamíferos, sin embargo, en la mayoría el pasaje a través de ella es angosto y la mucosa que recubre la superficie interna forma pliegues generando un pasaje complejo. En particular, en ratón, se describió que este pasaje se encuentra más abierto cerca del momento del apareo (sin ser mucho más amplio que un espermatozoide) y luego del apareo se encuentra estrechamente cerrado (Suarez, 2016). Tanto las contracciones como la movilidad propia del espermatozoide parecerían no ser suficientes para que estos atraviesen la UTJ (Okabe, 2013). Utilizando modelos de ratones KO se describieron varios genes y sus respectivas proteínas necesarias para el pasaje a través de la UTJ, como por ejemplo Adam3. Esta proteína se encuentra normalmente en la membrana plasmática del espermatozoide. Se observó mediante la eliminación de este gen u otros genes que codifican para proteínas que interactúan con Adam3 o que sean requeridas para la correcta localización de Adam3 en la membrana, qué éstos son necesarios para atravesar la UTJ (Figura 13) (Fujihara *et al.*, 2018; Larasati *et al.*, 2020; Saint-Dizier *et al.*, 2020).

A su vez, se observó que espermatozoides de estos ratones KO tampoco son capaces de penetrar la ZP. Estos espermatozoides sí son capaces de fecundar al oocito en presencia del *cumulus* o mediante inyección intracitoplasmática (Okabe, 2015). A su vez, se encontraron otros genes cuya expresión es necesaria para el correcto transporte de los espermatozoides por la UTJ, *Ly6k*, *Pgap1* y *Lypd4*, los cuales actúan por un mecanismo independiente de *Adam3* (Fujihara et al., 2014; Fujihara et al., 2019; Ueda et al., 2007). Es necesario resaltar que todos estos ratones KO presentaban espermatozoides con morfología y movilidad normal. Otra observación que muestra la importancia de la interacción entre las células de la UTJ y los espermatozoides fue realizada por Nakanishi, a partir de ratones macho químéricos, los cuales producían una mezcla de espermatozoides KO para *Cln* (chaperona necesaria para *Adam3*) fluorescentes y WT. Cuando realizaban los apareos con estos ratones químéricos, solo los espermatozoides WT atravesaban la UTJ (Nakanishi et al., 2004). Cómo interactúan estas proteínas con las células de la UTJ, permitiendo el pasaje de espermatozoide al oviducto todavía no se conoce.

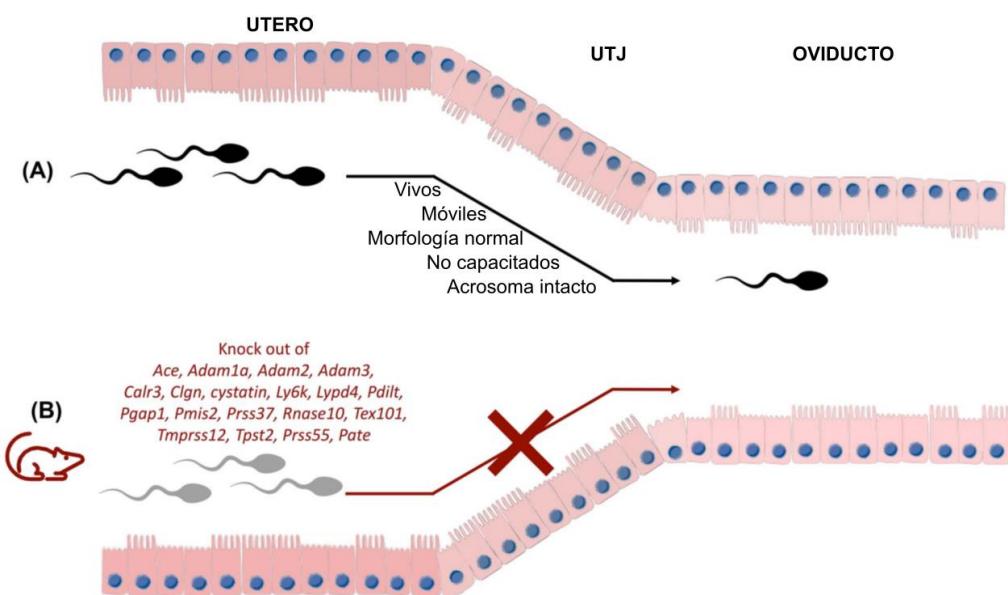


Figura 13: Selección espermática por la unión útero-tubárica (UTJ). La UTJ reduce el número de espermatozoides que llegan al *isthmus* oviductal, seleccionando la subpoblación de espermatozoides vivos, móviles, morfológicamente normales, no capacitados y con acrosoma intactos. Gracias a modelos de ratones KO, se identificaron varios genes necesarios para el pasaje por la UTJ. Modificado de (Mahé et al., 2021).

Los espermatozoides que atraviesen la UTJ migran desde la parte más baja del *isthmus* hasta la *ampulla* donde se encuentran los oocitos. Es durante el tránsito por el *isthmus* que los espermatozoides se capacitan y realizan la EA (Hino et al., 2016; La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016). En esta tesis seguiremos la segmentación propuesta por otros autores del *isthmus* (Hino y Yanagimachi, 2019; Hino et al., 2016; La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016): dividiremos al *isthmus* según su proximidad al útero, al segmento más proximal lo llamaremos *isthmus* bajo (IB), al segmento del medio *isthmus* medio (IM) y al segmento más distal al útero *isthmus* alto (IA) (a este segmento lo llaman AIU en otro trabajo (Harwalkar et al., 2021)) (Figura 14).

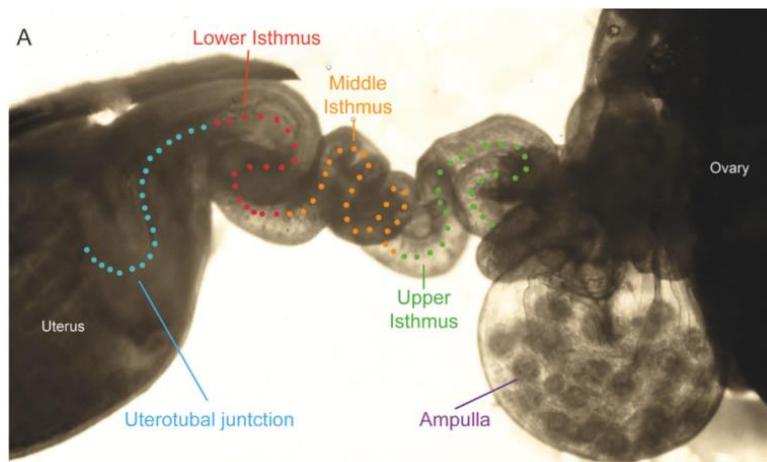


Figura 14: Imagen representativa de un cuerno uterino y del oviducto en ratón. De izquierda a derecha se observa el útero, la unión útero-tubárica (UTJ), el *lower isthmus* (*isthmus* bajo), *middle isthmus* (*isthmus* medio), *upper isthmus* (*isthmus* alto), la *ampulla* y el ovario. Tomado de (La Spina et al., 2016).

En un principio se postulaba que el oviducto era un simple conducto que transportaba a las gametas y a los embriones. Sin embargo, actualmente se sabe que es un órgano esencial para que ocurran la fecundación, el transporte y el desarrollo embrionario temprano (Holt y Fazeli, 2010; Mondéjar et al., 2012). El IB ha sido descrito como reservorio espermático en varias especies (Mahé et al., 2021). Se postula que la liberación secuencial de espermatozoides permitiría que solo una pequeña cantidad llegue hasta el sitio de fecundación en un momento determinado, reduciendo de esta manera la posibilidad de polispermia (Hunter, 1973; Hunter y Léglise, 1971). En un trabajo reciente describieron la presencia

de células multiciliadas en los pliegues del *isthmus* (Harwalkar et al., 2021). La interacción entre las células ciliadas y los espermatozoides mantienen el reservorio espermático (Figura 15) (Suarez, 2001; Suarez, 2002) y la unión de ambos tipos celulares estaría mediada por hidratos de carbono presentes en las células oviductales y proteínas tipo lectinas presentes en la cabeza del espermatozoide (Suarez, 2002). Se propusieron varios mecanismos por los cuales los espermatozoides son liberados: 1) cambios en la composición del fluido oviductal (Ardon et al., 2016); 2) cambios en el volumen del fluido oviductal (Killian, 2011); 3) contracciones peristálticas del oviducto (Ardon et al., 2016); 4) cambios transcripcionales en las células epiteliales del oviducto (López-Úbeda et al., 2015; Seytanoglu et al., 2008); 5) inducción del movimiento HA espermático (Demott y Suarez, 1992); 6) degradación del receptor de glicanos en el espermatozoide (Miles et al., 2013). Lo más probable es que la liberación de los espermatozoides sea mediante una combinación de los mecanismos propuestos. Los espermatozoides que fueron liberados se encuentran capacitados e hiperactivados, aunque no es claro si la capacitación es la que permite la liberación o si la liberación completa la capacitación. Se ha observado que la Prog podría ser la molécula que señalice la liberación del oviducto, mediando el influjo de Ca^{2+} y por ende la movilidad HA (Machado et al., 2019; Sharif et al., 2022). Curiosamente, la liberación espermática del oviducto es modulada por el ciclo estral, con mayor actividad durante el periodo peri-ovulatorio (Suarez, 2008a).

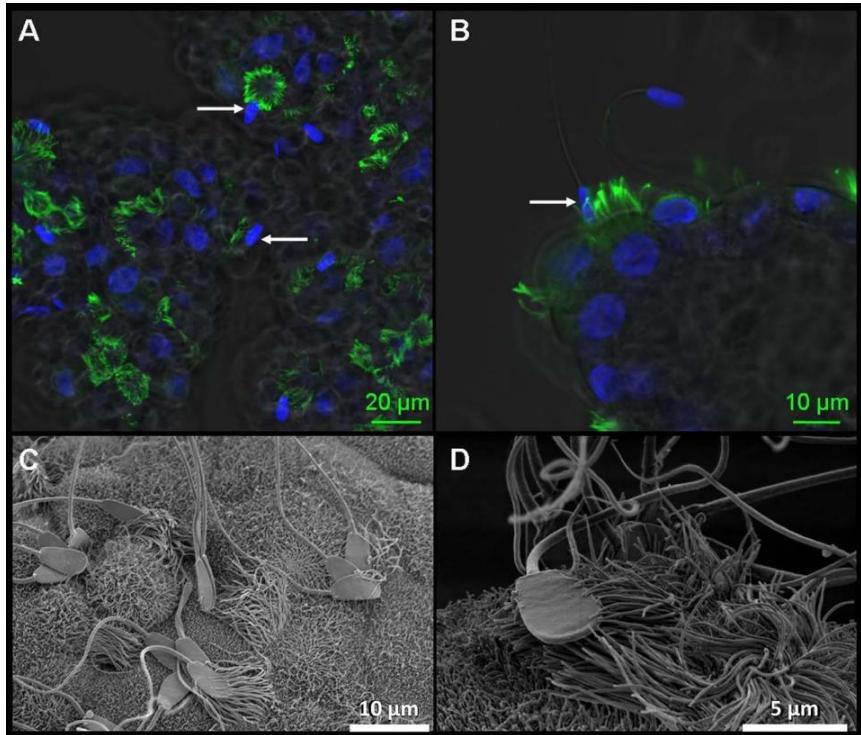


Figure 15: Imágenes de espermatozoides de toro interaccionando con células del oviducto tomadas con microscopía confocal y electrónica de barrido. A) Núcleos de las células epiteliales del oviducto y espermatozoides (flechas blancas) fueron tenidos con Hoechst (azul), las cillas fueron inmunolocalizadas utilizando un anticuerpo contra tubulina acetilada (verde). B) Mayor magnificación muestra la cabeza de un espermatozoide (flecha blanca) interaccionando con cillas. C y D) Microscopia electrónica de barrido mostrando la interacción estrecha entre espermatozoides de toro y las cillas de las células epiteliales oviductales. Tomado de (Mahé et al., 2021).

Numerosos trabajos reportaron la participación de la quimiotaxis (Teves et al., 2006) (gradiente químico de sustancias secretadas por el COC o oviducto), termotaxis (Bahat et al., 2003) (gradiente térmico, temperatura levemente mayor en la *ampulla*), y rheotaxis (Kantsler et al., 2014; Miki y Clapham, 2013) (nado en contra del flujo desde la *ampulla* hacia el *isthmus*) en el ascenso de los espermatozoides hacia la *ampulla*. Este último es poco probable debido a que el flujo en el oviducto fue demostrado que va desde el *isthmus* hacia la *ampulla* y se debe a la actividad de la peristalsis adovarica durante el periodo ovulatorio (Bianchi et al., 2021; Hino y Yanagimachi, 2019). Reportes recientes encontraron que 1) el movimiento generado por la peristalsis adovarica; 2) las secreciones y el flujo adovarico del fluido oviductal; y 3) el propio movimiento de los

espermatozoides contribuye al ascenso eficiente de los espermatozoides hacia la *ampulla* (Hino y Yanagimachi, 2019).

A pesar de que la *ampulla* es el sitio donde ocurre la fecundación (Suarez y Pacey, 2006), a diferencia del *isthmus*, poco se conoce sobre el comportamiento de los espermatozoides y la interacción que estos tienen con la pared oviductal o pliegues de la mucosa en la *ampulla in vivo*. Algunas observaciones hechas en experimentos *ex vivo* e *in vitro*, describieron patrones de movimiento flagelar y unión de espermatozoides al epitelio de la *ampulla* distinto al que se observó en el *isthmus* (Ardon et al., 2016; Chang y Suarez, 2012). Un trabajo reciente utilizando tomografía de coherencia óptica, observaron *in vivo* el comportamiento espermático en la *ampulla* y describieron una variedad de trayectorias 3D de los espermatozoides. Se observó una disminución en la velocidad espermática, la agrupación y separación de espermatozoides, siendo esta la primera evidencia *in vivo* de cooperación espermática en la *ampulla* (observaciones similares fueron realizadas *in vitro* con espermatozoides de toro (Tung et al., 2017)). Se observaron movimientos lineales y circulares en los pliegues de la mucosa y por último, mostraron que los espermatozoides se muestran móviles en presencia de los COCs (Wang y Larina, 2018).

En esta tesis vamos a estudiar cuál es el impacto de la EA sobre el transporte espermático a lo largo del oviducto y la relevancia de la hiperpolarización del Em durante la capacitación *in vivo*.

Fecundación

La fecundación es el proceso mediante el cual el espermatozoide y el oocito interactúan, se reconocen y fusionan generando un cigoto. Como describimos previamente, los espermatozoides son transportados hasta la *ampulla*, el sitio donde ocurre la fecundación. Una vez ovulados, los oocitos son captados por las fimbrias del infundíbulo hasta la *ampulla* (Siu et al., 2021). Los oocitos de mamíferos presentan dos características únicas, 1) son ovulados junto con células del *cumulus* y 2) entre la ZP y el oolema existe un espacio llamado espacio perivitelino (PVS) (Yanagimachi, 2022). Las células del *cumulus* proveen de nutrientes al oocito en crecimiento, a estas células junto a la matriz secretada se las denomina *cumulus oophorus* (CO). Aunque en ausencia del CO hay

fecundación, su presencia parecería aumentar las chances de una fecundación exitosa (Tanghe et al., 2002). Se cree que la expansión del CO llena el lumen de la *ampulla*, atrapando a los espermatozoides (Bedford y Kim, 1993). A su vez, las células del CO secretan Prog, la cual podría inducir la EA. La presencia de una matriz viscosa en el CO podría prevenir la rotación del oocito debido al batido vigoroso del flagelo del espermatozoide al penetrar la ZP. Asimismo, este medio viscoso que rodea al flagelo podría proveer la potencia de empuje necesaria para que la cabeza del espermatozoide atraviese la ZP (Drobnis et al., 1988b).

Una vez que atravesaron el CO, los espermatozoides se encuentran con una segunda barrera, la ZP (Figura 10). Como describimos previamente la ZP es una matriz glicoproteica, compuesta por filamentos de ZP2-ZP3 unidos por ZP1. La presencia de ZP, mediado por el clivaje de ZP2 por ovastasin (Burkart et al., 2012), evitaría la polispermia (Gupta y Bhandari, 2011). Ademas, la ZP es importante durante el desarrollo embrionario temprano, manteniendo la integridad del embrión, evitando que los blastómeros se adhieran al epitelio del *isthmus* y se degraden (Yanagimachi, 2022). Se postula que los espermatozoides que realizaron la EA atraviesan la ZP mediante procesos mecánicos, realizando un corte en la ZP con la cabeza (Drobnis et al., 1988a), y enzimáticos, mediante enzimas presentes en la matriz acrosomal (Yanagimachi, 2022). El proceso enzimático es controversial ya que novedosos trabajos demostraron que los espermatozoides realizan la EA previo al contacto con la ZP (Hino et al., 2016; Jin et al., 2011; La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016). A su vez, la proteasa acrosomal Acrosina, necesaria para la fecundación en hámster, no es indispensable en ratones ya que, en su ausencia, los animales son fértiles (Baba et al., 1994; Hirose et al., 2020). Por todo ello, aún no está completamente establecido cuál es el rol de las proteínas presentes en la matriz acrosomal durante la fecundación.

La cabeza de los espermatozoides de mamíferos debe reubicarse en el PVS de manera de contactar a la MP del oocito con el segmento ecuatorial. De esta manera, los espermatozoides solo adquieren la capacidad fecundante una vez realizada la EA y expuesto el segmento ecuatorial (Yanagimachi, 1994a). Como se mencionó anteriormente, la relocalización de IZUMO1 y SPACA6 al segmento ecuatorial durante la EA es esencial para la fusión de las gametas (Inoue et al.,

2005; Noda et al., 2020). Tanto IZUMO1 como SPACA6 se encuentran involucrados en la adhesión y fusión al oocito. Bianchi en el 2014, encontró el receptor para IZUMO1 en el oocito, JUNO (Bianchi et al., 2014) (Figura 16). La expresión de JUNO en el oocito cae rápidamente luego de la fecundación, se observó que JUNO se desprende del oolema en vesículas extracelulares (Bianchi et al., 2014). Su rápida remoción previene la polispermia. A su vez, la interacción entre IZUMO1-JUNO es promiscua, espermatozoides humanos no son capaces de penetrar la ZP de hámster, pero sí pueden fecundar oocitos libres de ZP (Inoue et al., 2005). Otra proteína expresada por el oocito, necesaria para la fusión, es CD9 (Chen et al., 1999). Espermatozoide y oocito son capaces de unirse en ausencia de CD9 pero no de fusionarse (Miyado et al., 2000). En los últimos años se identificaron numerosos factores involucrados en el proceso de adhesión y fusión de las gametas: SPACA6, TMEM95, SOF1 (Noda et al., 2020), FIMP (Fujihara et al., 2020), y DCST1/DCST2 (Inoue et al., 2021) (Figura 16). A pesar de la identificación de estos factores, todavía se desconoce la identidad del fusógeno espermático (Siu et al., 2021), aunque un nuevo trabajo propone que IZUMO no solo participa en la adhesión de las células sino también en la fusión de las mismas (Brukman et al., 2023).

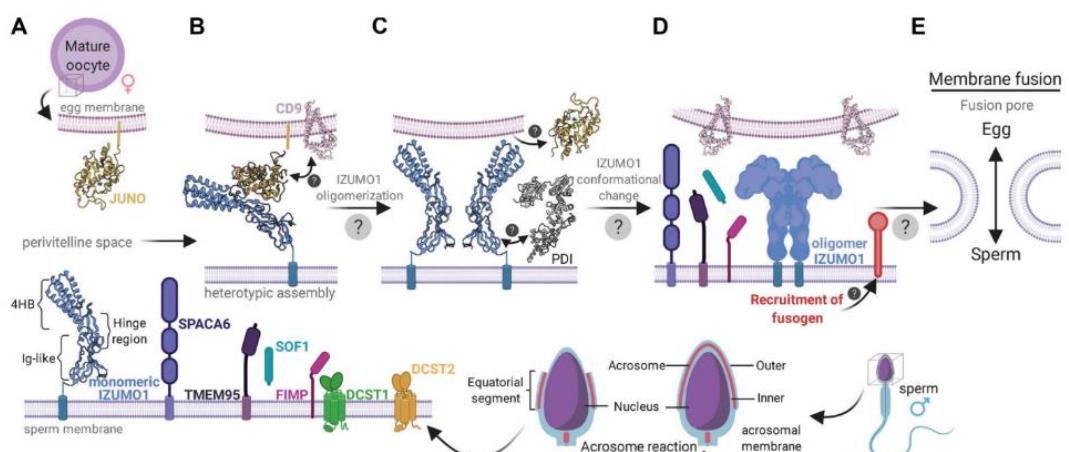


Figure 16: Modelo de unión y fusión espermatozoide-oocito. A) Despues de la EA, IZUMO (azul), SPACA6 (purpura) y TMEM95 (violeta) se relocalizan al segmento ecuatorial. FIMP (rosa) parecería tener un rol previo a la EA. La interacción entre TMEM95 e IZUMO1 es controversial. SOF1 (turquesa) es secretada y DCST1 (verde) y DCST2 (naranja) son proteínas de membrana, las cuales regulan la estabilidad de SPACA6. B) Unión incial. JUNO (amarillo), ubicada en la MP de oocito reconoce y une a IZUMO1, llevando a la acumulación de CD9 (rosa) en la interfase espermatozoide-oocito, generando anclaje lo que mantiene la proximidad entre las gametas. C) IZUMO1 multimeriza, mediado por PDI (gris) y JUNO se desprende del oolema al espacio perivitelino luego de la fecundación. D) Reclutamiento del complejo fusogénico. E) Formación del poro de fusión. Tomado de(Siu et al., 2021).

La fusión de ambas gametas resulta en la transferencia del ADN paterno (pronúcleo paterno), en algunas especies el espermatozoide también aporta la fosfolipasa Czeta1 (PLC ζ) y el centrosoma. La PLC ζ es el factor que induce la activación ovocitaria (Parrington et al., 2019; Swann y Lai, 2016). Esta activación es un proceso que comprende desde la reiniciación y finalización de la meiosis, hasta el comienzo del primer ciclo de divisiones mitóticas del cigoto (Stricker, 1999) y se manifiesta inmediatamente por grandes incrementos oscilatorios de la $[Ca^{2+}]_i$ (Swann y Lai, 2016). El centrosoma paterno se encuentra involucrado en la reorganización de microtúbulos que permite la singamia de los pronúcleos femenino y masculino (Avidor-Reiss et al., 2019; Palermo et al., 1997; Terada et al., 2010). La observación de 2 pronúcleos es la evidencia más temprana del proceso de fecundación y formación del cigoto. Luego de la fecundación, los embriones preimplantacionales viajan desde la *ampulla* hacia el útero, donde deberán implantarse (Kölle et al., 2020; Moore et al., 2019).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Objetivo:

Estudiar los mecanismos moleculares inducidos por cambios en el potencial de membrana (Em) asociados a la capacitación (CAP) en espermatozoides de mamíferos, y su relevancia en la fisiología de la fecundación de mamíferos.

Hipótesis:

La hiperpolarización del Em induce cambios en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ que permiten la inducción de la exocitosis acrosomal (EA) tanto *in vitro* como *in vivo*. A su vez, la hiperpolarización es necesaria para que los espermatozoides desarrollen la movilidad hiperactivada (HA) y de esta manera logren despegarse de las células epiteliales del oviducto, migren a través tracto reproductor femenino y sean capaces de fecundar al oocito.

CAPÍTULO I:
LA HIPERPOLARIZACIÓN DEL POTENCIAL DE
MEMBRANA ELIMINA LAS OSCILACIONES DE CALCIO
QUE INHIBEN LA EA EN ESPERMATOZOIDES
HUMANOS.

Materiales y Métodos

Reactivos:

Pisum sativum (PSA), albúmina sérica bovina (BSA) A7906, ionóforo de Calcio (Ca^{2+}) A23187, progesterona (Prog), cloruro de potasio (KCl), anti- β -Tubulina T4026, plurónico F-127, fueron comprados en Sigma (St. Louis, MO, USA); anti-fosfotirosina (pY) clon 4G10 en Millipore Corporation (Temecula, CA, USA). Valinomicina, Amiloride y Ionomicina de Cayman Chemicals, (Ann Arbor, MI, USA). Ioduro de Propidio (IP) fue comprado en Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). DiSC₃(5), FM4-64, Fluo-4 AM, Hoechst 33342 y peroxidasa de rábano-conjugada (HRP) a anti-mouse IgG de Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Vectashield fue comprado en Vector (Newark, CA, USA). Los reactivos fueron disueltos en: IP, Hoechst y PFA en agua destilada; PSA y hialuronidasa en PBS; A23187, DiSC₃(5), Prog, Amiloride, Ionomicina y Valinomicina en DMSO.

Medio de cultivo para espermatozoides:

El medio no capacitante (NC) utilizado fue el fluido tubárico humano (HTF) tamponado con HEPES. HTF contiene KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 0,3 mM, NaCl 90,7 mM, MgSO_4 1,2 mM, Glucosa 2,8 mM, CaCl_2 1,6 mM, Piruvato de Sodio 3,4 mM, Lactato de Sodio 60 mM, HEPES 23,8 mM. El medio NC fue suplementado con 0,5% p/v BSA cuando las incubaciones fueron de 6 hs. Para medios capacitantes (CAP), se agregó 25 mM de NaHCO_3 y 0,5% p/v BSA. Cuando fue necesario utilizar medios con alta concentración de K^+ , se agregó 70 mM de KCl (Alto K^+) y la osmolaridad fue ajustada reduciendo de manera equivalente la concentración de NaCl. En todos los casos, el pH del medio fue ajustado a 7,4 con NaOH.

Capacitación espermática:

Las muestras de semen fueron obtenidas por masturbación de 17 donantes sanos luego de 2-5 días de abstinencia y se analizaron siguiendo las recomendaciones de la OMS. Todas las muestras utilizadas cumplían con los parámetros de normalidad (volumen total del fluido, concentración espermática, movilidad, viabilidad y morfología) establecidos por la OMS. Volumen mínimo total 1.5 ml, concentración mínima espermática de 15×10^6 espermatozoides/ml,

movilidad igual o mayor al 40%, viabilidad mayor o igual a 58%, morfología igual o mayor al 4% (World Health Organization, 2010). Las muestras fueron consideradas con parámetros seminales normales (normozoospérmicas) cuando presentaron una concentración mayor o igual a 15×10^6 de espermatozoides/ml y una movilidad total mayor o igual al 40% (WHO, 2010). El volumen del eyaculado se determinó mediante la utilización de un tubo cónico de 15 ml graduado, la concentración y movilidad utilizando la cámara de Makler (SEFI Medical Instruments Ltd, Haifa, Israel), y la viabilidad utilizando una coloración supravital con eosina Y (0,5% (p/v) en solución fisiológica). Para la determinación de la viabilidad, se colocaron en un portaobjetos 5 μl de semen y 5 μl de eosina Y. Rápidamente, se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio de campo claro. Aquellos espermatozoides que incorporaron el colorante fueron considerados muertos, mientras que los espermatozoides no coloreados fueron considerados vivos. Se contaron 200 espermatozoides por duplicado y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos. Para la cuantificación de la movilidad y la concentración se colocó una alícuota de 10 μl de la suspensión de espermatozoides, se registraron al menos 4 campos microscópicos y 200 espermatozoides para cada condición.

Para separar los espermatozoides móviles, primero se dejó licuar la muestra de semen por 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se separaron los espermatozoides móviles por la técnica de *Swim-up* (SU), brevemente se depositó la muestra de semen en el fondo de un tubo de ensayo cónico y por encima 1 ml de medio NC, se incubó durante 1 hora a 37°C, con una inclinación de 45°, permitiendo que los espermatozoides nadan hacia el medio NC. Luego, se recuperó el medio NC donde se encuentran los espermatozoides altamente móviles. Se los centrifugó durante 5 minutos a 400g para lavarlos y luego se los incubó en el medio correspondiente a una concentración de 10×10^6 células/ml a 37°C en una atmósfera controlada de 5% v/v de CO₂.

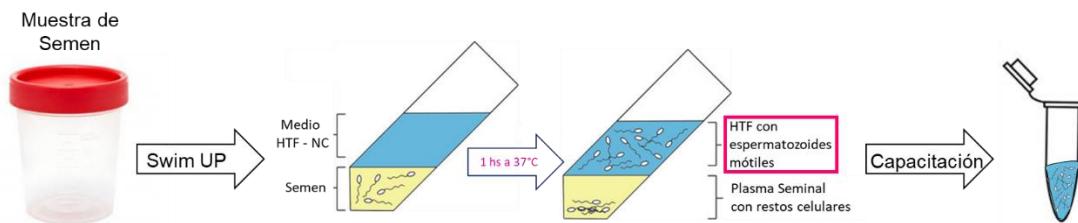


Figura 17: Esquema de metodología de selección y capacitación de espermatozoides humanos.

La muestra de semen es colectada en un frasco estéril. Se permite que el semen se lique por 1 h a temperatura ambiente. Se evalúan los parámetros de normalidad estipulados por la OMS. Luego se realiza la técnica de *Swim UP* (SU). Se coloca el semen en la parte inferior del tubo y se cubre con medio HTF-NC. Se incuba durante 1 h, con una inclinación de 45° a 37°C. Luego, se obtienen los espermatozoides móviles los cuales se incuban en un medio CAP para realizar la capacitación espermática *in vitro*.

Determinación del potencial de membrana por citometría de flujo:

Para evaluar el Em se utilizó la sonda sensible al potencial de membrana DiSC₃(5) (Graf et al., 2019). Brevemente, luego de 3 hs de incubación en un medio NC o CAP, se procedió a centrifugar las muestras a 400 g por 5 minutos, se resuspendió en 200 µl de medio NC y se ajustó la concentración espermática a 1,25x10⁶ células/ml. Las células fueron incubadas con 50 nM DiSC₃(5) durante 10 min. Se agregó 2 µg/ml de ioduro de propidio (IP) 30 seg antes de colectar la información, para evaluar la viabilidad espermática. La información fue grabada como eventos celulares individuales utilizando el MACSQuant Analyzer 16 cytometer (Miltenyi Biotec). Para definir la población de espermatozoides se tomaron datos del *forward scatter area* (FSC-A) y *side scatter area* (SSC-A) de 20.000 eventos por muestra. En todos los casos, se procedió a excluir dobletes, (se considera como doblete dos células que se leen como un único evento) al analizar los gráficos en dos dimensiones para FSC-A y *forward scatter height* (FSC-H). Los dobletes, exhiben una relación señal de área o ancho vs altura mayor a la de los singletes, medición de una única célula. Todos los eventos que estén por fuera de la diagonal en el gráfico de FSC-A vs FSC-H se consideran como dobletes. Se consideran como células vivas aquellas que sean negativas para la tinción con IP al utilizar el filtro para Peridinin chlorophyll PerCP (667/30). Células positivas para DiSC₃(5) fueron detectadas utilizando el filtro Allophycocyanine (APC) (667/30). El agregado de 1 µM Valinomicina y 40 mM

KCl fue utilizado para estudiar el Em en condiciones NC y CAP. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo (X 10.0.7r2).

Extracción de proteínas e inmunotransferencia:

Para obtener los extractos proteicos, los espermatozoides fueron lavados por centrifugación (400 g por 5 min) en 500 μ l de medio NC. Se resuspendieron en *sample buffer* (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% p/v SDS, 10% v/v glicerol) y se hirvió por 5 min. Se centrifugó por 5 min a 13.000 g y al sobrenadante se le agregó 5% v/v β -mercaptoethanol y 0.0005% p/v bromophenol blue y se volvió a hervir durante 5 min. Los extractos de proteínas, equivalentes a $2-4 \times 10^6$ espermatozoides por calle, fueron separados en un gel de SDS-PAGE con 10% de poliacrilamida y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas transferidas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% p/v en PBS con 0,1% v/v de Tween 20 (PBS-T) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo primario diluido en leche descremada al 2% p/v en PBS-T (1:5000 para anti-pY y 1:5000 para anti- β -Tubulina). Pasada la hora de incubación la membrana se lavó durante 15 minutos, 3 veces con PBS-T y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario correspondiente, también diluido en leche descremada al 2% p/v en PBS-T durante 1 h (1:3000 HRP anti-ratón). En todos los casos, las bandas reactivas fueron visualizadas utilizando una solución para detectar quimioluminiscencia (100 mM Tris-HCl buffer pH 8, 205 μ M ácido cumárico, 1,3 mM luminol, 0,01% v/v H_2O_2 Sigma (St. Louis, MO, USA)). Las membranas fueron expuestas durante distintos períodos de tiempo con placas radiográficas CL-Xposure (Thermo Scientific). En todos los experimentos, la masa molecular fue expresada en kiloDaltons (kDa). El análisis de las imágenes de Western blot fue realizado utilizando ImageJ 1.53c (National Institutes of Health, USA), siguiendo las especificaciones de la guía de usuario de ImageJ. La densidad óptica de todas las bandas, desde 150 kDa a 50 kDa, fueron cuantificadas y relativizadas, primero a β -Tubulina y luego al control de cada membrana.

Exocitosis acrosomal:

Después de haber incubado a los espermatozoides humanos en su medio apropiado, se procedió a pre-tratar a los espermatozoides con 1 μ M Valinomicina

o con DMSO durante 5 minutos, luego se los expuso durante 45 minutos a 10 μM de ionóforo de Ca^{2+} A23187, 30 μM de Prog o 50 mM de KCl diluido en medio NC, para inducir la EA. Brevemente, los espermatozoides fueron fijados con 2% p/v de paraformaldehido (PFA) en PBS, se los tiñó con 100 $\mu\text{g/ml}$ de *Pisum sativum* aglutinina acoplada a FITC (PSA, Sigma) disuelta en PBS. La lectina PSA se une a los residuos α -D-manosil de las proteínas de la matriz acrosomal. Al estar acoplada a FITC se puede evaluar el estado acrosomal utilizando microscopía de epifluorescencia (Nikon Optiphot, 1,250X). Los espermatozoides fueron seleccionados como intactos cuando se observa una marca verde homogénea en el capuchón acrosomal, mientras que en espermatozoides reaccionados se observan dos patrones uno donde la fluorescencia se restringe a la banda ecuatorial y otro en el que se observan huecos en la membrana, al cual llamamos *patchy*.

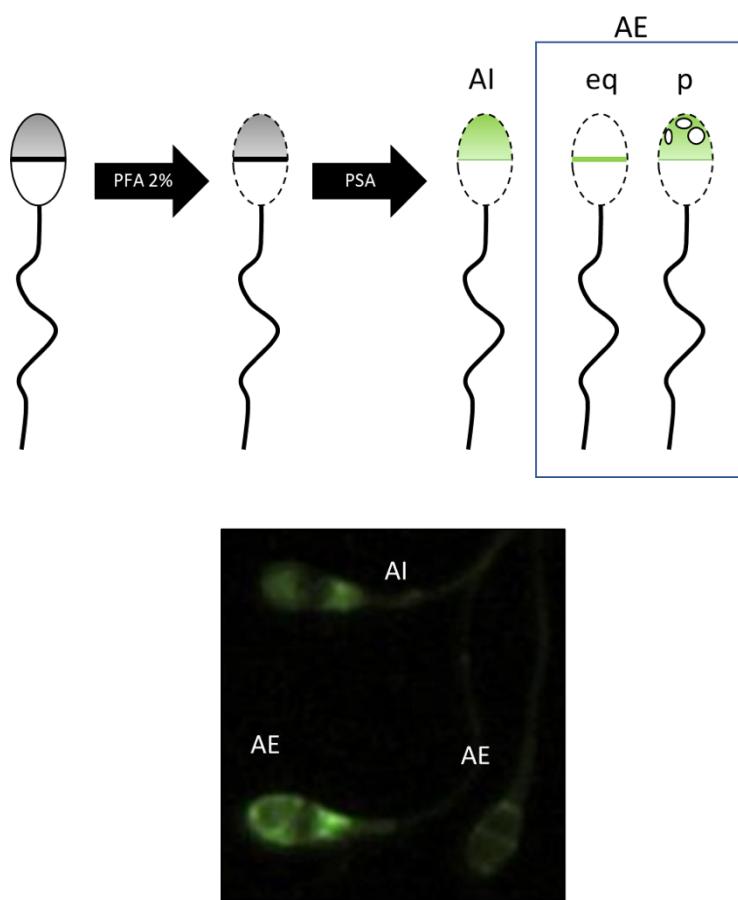


Figura 18: Esquema e imagen representativa del protocolo de evaluación de EA en humanos. En el esquema se observa la fijación con 2% PFA y luego la tinción con PSA-FITC y la posterior visualización de espermatozoides intactos (AI) o reaccionados (AE) con patrón ecuatorial (eq) o patrón *patchy* (p). Se muestra también una imagen representativa de espermatozoides AI y AE.

Live imaging en célula única de espermatozoides:

Espermatozoides obtenidos de SU se centrifugaron y resuspendieron en medio HTF NC (en ausencia de HCO_3^- y BSA). Se utilizó la sonda FM4-64, para evaluar EA y la sonda Fluo-4 AM para estudiar los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Romarowski et al., 2016a). Para obtener imágenes alternadas entre FM4-64 y Fluo-4, los espermatozoides fueron incubados durante 30 min con 2 μM Fluo-4 AM disuelto en DMSO y 0.05% ácido plurónico, centrifugados e incubados en un medio NC. Se inmovilizaron los espermatozoides en cubreobjetos de 25 mm de diámetro, recubiertos con Poli-L-Lisina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los espermatozoides no adheridos fueron removidos realizando un lavado con medio de registro (HTF NC con 10 μM FM4-64) y, por último, se cubrió la cámara con medio de registro. Todos los registros se realizaron a 37 °C utilizando un controlador de temperatura modelo 202A (Harvard Apparatus, Holliston MA, USA). Se utilizó un microscopio invertido (Eclipse Ti-U) Nikon (Melville, NY, USA) y un objetivo de inmersión en aceite de fluorescencia (plan Apo TIRF DIC H/N2 60x/1.45 NA, Nikon). Como fuente de luz se utilizó una fibra de iluminación pre-centrada, Nikon Intensilight-CHGFI. Para colectar la excitación y emisión de Fluo-4 se utilizó un filtro para GFP 96343, espejo dicroico (D): 495, excitación 470/40, barrera 525/50 (Nikon). Para FM4-64, se utilizó un set de filtro Wide Green 11007v2, D: 565 dcxt, excitación 535/50, emisión 590 Ipv2 (Chroma Technology Corporation). Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas con una cámara Andor Ixon 3 EMCCD modelo DU-8970-C00#B (Andor Technology, Belfast UK) o Hammamatsu Orca-100 CCD modelo C4742-95 (Hammamatsu Photonics, Bridgewater, NJ USA), siguiendo los protocolos del software Andor iQ 1.10.2 Versión 4.0. Siguiendo un protocolo ya establecido, el cubo de filtros motorizado alterna entre Fluo-4 y FM4-64. El mínimo intervalo posible para el cambio de filtros por el cubo es de aproximadamente 400 ms, este es el tiempo que demora en adquirir un par de imágenes de Fluo-4/FM4-64. Como nuestro diseño experimental requiere adquisiciones de hasta 54 minutos, se tomó un par de imágenes (Fluo-4/FM4-64) cada 20 s, de manera de prevenir daño celular debido a blanqueamiento o sobre exposición a la luz. Una serie de imágenes fueron adquiridas con 300 ms de exposición/iluminación, cada 20 s durante 54 minutos. Imágenes de 16-bit fueron obtenidas y las películas fueron procesadas y analizadas con ImageJ 1.53c (National Institutes of Health, USA). En las películas, se trazaron regiones

de interés (ROI) en la cabeza de los espermatozoides para posterior cuantificación. Solo espermatozoides pegados al vidrio con flagelos móviles, previo al agregado de Prog o K⁺ fueron considerados para el análisis. Adicionalmente, se realizaron agregados de ionomicina, un ionóforo de Ca²⁺ para discriminar células vivas de muertas, bajo la premisa que solo las células vivas pueden responder a la ionomicina elevando su Ca²⁺ citoplasmático. Se graficó el trazo de fluorescencia graficando la intensidad de fluorescencia de cada espermatozoide en función del tiempo utilizando el software GraphPad (San Diego, CA, USA). La fluorescencia se expresó como (F-F0)/F0, donde F-F0 es el cambio en la intensidad fluorescencia y F0 es el basal calculado como el promedio de las primeras seis imágenes de la película, previo a cualquier estímulo. Se consideró como aumento de Ca²⁺ cuando la fluorescencia de Fluo-4 era mayor a F0 + dos veces el desvío estándar. El brillo y el contraste se ajustaron de igual manera a todas las películas que fueron obtenidas bajo las mismas condiciones. Se describieron tres señales de Ca²⁺ diferentes, i) Oscilatorio: espermatozoides que presentaban más de 3 picos en el trazo de fluorescencia de Fluo-4; ii) Transitorio: aquellos espermatozoides que solo presentaban uno o dos picos en su trazo de fluorescencia; iii) Sostenido: espermatozoides que responden aumentando la fluorescencia y luego estabilizándose en un *plateau* de fluorescencia máxima por al menos 5 minutos, o aquellos espermatozoides que presentaban una subida lenta de la fluorescencia de Fluo-4 sin alcanzar un máximo durante el registro.

Análisis estadístico:

Los datos son expresados como la media ± el error estándar de la media (SEM) de al menos 3 experimentos independientes para todas las determinaciones. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA). Comparaciones paramétricas o no paramétricas fueron utilizadas según la distribución de los datos. El análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías fue utilizado para evaluar el efecto de Valinomicina sobre la pY y la EA evaluada con *Pisum sativum*. La prueba no paramétrica Kruskal-Wallis se realizó en combinación de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn cuando se evaluó EA utilizando FM4-64. Valores de probabilidad (p) menores a 0,05 (p<0,05) fueron considerados estadísticamente significativos.

Introducción

Los espermatozoides de mamíferos deben atravesar un proceso complejo llamado capacitación en el tracto reproductivo femenino para adquirir la capacidad de fecundar (Austin, 1951; Chang, 1951; Puga Molina et al., 2018b; Stival et al., 2016). La capacitación permite que los espermatozoides desarrollen movilidad hiperactivada (HA) (Suarez y Ho, 2003) e inicien la exocitosis acrosomal (EA; también conocida como reacción acrosomal) en respuesta a estímulos específicos (Hirohashi y Yanagimachi, 2018). La identidad de el/los estímulo(s) todavía se encuentra en debate (Buffone et al., 2014), ya que reportes recientes han demostrado que la mayoría de los espermatozoides de ratón experimentan EA incluso antes de interactuar con la zona *pellucida* (ZP) o la matriz del *cumulus* que rodea a los oocitos ovulados (Hino et al., 2016; La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016).

A nivel molecular, la capacitación se inicia en un marco de tiempo de un minuto tras la exposición de los espermatozoides a HCO_3^- (proporcionado ya sea por plasma seminal o suplementado *in vitro*) que estimula la adenilato ciclase soluble atípica ADCY10 (también conocida como sAC), aumentando el AMPc y activando la proteína quinasa A (PKA) (Stival et al., 2015). Además, existen otros procesos de señalización inducidos por la capacitación, pero solo unos pocos se han asociado directamente con la preparación para la EA. Estos son: A) hiperpolarización del potencial de membrana (Em) (De La Vega-Beltran et al., 2012; López-González et al., 2014; Zeng et al., 1995); B) aumento del pH acrosomal (Nakanishi et al., 2001); C) polimerización de actina en la cabeza del espermatozoide (Brener et al., 2003); y D) aproximación de la membrana acrosomal externa (OAM) a la membrana plasmática (PM), iniciada ya sea durante la capacitación o después del inicio de la EA (Tsai et al., 2010; Zanetti y Mayorga, 2009).

Aunque la EA ocurre en la cabeza del espermatozoide, varios procesos necesarios para preparar al espermatozoide para la EA se inician en el flagelo durante la capacitación. Por ejemplo, la PKA y el canal de K^+ SLO3, específico de los espermatozoides, ambos involucrados en la hiperpolarización del Em y, por lo tanto, necesarios para la preparación de la EA, se localizan exclusivamente en el flagelo del espermatozoide (Santi et al., 2010; Wertheimer

et al., 2013). A pesar de esto, aún no está claro cómo se coordinan los procesos de capacitación que ocurren en diferentes compartimentos para preparar a los espermatozoides para la EA. Aunque los compartimentos de la cabeza y la cola de los espermatozoides están separados morfológicamente y tienen organizaciones de membrana únicas, los experimentos realizados mediante las técnicas de *patch-clamp* en células enteras y de célula única en células vivas, han mostrado continuidad citoplasmática y eléctrica entre ellos (Kirichok et al., 2006). Por ejemplo, un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ que se origina en el flagelo del espermatozoide puede propagarse a la cabeza del espermatozoide (Romarowski et al., 2016b; Stival et al., 2018; Xia y Ren, 2009; Xia et al., 2007). Además, los cambios en la permeabilidad iónica que se producen en el flagelo repercuten en el Em del espermatozoide (Navarro et al., 2007; Santi et al., 2010).

En los espermatozoides de ratón, la hiperpolarización de Em depende principalmente de los canales SLO3 K^+ específicos del espermatozoide, localizados en la pieza principal del flagelo (Santi et al., 2010). En los espermatozoides humanos, se postula que los canales SLO1 K^+ altamente conservados y expresados de forma ubicua y los canales epiteliales de Na^+ (ENaC) también controlan el Em (López-González et al., 2014; Mannowetz et al., 2013; Puga Molina et al., 2017; Puga Molina et al., 2018a). Trabajos recientes han demostrado que la hiperpolarización del Em en espermatozoides humanos capacitados se correlaciona significativamente con la tasa de éxito en la fecundación *in vitro* (FIV), lo que sugiere que el Em podría ser un indicador de la capacidad de fecundación en espermatozoides humanos (Baro Graf et al., 2020a; Puga Molina et al., 2020).

Los espermatozoides no capacitados (NC) no inducen la EA cuando se les estimula con agonistas. Sin embargo, la inducción farmacológica de la hiperpolarización del Em permitió que los espermatozoides de ratón NC realicen la EA gatillada por agonistas (De La Vega-Beltran et al., 2012). Por otro lado, al bloquear la hiperpolarización asociada a la capacitación ya sea farmacológicamente, con alto K^+ extracelular en presencia de Valinomicina (De La Vega-Beltran et al., 2012), o genéticamente, usando ratones SLO3 KO (Santi et al., 2010), previno la EA. En conjunto, estos experimentos indican que la hiperpolarización de Em es necesaria y suficiente para preparar a los

espermatozoides de ratón para la EA. Sin embargo, aún se desconoce cómo se relaciona la hiperpolarización del Em (que comienza en la cola) con otros cambios asociados con la EA (que ocurren en la cabeza). Dado el rol fundamental que el Ca^{2+} intracelular juega en todos los procesos exocíticos y en la EA en particular, nos propusimos evaluar si el Ca^{2+} podría estar involucrado en el mecanismo molecular que impide que un espermatozoide NC realice la EA inducida.

Hipótesis y Objetivos:

Objetivo:

Explorar el mecanismo molecular por el cual un cambio en el Em, asociado con la capacitación, permite a los espermatozoides humanos realizar la EA.

Hipótesis:

Los cambios en el Em inducidos por la capacitación, modulan los niveles de Ca^{2+} citoplasmático permitiendo que los espermatozoides puedan iniciar la EA ante un estímulo adecuado.

Resultados

La Valinomicina promueve la hiperpolarización del Em en espermatozoides humanos no capacitados

Para estudiar el rol de la hiperpolarización del Em en la adquisición de la capacidad de respuesta acrosomal, los espermatozoides se incubaron en condiciones no capacitantes (NC), donde la mayoría de las células no gatillan la EA en respuesta a agonistas como la progesterona (Prog) o los ionóforos de Ca^{2+} . La principal estrategia utilizada en este estudio fue modular el Em en los espermatozoides NC utilizando el ionóforo de K^+ Valinomicina (Val). El Em de los espermatozoides vivos incubados en condiciones NC y CAP se estimó mediante citometría de flujo utilizando la sonda sensible a cambios en el potencial de membrana DiSC₃(5) (Figura 19A). Como la sonda está cargada positivamente, la población de espermatozoides hiperpolarizados mostrará una mayor fluorescencia intracelular debido al ingreso del colorante catiónico hacia el interior de la célula. El procedimiento detallado para seleccionar las células viables en estos experimentos se describe en la Figura 19A-D.

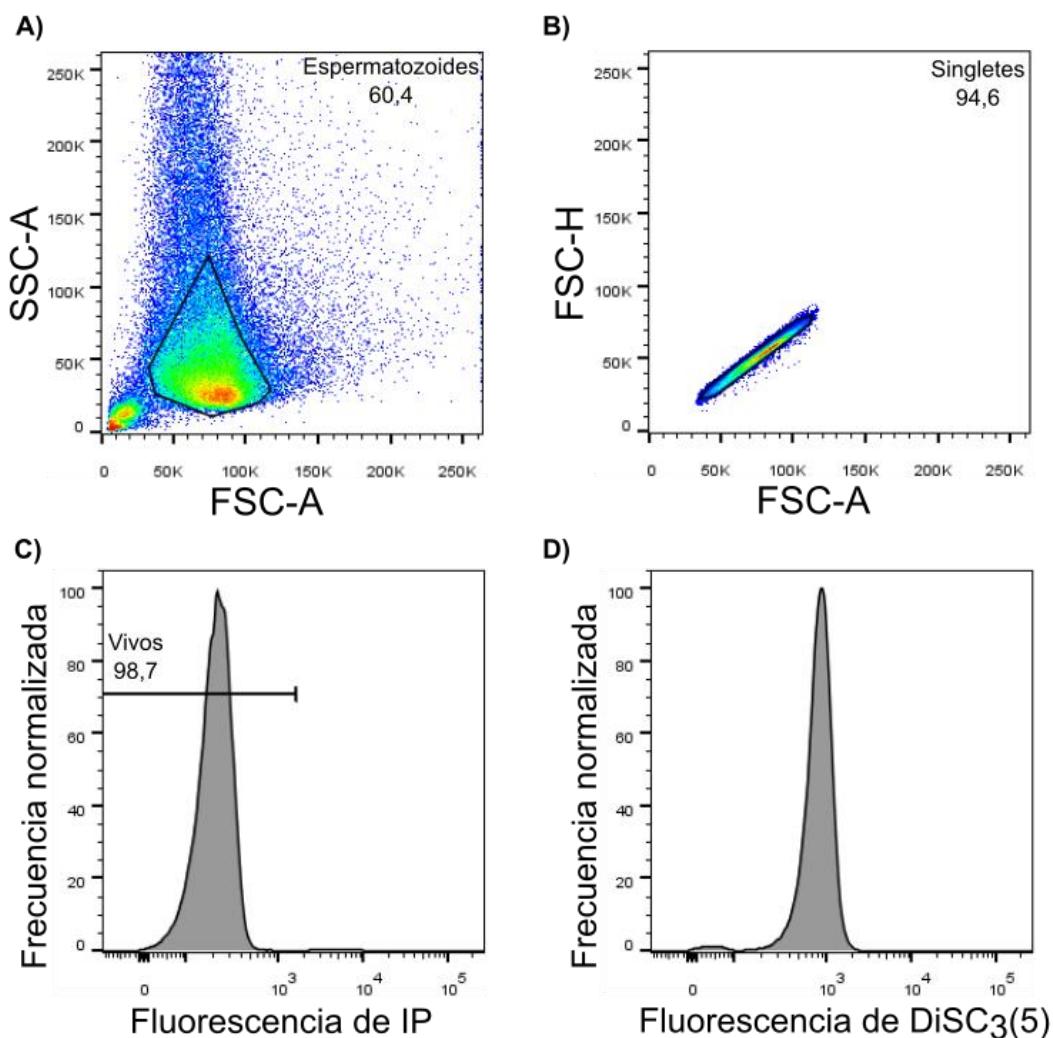


Figura 19: Ajustes de parámetros para el análisis de DiSC₃(5) por citometría de flujo. El Em se midió en espermatozoides humanos utilizando DiSC₃(5) 50 nM. A) Gráfico representativo de puntos bidimensional del análisis del área de dispersión lateral (SSC-A: side scatter area) vs el área de dispersión frontal (FSC-A: forward-scatter area) en espermatozoides recolectados por swim-up e incubados 3 hs en condiciones no capacitantes (ausencia de HCO₃⁻ y BSA: NC). B) Diagrama de puntos bidimensional representativo de FSC-A vs el análisis de altura de dispersión frontal (FSC-H: forward-scatter height) para la exclusión de dobletes. C) La viabilidad se evaluó mediante el análisis de histograma de la frecuencia normalizada de espermatozoides vs la fluorescencia de IP, fluorescencia de IP baja (células vivas) y fluorescencia de IP alta (células muertas). D) Para evaluar el Em se realizó un análisis de histograma de la frecuencia normalizada de espermatozoides vs la fluorescencia de DiSC₃(5) en poblaciones de espermatozoides vivos.

En el panel izquierdo de la Figura 20, se muestra el histograma de los espermatozoides incubados en condiciones NC en presencia o ausencia de Val y KCl (K⁺). La adición de Val aumentó la fluorescencia de DiSC₃(5) de los espermatozoides NC, indicando la hiperpolarización producida por la salida de K⁺. Está bien establecido que Val conduce al Em de los espermatozoides al potencial de equilibrio del K⁺ (Chávez et al., 2013). Por lo tanto, cuando se usó

Val en presencia de una alta concentración de K⁺ extracelular (KCl 40 mM), el Em se despolarizó como resultado de la entrada de K⁺. Por el contrario, los espermatozoides CAP mostraron una mayor fluorescencia de DiSC₃(5) en comparación con la población de NC (Figura 20, panel derecho). En este caso, la incorporación de Val no produjo cambios significativos en el Em. Sin embargo, cuando se añadió una combinación de Val con 40 mM de K⁺ a las células capacitadas, se observó una rápida despolarización, visualizada como niveles bajos de fluorescencia de DiSC₃(5).

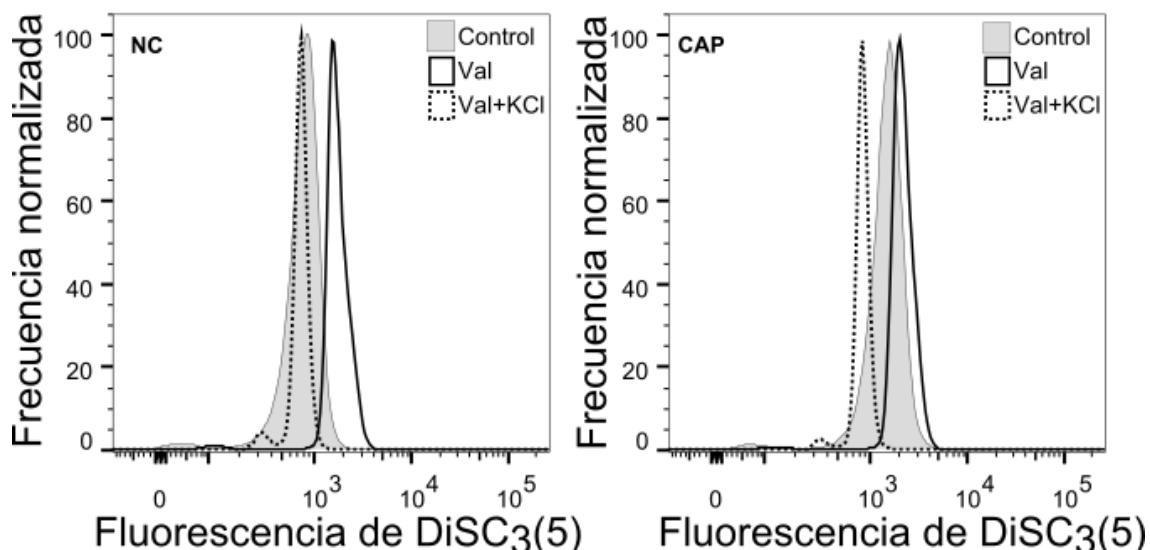


Figura 20: La Valinomicina modula el Em en espermatozoides humanos. Espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes (ausencia de HCO₃⁻ y BSA: NC) (panel izquierdo) o condiciones de capacitantes (CAP) durante 3 hs (panel derecho) se analizaron por citometría de flujo. Se realizaron histogramas que representan la frecuencia normalizada de espermatozoides frente a la fluorescencia de DiSC₃(5) en células vivas. Se utilizaron concentraciones de 1 μ M de Valinomicina (Val) y 40 mM de cloruro de potasio (KCl). La Val induce la hiperpolarización de los espermatozoides humanos NC mientras que el KCl despolariza a los capacitados.

Para examinar si la hiperpolarización inducida farmacológicamente por Val altera los niveles de fosforilación de proteínas en residuos tirosina (pY), que se producen río abajo de la vía AMPc/PKA, se midieron los niveles de pY en espermatozoides obtenidos por *swim-up* (NC 0 hs) o después de 6 hs de incubación en presencia o ausencia de HCO₃⁻, con el fin de evaluar el estado de activación de la principal vía de señalización asociada a la capacitación. Como se muestra en el *western blot* y la cuantificación de la densitometría de las bandas (Figura 21), solo los espermatozoides CAP mostraron un fuerte aumento

en pY. Se observó que en espermatozoides CAP incubados en presencia de Val el aumento de pY es aún mayor. Es importante destacar que la adición de Val a los espermatozoides NC no induce la activación de la vía AMPc/PKA/pY, por lo que la hiperpolarización del Em provocada farmacológicamente con Valinomicina no induce la CAP en estas células. Estos resultados se asemejan a resultados obtenidos en espermatozoides de ratón (De La Vega-Beltran et al., 2012).

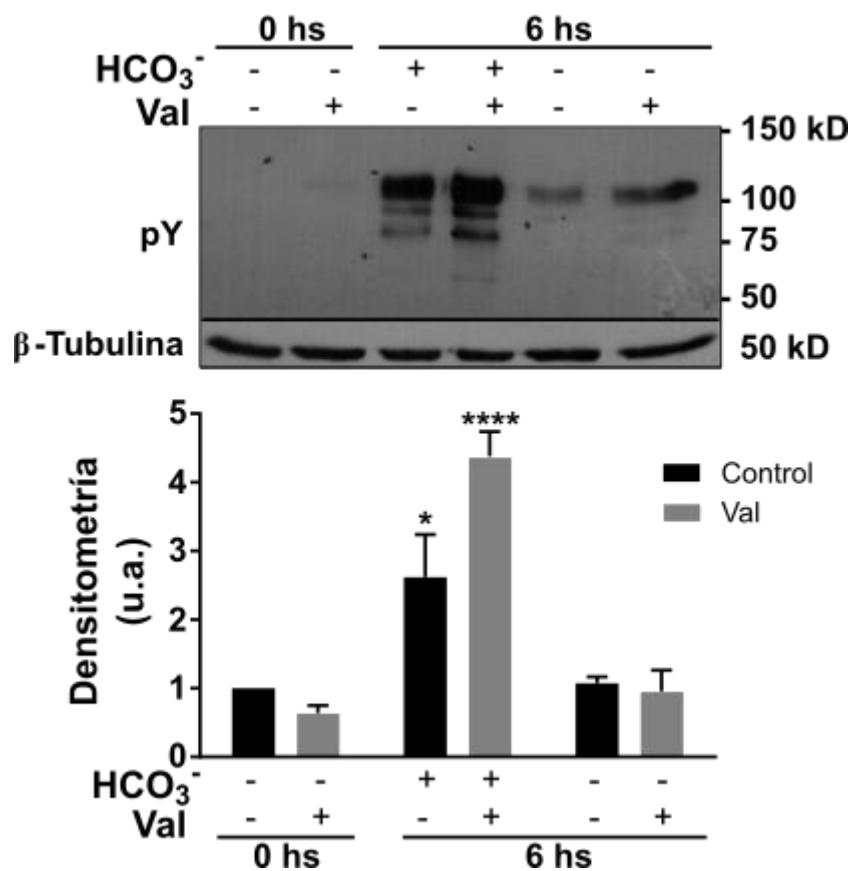


Figura 21: La Valinomicina induce la hiperpolarización farmacológica del Em independientemente de la activación de la vía pY. Espermatozoides obtenidos por *swim-up* (0 hs) o incubados en ausencia o presencia de HCO₃⁻ durante 6 hs fueron tratados con 1 μ M Val durante 50 minutos. Los extractos de proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 10 % y se utilizó un anticuerpo contra los residuos fosforilados en tirosina (pY). Como control de carga, se utilizó anti- β -tubulina. Se muestran las cuantificaciones representativas de las densitometrías de los WB. Los valores representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes, donde se normalizaron a la condición control (0 hs). * p < 0,05 y **** p < 0,0001 representan la significancia estadística frente al control (0 horas). Se realizó ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Sidak.

La adición de ionóforo de Ca²⁺ A23187, progesterona o K⁺ aumentó el porcentaje de EA solo en espermatozoides hiperpolarizados

Para investigar si la hiperpolarización del Em es suficiente para preparar los espermatozoides para la EA, las células se incubaron en diferentes condiciones: NC (0 hs: en ausencia de HCO₃⁻ y BSA) y con o sin HCO₃⁻ durante 6 hs. Luego, se utilizaron tres agonistas diferentes para estimular la EA: 1) ionóforo de Ca²⁺ A23187, 2) progesterona (Prog) y 3) adición de KCl extracelular (K⁺). En la bibliografía, se demostró que, en espermatozoides de ratón, el agregado repentino de K⁺ produce una despolarización del Em seguida de un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) que promueve la EA (De La Vega-Beltran et al., 2012). Como se muestra en la Figura 22, la tasa de EA no aumentó en los espermatozoides NC después de la adición de cualquiera de estos compuestos (Figura 22A-D). Por el contrario, los espermatozoides CAP que están fisiológicamente preparados para responder a los agonistas, muestran un aumento significativo en el porcentaje de células que realizan la EA cuando se enfrentan a los tres estímulos. Cuando los espermatozoides NC (ya sea en t=0 hs o t=6 hs, en ausencia de HCO₃⁻) se expusieron a Val para inducir la hiperpolarización del Em y luego se incubaron con A23187, Prog o K⁺, la tasa de EA aumentó significativamente respecto al control correspondiente (Figura 22A-C).

Para ahondar aún más en el papel del Em en la inducción de la respuesta acrosomal, se utilizó un enfoque farmacológico diferente para promover la hiperpolarización. Se ha demostrado que Amiloride inhibe la entrada de Na⁺ mediada por ENaC y, por lo tanto, induce la hiperpolarización de los espermatozoides humanos (Puga Molina et al., 2018a). Como se muestra en la Figura 22D, los espermatozoides NC expuestos a Amiloride pudieron responder a un agonista (en este caso, la adición de K⁺) aumentando significativamente el porcentaje de células que indujeron la EA. En conjunto, estos resultados sugieren que la hiperpolarización de la membrana plasmática de los espermatozoides humanos es suficiente para promover la EA inducida por agonistas.

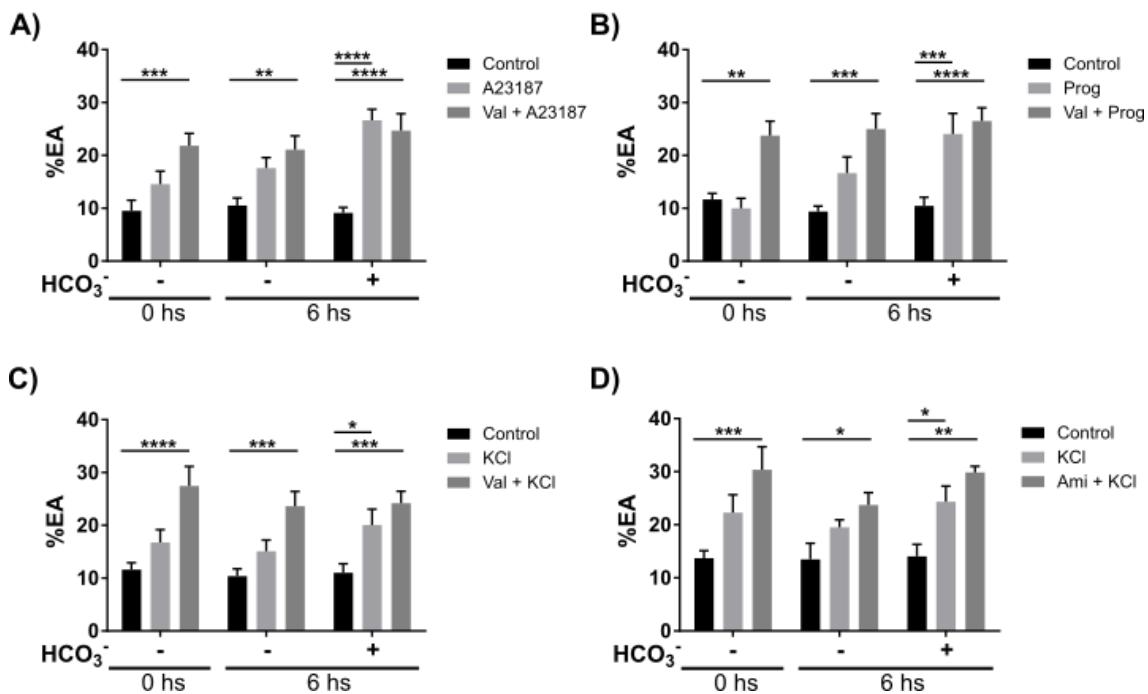


Figura 22: La hiperpolarización de la membrana plasmática es suficiente para preparar a los espermatozoides NC para inducir la EA. A-D) Porcentaje de espermatozoides que realizan la exocitosis acrosomal (%EA). Los espermatozoides obtenidos por *swim-up* (0 hs) o incubados en ausencia o presencia de HCO₃⁻ durante 6 hs se analizaron utilizando la técnica de *Pisum sativum*. A-C) Para inducir la hiperpolarización del Em, los espermatozoides se incubaron previamente durante 5 min con Valinomicina 1 μ M (Val), Amiloride (1 μ M) o DMSO (control). La exocitosis acrosomal se indujo usando A23187 10 μ M (A), progesterona 30 μ M (Prog) (B) o cloruro de potasio 50 mM (KCl) durante 45 min (C). Los datos representan la media \pm SEM de al menos 6 experimentos independientes. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001 representan la significancia estadística frente a su control correspondiente. Se realizó ANOVA de dos vías, en combinación con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. D) Se utilizó Amiloride (Ami) 1 μ M para inducir la hiperpolarización de la membrana plasmática y KCl 50 mM para desencadenar la EA. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001 representan la significancia estadística frente a su control correspondiente. Se realizó ANOVA de dos vías, en combinación con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

La inhibición de la hiperpolarización del Em impidió la EA inducida por agonistas

Los experimentos en la Figura 22 indican que la hiperpolarización farmacológica es suficiente para preparar a los espermatozoides NC para realizar la EA inducida. Para probar si la hiperpolarización del Em no solo es suficiente pero también es necesaria para EA, los espermatozoides se capacitaron en presencia o ausencia de una alta concentración de K⁺ extracelular (70 mM) y Val. La concentración elevada de K⁺ en los medios de incubación evita la hiperpolarización del Em inducida por la capacitación. Como se muestra en la

Figura 23, los espermatozoides capacitados en presencia de una alta concentración de K^+ no aumentaron el porcentaje de EA en respuesta a A23187 (Figura 23A) o Prog (Figura 23B). Estos resultados demuestran que la hiperpolarización del Em no solo es suficiente, si no también es necesaria para preparar a los espermatozoides para inducir la EA frente a un agonista.

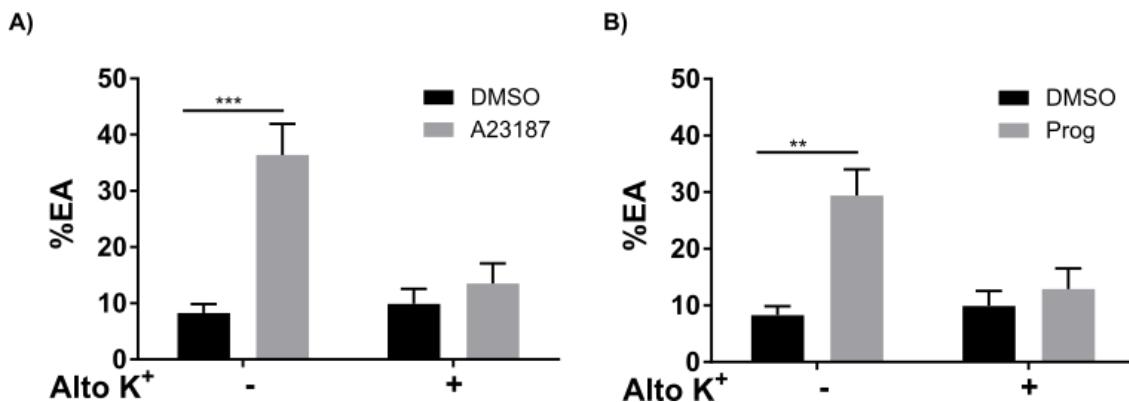


Figura 23: La hiperpolarización de la membrana plasmática asociada a la capacitación es necesaria para inducir la EA. Porcentaje de espermatozoides que inducen la exocitosis acrosomal (%EA) usando la técnica de *Pisum sativum*. Los espermatozoides se incubaron en medio de capacitación en ausencia o presencia de 70 mM de KCl y 1 μ M de Valinomicina (Alto K^+) para inhibir la hiperpolarización del Em. La exocitosis acrosomal se indujo usando A23187 10 μ M (A) o progesterona 30 μ M (Prog) (B). Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ representan la significancia estadística frente al control (DMSO). Se realizó ANOVA de dos vías, en combinación con la prueba de comparaciones múltiples de Sidak.

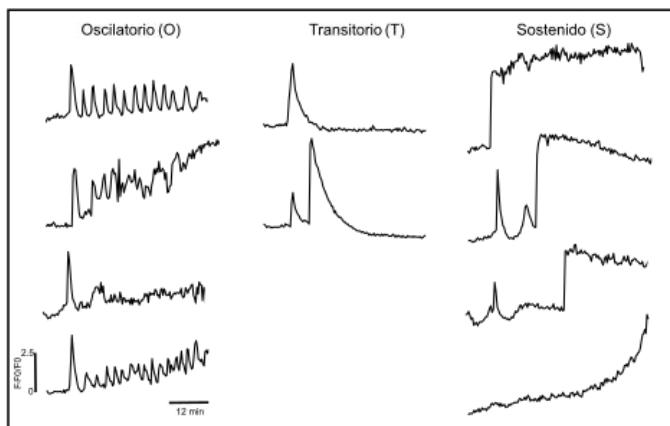
La hiperpolarización del Em modifica la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides no capacitados

Durante la capacitación, se observa un aumento de $[Ca^{2+}]_i$, el cual sigue distintos patrones (Brukman et al., 2019; Luque et al., 2018; Marquez et al., 2007; Qi et al., 2007). Además, en los espermatozoides un nuevo aumento de $[Ca^{2+}]_i$ induce la EA. Este aumento puede deberse a la acción individual o conjunta de distintos canales de Ca^{2+} como CatSper, el canal específico de espermatozoides, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CaVs), o canales *stored-operated*, (Darszon et al., 2011). Trabajos previos de este laboratorio encontraron que el aumento y movilización de $[Ca^{2+}]_i$ que induce la EA también presenta diferentes dinámicas espacio temporales (Romarowski et al., 2016a; Sánchez-Cárdenas et al., 2014b).

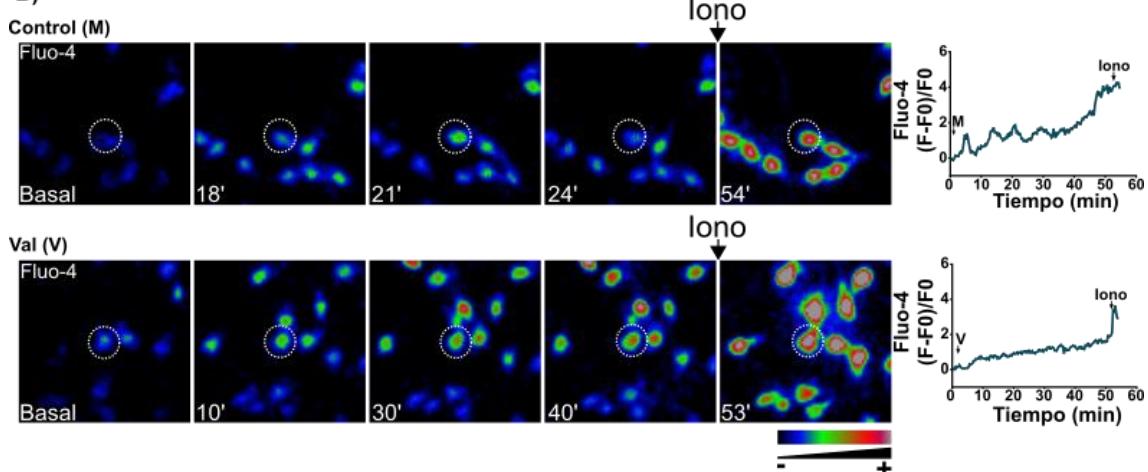
Espermatozoides obtenidos de *swim-up* (NC 0 hs) se cargaron con una sonda sensible a Ca^{2+} , Fluo-4 AM, y se registraron películas de célula única en espermatozoides vivos por microscopía de fluorescencia. Sobre las imágenes se realizaron regiones de interés (ROI) alrededor de la cabeza de cada espermatozoide y se obtuvieron las medidas de fluorescencia para cada cuadro de la película. Las medidas de fluorescencia se graficaron como trazos de fluorescencia en función del tiempo. Como se muestra en la Figura 24B, se realizaron las ROI en la cabeza de espermatozoides que se encontraban pegados a un portaobjeto recubierto con poli-L-lisina. Los trazos fluorescentes obtenidos revelaron que los espermatozoides mostraban diferentes patrones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y estos se agruparon en tres categorías (Figura 24A): i) aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscilatorio (O); ii) aumento transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (T) y iii) aumento sostenido de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (S). En nuestra condición control, el 87% de los espermatozoides NC que aumentaron espontáneamente su $[\text{Ca}^{2+}]_i$ presentaban un patrón de tipo oscilatorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 24B-C). Sin embargo, el tratamiento con Val cambió drásticamente el patrón de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los espermatozoides, de oscilatorio a sostenido. La Figura 24B (panel superior) muestra un transcurso temporal representativo y el trazo de fluorescencia correspondiente al espermatozoide delimitado por un círculo de línea punteada. Este espermatozoide incubado en condiciones control presenta un patrón de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de oscilaciones. De manera similar, en el panel inferior, a modo de ejemplo, se muestra un espermatozoide tratado con Val que muestra un aumento sostenido de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Solo se consideraron para el análisis los espermatozoides que se encuentran adheridos y móviles. Al final del registro, se agregó Ionomicina, un ionóforo de Ca^{2+} , para evaluar la viabilidad espermática ya que solo los espermatozoides vivos son capaces de aumentar su $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta al ionóforo.

En conjunto, estos experimentos demuestran que la hiperpolarización farmacológica producida por Val cambia drásticamente la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espermatozoide NC al cambiar de un patrón oscilatorio a uno sostenido de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 24C).

A)



B)



C)

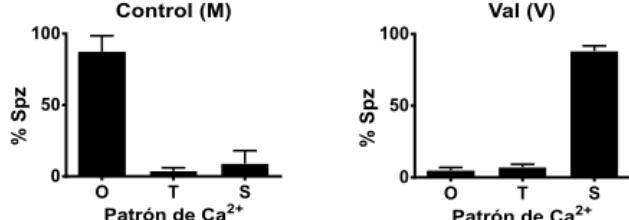


Figura 24: La Valinomicina modula el $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Análisis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de célula única en espermatozoides humanos. A) Se muestran gráficos representativos de los 3 patrones de aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$: oscilatorio (O), transitorio (T) y sostenido (S). B) Los espermatozoides obtenidos del *swim-up* muestran oscilaciones espontáneas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se muestran imágenes de fluorescencia representativas de al menos 3 experimentos independientes, correspondientes a las respuestas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de la adición de medio (M) y ionomicina (Iono) 10 μM . En el panel superior, los espermatozoides se pre-incubaron con medio (M) como control, mientras que, en el panel inferior, los espermatozoides se pre-incubaron con Valinomicina (V) 1 μM . A la derecha, trazos de fluorescencia de Fluo-4 correspondientes al registro de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de una sola célula obtenido de la cabeza del espermatozoide circulado con una línea de puntos. C) Cuantificación del porcentaje de espermatozoides que presentan los diferentes patrones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los espermatozoides se incubaron con Valinomicina 1 μM (Val) o no (Ctrl). Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes (se analizaron al menos 63 células por experimento). La Valinomicina reduce el porcentaje de espermatozoides con un patrón oscilatorio (O) de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

La adición de Prog o K⁺ aumentó significativamente el número de espermatozoides que tienen un aumento transitorio y sostenido de [Ca²⁺]_i

Teniendo en cuenta que la EA en espermatozoides está inducida por un aumento adicional de [Ca²⁺]_i, los siguientes experimentos tuvieron como objetivo evaluar los cambios en los niveles de [Ca²⁺]_i cuando los espermatozoides son expuestos a diferentes agonistas de la EA: Prog (Figura 25) o KCl (Figura 26). Se añadió Prog y se analizó cuál es el porcentaje de células que respondían aumentando su [Ca²⁺]_i (Figura 25A-B). En la figura 25A se muestran imágenes representativas de espermatozoides que muestran diferentes respuestas de [Ca²⁺]_i a Prog y los trazos fluorescentes correspondientes. El porcentaje de espermatozoides que aumenta el [Ca²⁺]_i en cada condición experimental se muestra en la Figura 25B. Se consideró un aumento de [Ca²⁺]_i cuando la fluorescencia de Fluo-4 fue mayor que la fluorescencia basal más dos veces la desviación estándar. Solo el 40,8% de los espermatozoides incubados en medio NC (control) mostraron un aumento espontáneo de [Ca²⁺]_i (Figura 24 y Figura 25B), donde la mayoría mostraron oscilaciones espontáneas de [Ca²⁺]_i. Por el contrario, el 80,8 %, 85,1 % y 79,3 % de las células tratadas con Val, Prog o una combinación de ambos, respectivamente, mostraron un aumento de [Ca²⁺]_i (Figura 25B).

Los espermatozoides NC tratados con Prog aumentaron su [Ca²⁺]_i siguiendo los tres patrones descritos en el apartado anterior (Figura 24A): oscilatorio (O), transitorio (T) o sostenido (S). Las series de imágenes representativas de estos patrones se ilustran en la Figura 25C y sus trazos de fluorescencia de Fluo-4 correspondientes de las ROI indicados se muestran a la derecha. La cuantificación de estos resultados mostró que la mayoría de los espermatozoides NC expuestos a Prog mostraban un patrón oscilatorio [Ca²⁺]_i (68,9 %) (Figura 25D). Además, Prog aumentó el porcentaje de células (25,8 %) que mostraban un patrón transitorio de [Ca²⁺]_i, en comparación con los espermatozoides NC que no estaban expuestos a Prog (3,7 %; Figura 24C). Cuando los espermatozoides NC fueron pre-tratados con Val para inducir la hiperpolarización del Em y luego expuestos a Prog, la mayoría de ellos cambió su patrón de aumento de [Ca²⁺]_i a transitorio (54,8%) o sostenido (31,9%) (Figura 25D). Este cambio posiblemente se deba al aumento sostenido de [Ca²⁺]_i promovido por la propia Val (Figura

24C). Estas observaciones sugieren que, por un lado, la hiperpolarización del Em disminuyó drásticamente el porcentaje de espermatozoides con un patrón oscilatorio de $[Ca^{2+}]_i$. Por otro lado, la adición de Prog promovió que un número significativo de células presentaran un aumento transitorio de $[Ca^{2+}]_i$.

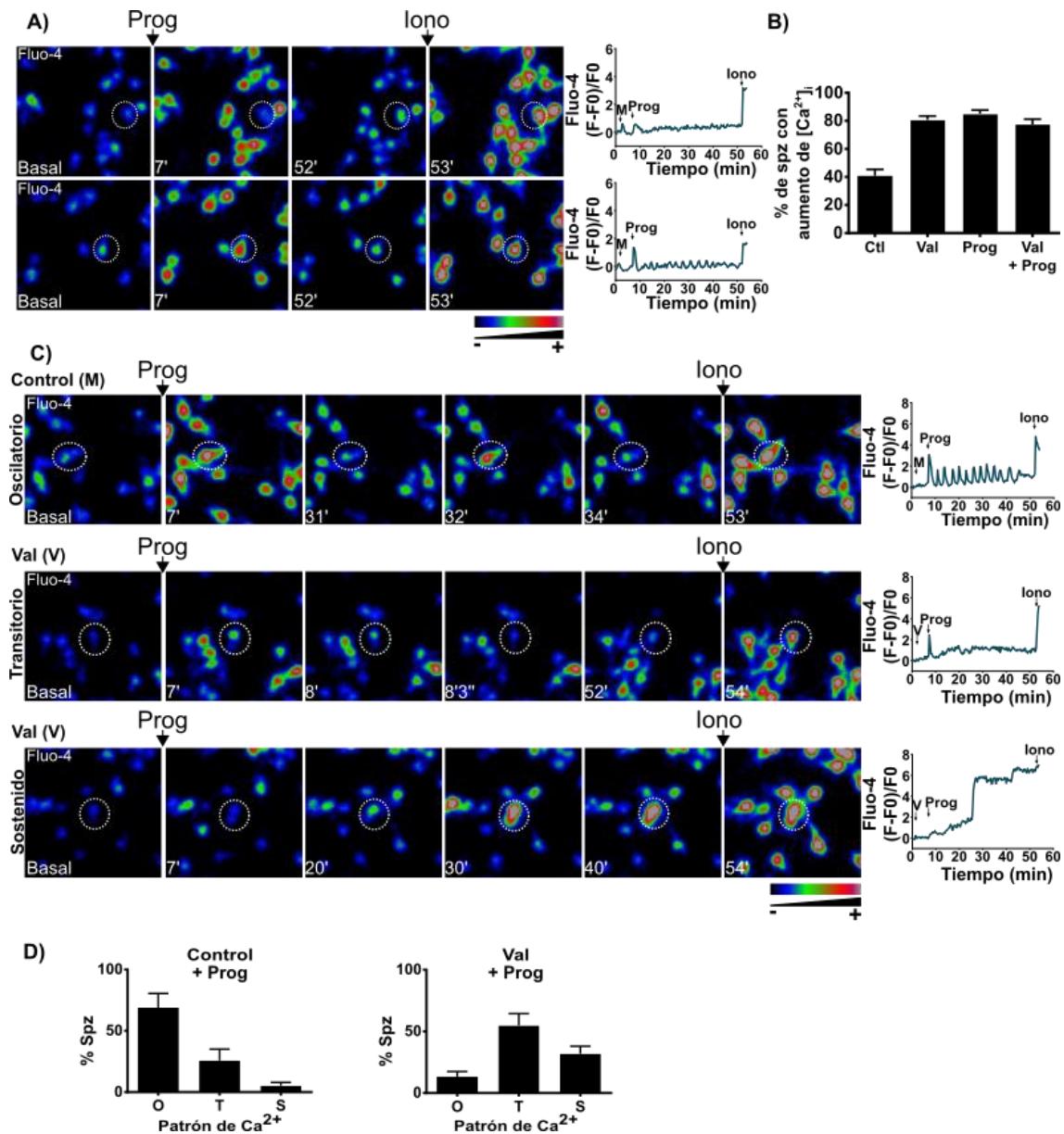


Figura 25: La hiperpolarización farmacológica reduce el porcentaje de espermatozoides con patrón oscilatorio de $[Ca^{2+}]_i$. Se realizó un análisis de $[Ca^{2+}]_i$ en célula única utilizando Fluo-4. Se incubaron espermatozoides humanos con o sin Valinomicina (V) 1 μM y se analizaron las señales de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la adición de progesterona (Prog) 30 μM . Al final del registro, se añadió ionomicina (Iono) 10 μM para evaluar la viabilidad de los espermatozoides. A) Secuencia de imágenes de fluorescencia representativas de 4 experimentos independientes. Los trazos de fluorescencia correspondientes se obtuvieron de la cabeza del espermatozoide señalado con una línea circular punteada y se muestran a la derecha. Panel superior: espermatozoide representativo que no responden aumentando su $[Ca^{2+}]_i$ al agregar Prog; panel inferior: espermatozoides representativos que aumentan su $[Ca^{2+}]_i$ después de la

adicción de Prog. B) Porcentaje de espermatozoides que aumentan el $[Ca^{2+}]_i$ para cada condición experimental. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes (se analizaron al menos 74 células por experimento). C) Secuencia de imágenes de fluorescencia representativas de diferentes patrones de $[Ca^{2+}]_i$ observados en respuesta a la progesterona (Prog). A la derecha se muestran los trazos de fluorescencia de las cabezas de espermatozoides marcadas con un círculo punteado. Espermatozoide representativo tratado con medio (M) que presenta un patrón oscilatorio de $[Ca^{2+}]_i$ (O) (panel superior). Espermatozoide representativo incubado con Valinomicina (V) que muestra un patrón transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ (T) (panel central). Imágenes representativas que muestran un espermatozoide incubado con Valinomicina (V) que posee un patrón sostenido de aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (S) (panel inferior). D) Porcentaje de espermatozoides que presentan los diferentes patrones de $[Ca^{2+}]_i$ para cada condición experimental. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 4 experimentos independientes (se analizaron al menos 74 células por experimento).

Se obtuvieron resultados similares cuando se usó K^+ en lugar de Prog como agonista de la EA. Estos resultados se muestran en la Figura 26. A diferencia de la inducción con Prog, donde la disminución en el patrón oscilatorio daba lugar a un aumento principalmente en el patrón de tipo transitorio (Figura 25D), el tratamiento con KCl indujo un aumento en el patrón de aumento de $[Ca^{2+}]_i$ de tipo sostenido (Figura 26D). Esta diferencia en el tipo de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ podría deberse a que la modulación de Ca^{2+} esté mediada por distintas vías dependiendo del agonista utilizado.

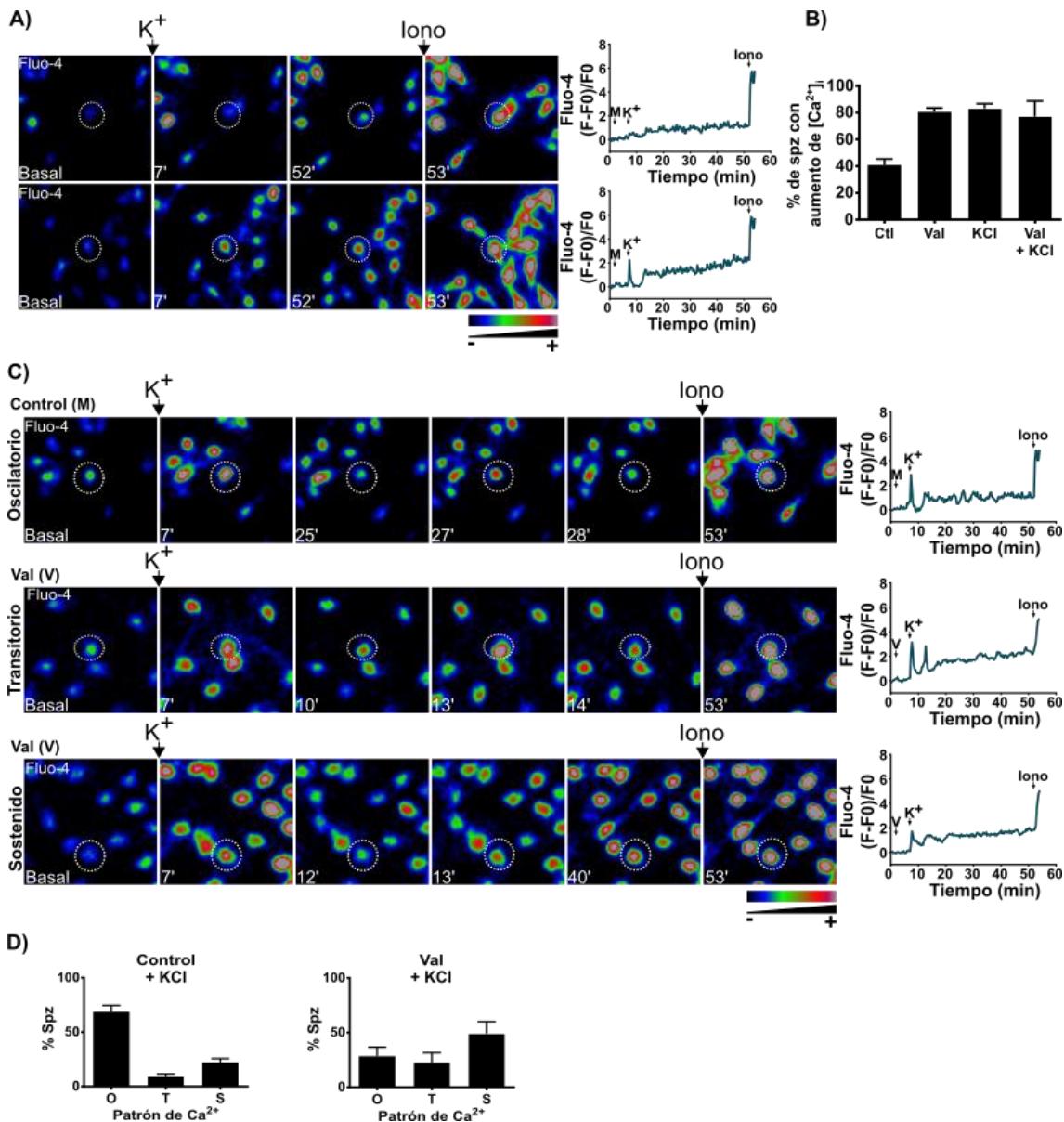


Figura 26: La hiperpolarización farmacológica reduce el porcentaje de espermatozoides que muestran un patrón oscilatorio $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a KCl. Análisis de $[Ca^{2+}]_i$ en célula única. Se preincubaron espermatozoides humanos durante 5 min con o sin Valinomicina 1 μ M (V) y se analizó $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la adición de cloruro de potasio (KCl) 50 mM. Al final, se añadió ionomicina (Iono) 10 μ M para evaluar la viabilidad de los espermatozoides. A) Secuencia de imágenes de fluorescencia representativa de 3 experimentos independientes. Los trazos de fluorescencia correspondientes obtenidos de la cabeza del espermatozoide, señalado con un círculo punteado, se muestran a la derecha. Espermatozoide representativo que no responde aumentando su $[Ca^{2+}]_i$ tras la adición de KCl (panel superior). Espermatozoide representativo que aumenta su $[Ca^{2+}]_i$ después de la adición de KCl (panel inferior). B) Porcentaje de espermatozoides que aumentan su $[Ca^{2+}]_i$ para cada condición experimental. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes (se analizaron al menos 86 células por experimento). C) Secuencia de imágenes de fluorescencia representativa de diferentes patrones de $[Ca^{2+}]_i$ observados en respuesta al cloruro de potasio (KCl). A la derecha se muestran los trazos de fluorescencia de las cabezas de espermatozoides marcadas con un círculo punteado. Serie de tiempo representativa de espermatozoides tratados con medio (M) que presenta un espermatozoide con un patrón

oscilatorio (O) (panel superior). Serie de tiempo representativa de espermatozoides incubados con Valinomicina (V) que muestra un espermatozoide con un patrón transitorio (T) (panel central). Serie de tiempo representativa de espermatozoides incubados con Valinomicina (V) que muestra un espermatozoide con un patrón sostenido (S) (panel inferior). D) Porcentaje de espermatozoides que presentan los diferentes patrones de $[Ca^{2+}]_i$ para cada condición experimental. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 4 experimentos independientes (se analizaron al menos 86 células por experimento).

Solo los espermatozoides que mostraron un aumento transitorio o sostenido de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a Prog o K^+ pueden realizar la EA.

Para evaluar si los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ observados después de la estimulación con Prog de las células NC tratadas con Val se asociaron con la ocurrencia de EA, realizamos experimentos célula única. Tanto la ocurrencia de la EA como la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ se analizaron simultáneamente en el mismo espermatozoide incubando las células con FM4-64 y Fluo-4 AM, respectivamente (ver métodos). Como se reportó en un trabajo previo, una vez que comienza la EA, la fluorescencia de FM4-64 aumenta en la región acrosomal, seguida de una disminución gradual en la fluorescencia de Fluo-4 (Sánchez-Cárdenas et al., 2014b). En la Figura 27A se muestran cuadros representativos de películas donde se observa una célula individual que no induce la EA (panel superior) o que si gatilla la EA (panel inferior) en respuesta a Prog (ambas delimitadas con un círculo de línea punteada). En este último caso, los trazos de fluorescencia indican un aumento de fluorescencia del FM4-64 en la ROI (cabeza del espermatozoide) correspondiente, que se observa en las imágenes obtenidas de las películas. Pudimos cuantificar el porcentaje de EA en cada condición experimental. Los espermatozoides de NC no realizaron la EA cuando se expusieron a Prog o a Val por separado (Figura 27B). Sin embargo, cuando los espermatozoides se trataron con Val y luego se expusieron a Prog, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células que experimentaban la EA. Estos resultados están de acuerdo con nuestra observación utilizando el método basado en lectina (*Pisum sativum*) presentado en la Figura 22, validando el uso de FM4-64 en el experimento de célula única para evaluar la EA. Estos resultados también respaldan las observaciones anteriores de que sólo los espermatozoides hiperpolarizados son capaces de inducir la EA.

A continuación, analizamos el patrón de aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en aquellos espermatozoides que realizaron la EA en respuesta a Prog. En la Figura 27C, se muestran ejemplos representativos de experimentos de célula única. En primer lugar, los espermatozoides que mostraban el patrón oscilatorio (panel superior) no realizaron la EA. Los trazos de fluorescencia correspondientes muestran el patrón oscilatorio típico de $[Ca^{2+}]_i$ mientras que la fluorescencia del FM4-64 permaneció sin cambios. Por el contrario, las células que después de la adición de Prog indujeron la EA, mostraron un patrón transitorio (panel central) o sostenido (panel inferior). Los trazos de fluorescencia que se muestran a la derecha demuestran que el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ va seguido de un rápido aumento de la intensidad de fluorescencia del FM4-64, asociado con el inicio de la EA. La cuantificación de estos resultados se muestra en la Figura 27D, donde el patrón de aumento de $[Ca^{2+}]_i$ se evaluó solo en aquellas células que realizaron EA. Independientemente de las condiciones en las que se incubaron los espermatozoides, las células que inducen la EA nunca mostraron un patrón oscilatorio de $[Ca^{2+}]_i$. Por el contrario, todas aquellas células en las que la Prog produjo un aumento transitorio o sostenido de $[Ca^{2+}]_i$ indujeron la EA.

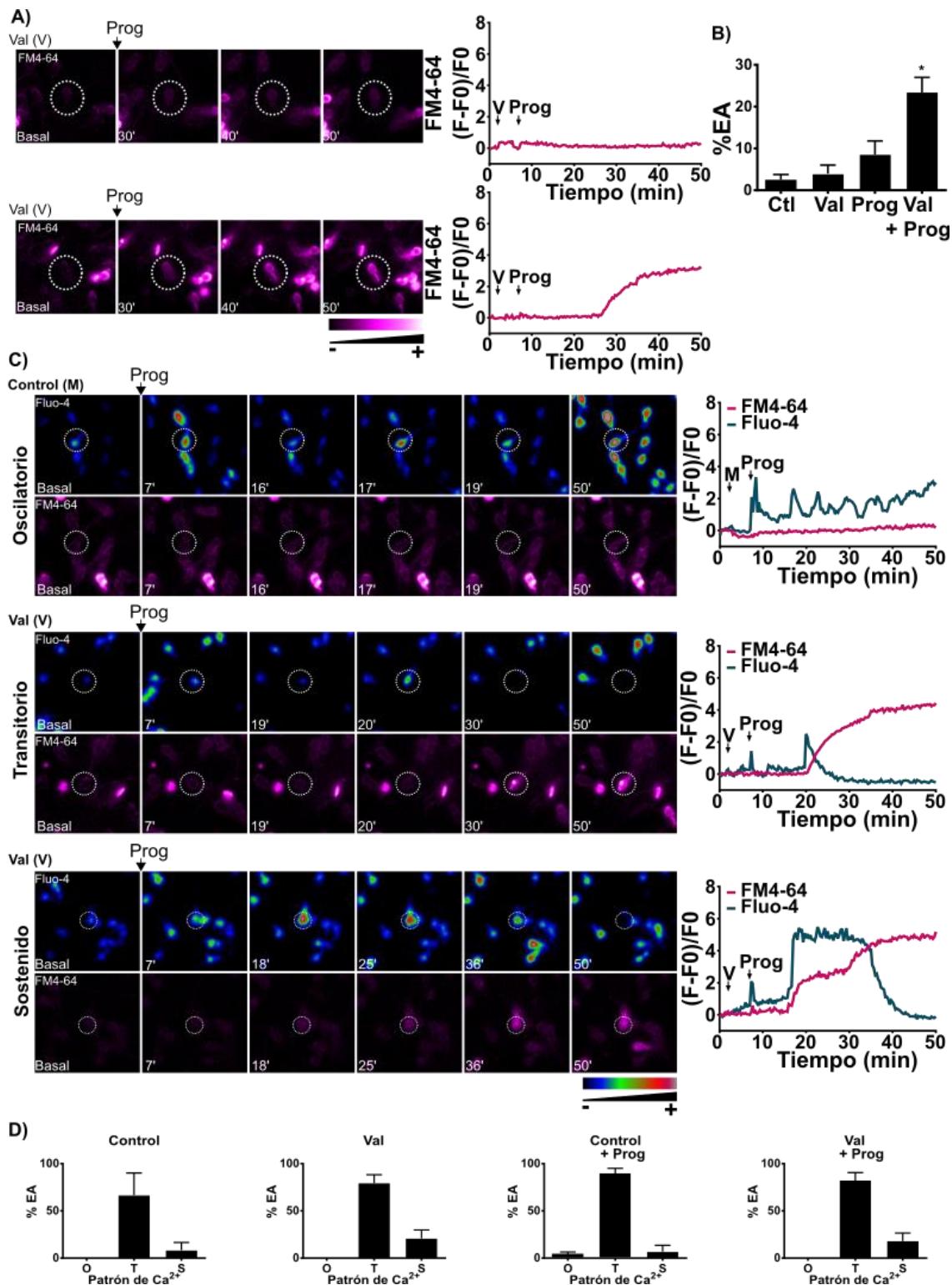


Figura 27: La hiperpolarización farmacológica induce la EA en aquellos espermatozoides humanos que muestran un patrón transitorio de $[Ca^{2+}]_i$. Se realizaron ensayos de célula única para evaluar la EA utilizando FM4-64. Los espermatozoides obtenidos de *swim-up* se pre-incubaron durante 5 min con Valinomicina 1 μ M (V) o sin (Control: M), y se indujo la EA usando progesterona 30 μ M (Prog). A) Secuencia de imágenes representativas de espermatozoides marcados con FM4-64. A la derecha se muestran los trazos de fluorescencia de las cabezas de espermatozoides marcadas con un círculo punteado. El panel superior muestra un espermatozoide que no sufre EA. El panel inferior muestra un espermatozoide que

reacciona. B) Porcentaje de espermatozoides que reaccionaron (%EA) en cada condición experimental. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes (se analizaron al menos 63 células por experimento). *p<0,05 representan significancia estadística frente a su control correspondiente. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, en combinación con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. C) Imágenes de EA y $[Ca^{2+}]_i$ de espermatozoides NC pre-incubados durante 5 min con medio (M), panel superior o Valinomicina (V), paneles medio e inferior. Se añadió progesterona (Prog) 30 μ M 7 min después del inicio del registro. A la derecha, se muestran los trazos de fluorescencia correspondientes a la cabeza del espermatozoide indicada con un círculo punteado. D) Porcentaje de espermatozoides reaccionados que muestran los diferentes patrones de $[Ca^{2+}]_i$. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes (se analizaron al menos 63 células por experimento).

También realizamos experimentos similares usando K^+ para inducir la EA (Figura 28). Encontramos también que los espermatozoides que presentaban oscilaciones del $[Ca^{2+}]_i$ permanecían con el acrosoma intacto, y que los dos patrones asociados a la EA eran mayormente de tipo transitorio y en menor medida de tipo sostenido. En línea con estas observaciones, el porcentaje de EA observado para los espermatozoides NC tratados con Val y Prog es mayor al observado para Val y KCl (Figura 27B y 28B), esto puede deberse a que la mayoría de las células tratadas con KCl presentan un patrón de tipo sostenido mientras que las tratadas con Prog presentan un patrón de $[Ca^{2+}]_i$ transitorio (Fig 25D y 26D), permitiendo que una población de espermatozoides mayor induzca la EA al tratársela con Prog. A pesar de estas diferencias, es importante destacar que en ambos casos los espermatozoides con oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ permanecieron intactos, sin importar el tipo de agonista utilizado, lo que sugiere que el mismo mecanismo está involucrado en la preparación de los espermatozoides humanos para gatillar la EA.

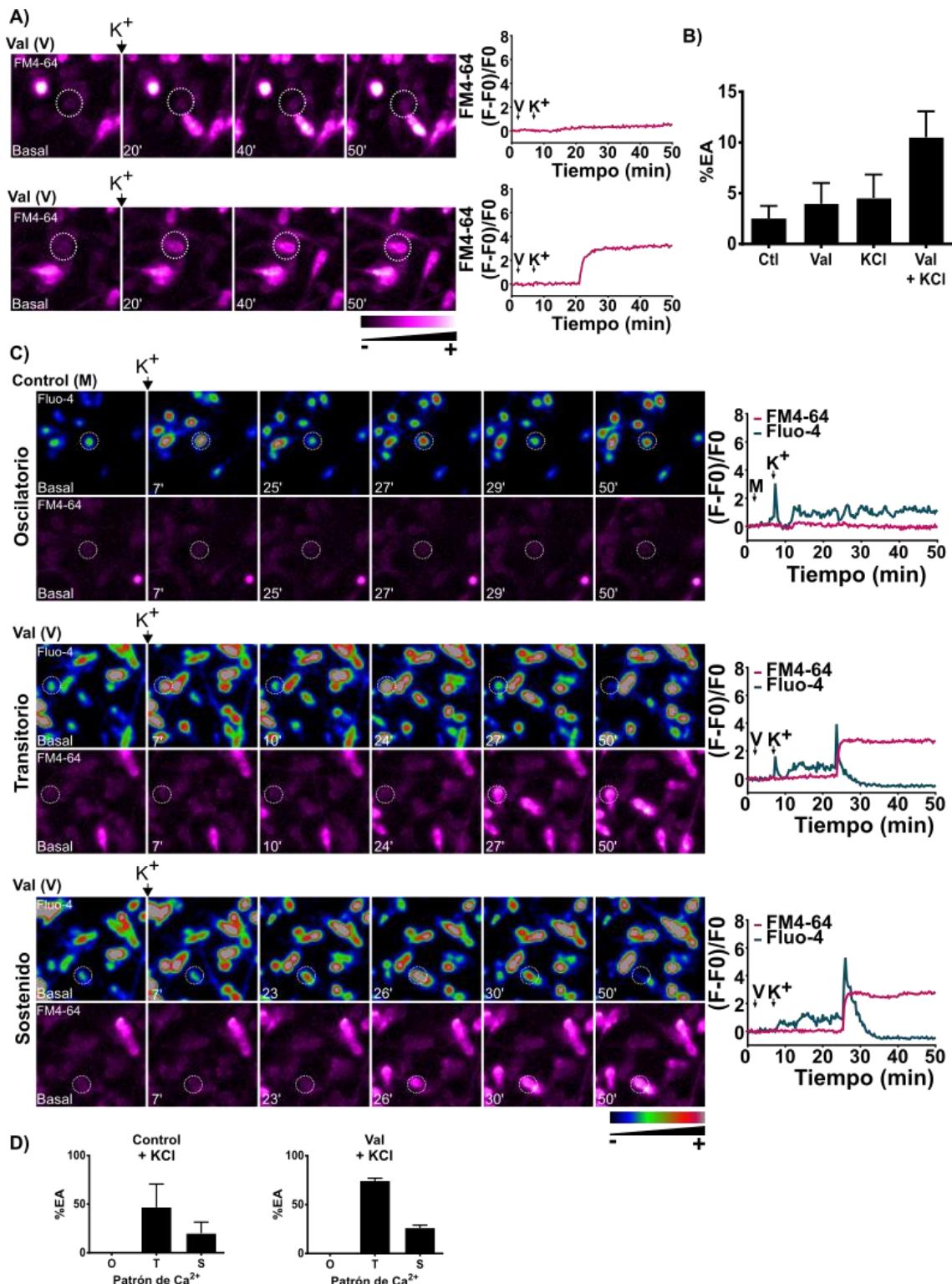


Figura 28: La hiperpolarización farmacológica induce la EA en aquellos espermatozoides humanos que muestran un patrón transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a KCl. Análisis de célula única de EA utilizando FM4-64. Los espermatozoides obtenidos de *swim-up* se preincubaron con Valinomicina 1 μ M (V) o sin (Control: M) durante 5 min, y se indujo la EA usando cloruro de potasio (KCl) 50 mM. A) Secuencia de imágenes representativas de espermatozoides marcados con FM4-64. A la derecha se muestran los trazos de fluorescencia de las cabezas de espermatozoides marcadas con un círculo punteado. El panel superior muestra un espermatozoide que no induce la EA. El panel inferior muestra un espermatozoide que

reacciona. B) Porcentaje de espermatozoides que reaccionaron (%EA) en cada condición experimental. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes (se analizaron al menos 63 células por experimento). C) Imágenes de EA y $[Ca^{2+}]_i$ de espermatozoides NC pre-incubados con medio (M), panel superior o Valinomicina (V), paneles medio e inferior, y tratados con cloruro de potasio (KCl) 50 mM. A la derecha, se muestran los trazos de fluorescencia correspondientes a la cabeza del espermatozoide indicada con un círculo punteado. D) Porcentaje de espermatozoides reaccionados que muestran los diferentes patrones de $[Ca^{2+}]_i$. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes (se analizaron al menos 86 células por experimento).

Discusión

Varias vías intracelulares se han asociado con la preparación de los espermatozoides para la exocitosis durante la capacitación. En particular, los espermatozoides de diferentes especies como el ratón (Demarco et al., 2003; Zeng et al., 1995), humano (López-González et al., 2014), caballo (McPartlin et al., 2011) y bovino (Zeng et al., 1995) sufren la hiperpolarización del Em, la cual se asoció con la capacidad de los espermatozoides para realizar la EA (Baro Graf et al., 2020a; De La Vega-Beltran et al., 2012). Sin embargo, los mecanismos que regulan el Em durante la capacitación son poco conocidos. El Em, en cualquier momento, se encuentra determinado por la permeabilidad iónica de la membrana plasmática. Entre estos iones, Na^+ , K^+ y Cl^- son los más relevantes en la regulación de Em, con potenciales de equilibrio de +40, -80 y -40 mV respectivamente. Por lo tanto, los cambios hiperpolarizantes en Em de ~-40 mV a ~-70 mV durante la capacitación podrían originarse, por ejemplo, por la inhibición del transporte despolarizante de Na^+ al interior celular o la apertura de canales de K^+ , entre otros. En acuerdo con esto último, los espermatozoides de ratón KO para el canal de K^+ específico de espermatozoides SLO3 no pueden hiperpolarizar su Em (Santi et al., 2010). De manera similar, los espermatozoides de ratones WT incubados con el inhibidor de SLO3 clofilium no se hiperpolarizan durante la capacitación (Chávez et al., 2013; Sánchez-Carranza et al., 2015). En cualquier caso, estos espermatozoides no pueden gatillar la EA inducida por agonistas, lo que sugiere que la hiperpolarización es un proceso crítico y necesario para este evento (Santi et al., 2010). En humanos, se ha informado que además de SLO3, otros canales como SLO1 (Mannowetz et al., 2013), CFTR y ENaC (Puga Molina et al., 2017; Puga Molina et al., 2018a) también están involucrados en el control del Em. La inhibición de CFTR en los espermatozoides humanos también previno la EA inducida por Prog o A23187, resaltando el papel crucial de la hiperpolarización de la membrana en la preparación para la exocitosis acrosomal (Puga Molina et al., 2018a). Aunque los espermatozoides de ratón que carecen de SLO3 no pueden hiperpolarizarse durante la capacitación, la hiperpolarización aún puede ser promovida por la incubación de los espermatozoides en niveles bajos de Na^+ o en presencia de Amiloride, para bloquear ENaC (Chávez et al., 2013; Hernández-González et al.,

2006), lo que indica que la permeabilidad electrogénica del Na^+ se encuentra funcional y presente en espermatozoides de ratón, así como en espermatozoides humanos (Puga Molina et al., 2018a).

A pesar del papel crítico del Em en la EA, aún se desconoce cómo la hiperpolarización produce que los espermatozoides estén listos para desencadenar la EA en respuesta a un agonista. Resultados previos demostraron que la hiperpolarización de los espermatozoides es necesaria y suficiente para permitir que los espermatozoides de ratón induzcan la EA (De La Vega-Beltran et al., 2012). En dicho estudio, se evaluaron tres fármacos diferentes para inducir la hiperpolarización del Em los cuales actúan mediante diferentes mecanismos: Valinomicina (promueve la salida de K^+), Amiloride (bloquea la entrada de Na^+ por ENaC) y Genisteína (estimula CFTR y, por lo tanto, bloquea la entrada de Na^+ por ENaC). Independientemente del enfoque farmacológico utilizado para inducir la hiperpolarización del Em, los espermatozoides de ratón NC hiperpolarizados pueden desencadenar la EA tras la estimulación con ZP solubilizado (sZP), K^+ o A23187. Es importante señalar que cuando se bloqueó la hiperpolarización inducida por la capacitación manteniendo el Em fijo con Valinomicina y K^+ 70 mM (manteniendo a las células con un Em despolarizado), se inhibió la inducción de la EA tanto con sZP como por K^+ (De La Vega-Beltran et al., 2012). Vale la pena mencionar que, bajo esta condición, los espermatozoides de ratón aún podían experimentar otros eventos asociados con la capacitación, como la fosforilación de proteínas en residuos tirosina. De manera similar, en esta tesis, mostramos que la hiperpolarización del Em también es necesaria y suficiente para preparar los espermatozoides humanos para realizar la EA inducida por agonistas, sin interferir con eventos asociados a la capacitación como es la fosforilación de tirosina.

Nuestro objetivo fue investigar cómo un cambio en el Em prepara la célula para inducir de manera regulada la EA. Exploramos el rol del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a su importancia en la EA espermática, ya que se sabe que: 1) el Ca^{2+} es crítico para la capacitación espermática (Visconti et al., 1995); 2) los espermatozoides incubados en ausencia o con bajas concentraciones de Ca^{2+} no sufren EA. Esto se debe a que este catión es fundamental para la maquinaria de fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática (Michaut et al., 2000);

3) la dinámica de la actina está controlada por varias fosfatasas y enzimas de corte de los filamentos de actina dependientes de Ca^{2+} (Pelletier et al., 1999; Wang et al., 2005) y 4) la liberación de Ca^{2+} del compartimento acrosomal es esencial para la exocitosis (De Blas et al., 2002; Herrick et al., 2005). Al cargar los espermatozoides con la sonda sensible a Ca^{2+} , Fluo-4 AM, observamos que la hiperpolarización de la membrana inducida por Valinomicina disminuyó drásticamente las oscilaciones de Ca^{2+} en espermatozoides humanos. Esto se encuentra de acuerdo con las observaciones recientes de Torrezan-Nitao y colaboradores (Torrezan-Nitao et al., 2020). Reportes anteriores han demostrado que la presencia de un patrón oscilatorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la estimulación con Prog previene la reacción acrosomal en espermatozoides humanos (Harper y Publicover, 2005; Mata-Martínez et al., 2018; Sánchez-Cárdenas et al., 2014b). Usando la misma estrategia para monitorear tanto EA como $[\text{Ca}^{2+}]_i$, encontramos que un patrón oscilatorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a Prog inhibe la EA. Varios tipos de células utilizan un mecanismo oscilatorio de señalización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para regular funciones específicas (Charpentier et al., 2016; Lees et al., 2017; Malcuit et al., 2006). En los espermatozoides humanos, la ausencia de Ca^{2+} extracelular suprimió por completo las oscilaciones de Ca^{2+} observadas, lo que indica la importancia de la presencia de Ca^{2+} fuera de la célula (Mata-Martínez et al., 2018). A su vez, las oscilaciones de Ca^{2+} también se suprimieron en presencia de inhibidores de CatSper, lo que sugiere que, en los espermatozoides humanos, este canal está implicado en las oscilaciones de Ca^{2+} . Además, las oscilaciones de Ca^{2+} dependen de la participación de los reservorios de Ca^{2+} y bombas de Ca^{2+} intracelular (Mata-Martínez et al., 2018). Se ha reportado que la inhibición farmacológica de los receptores de IP3 y rianodina disminuye la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} , lo que sugiere que las reservas intracelulares también están involucradas (Bedu-Addo et al., 2007; Mata-Martínez et al., 2018). También se demostró que la inhibición de las bombas presentes en la membrana plasmática y/o las Ca^{2+} -ATPasas de almacenamiento interno, como PMCA4 y SPCA1, reducían la frecuencia de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} (Mata-Martínez et al., 2018). En conjunto, estos resultados indican que, en los espermatozoides humanos, las oscilaciones de Ca^{2+} son generadas por una acción concertada entre los canales iónicos y las

bombas presentes tanto en la membrana plasmática como en los reservorios intracelulares de Ca^{2+} .

Se ha sugerido que la hiperpolarización del Em de los espermatozoides elimina la inactivación de los canales de CaV3 que luego pueden abrirse con la estimulación de los agonistas. Sin embargo, esta posibilidad aún no se ha confirmado. A pesar de que se han registrado corrientes de canales de CaV3 en células espermáticas de ratón aisladas de testículos, hasta el momento no se han encontrado en espermatozoides maduros del epidídimos (Santi et al., 1996). La eliminación del gen CaV3.2 por recombinación homóloga demostró que este canal parece ser el principal contribuyente a las corrientes de CaV observadas en las células espermáticas. Además, los espermatozoides de ratones nulos para CaV3.2 mostraron una disminución en el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por una despolarización debida a K^+ . Debido a que los ratones KO para CaV3.2 son fértiles y sus espermatozoides mostraron un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por sZP, otros transportadores CaVs podrían estar participando en este proceso fundamental. En este sentido, se han encontrado varios CaV de la familia de los activados por alto voltaje (HVA) en células espermáticas de ratones maduros y espermatozoides humanos, como CaV1.2, CaV2.1 y CaV2.3. A su vez, se reportó anteriormente que la salida de esteroles y el enriquecimiento focal de GM1 desencadenan la entrada de Ca^{2+} necesaria para la EA a través de CaV2.3. De acuerdo con estos datos, los espermatozoides que carecen de la subunidad $\alpha 1\text{E}$ formadora de poros de CaV2.3 mostraron respuestas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ alteradas, EA reducida y un fuerte fenotipo subfértil (Cohen et al., 2014).

En esta tesis, por primera vez, encontramos evidencia que sugiere que la hiperpolarización de la membrana plasmática tiene un rol fundamental en la preparación de las células para gatillar la EA regulada por agonistas, modulando la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La hiperpolarización del Em produce un cambio dramático en la señalización de Ca^{2+} . La presencia de oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células no capacitadas, surge como un mecanismo inhibitorio que utilizan los espermatozoides para prevenir la inducción prematura de la EA. La hiperpolarización del Em promueve el cambio de la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ frente a un inductor como la Prog, de un patrón de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscilatorio a un aumento transitorio o sostenido de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De esta manera, se libera la señal inhibitoria y

los espermatozoides se encuentran listos para inducir la EA frente a un agonista. Desde un punto de vista translacional, un trabajo reciente observó que la presencia de oscilaciones de Ca^{2+} se asocia con un mejor resultado de FIV (Kelly et al., 2018), lo que enfatiza la importancia de nuestro estudio.

CAPÍTULO II:
LA HIPERPOLARIZACIÓN DEL POTENCIAL DE
MEMBRANA ES NECESARIA PARA LA MIGRACIÓN, LA
INDUCCIÓN DE LA EA Y LA FECUNDACIÓN *IN VIVO*.

Materiales y Métodos

Reactivos:

Los reactivos fueron obtenidos de las siguientes fuentes: Albúmina sérica bovina (BSA) A7906, ionóforo de Calcio (Ca^{2+}) A23187, progesterona (Prog), hialuronidasa y aceite mineral fueron comprados en Sigma (St. Louis, MO, USA); Valinomicina de Cayman Chemicals, (Ann Arbor, MI, USA). Ioduro de Propidio (IP) fue comprado en Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). Hoechst 33342 de Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Gonadotropina de yegua preñada (PMSG) y gonadotropina coriónica humana (hCG) fueron comprados en Syntex (Bs. As., Argentina). Vectashield fue comprado en Vector (Newark, CA, USA). Los reactivos fueron disueltos en: Hoechst y PFA en agua destilada; PSA y hialuronidasa en PBS; A23187, Prog, y Valinomicina en DMSO; PMSG y hCG en solución fisiológica salina.

Animales:

Ratones macho C57BL/6 que expresan EGFP en su acrosoma y Ds-Red2 en las mitocondrias [BDF1-Tg (CAG-*mt*DsRed2, Acr-EGFP) RBGS0020sb] (Hasuwa et al., 2010) fueron apareados con hembras SLO3 (Kcnu1) knock-out (KO) C57BL/6 (Santi et al., 2010). Las crías EGFP (fluorescencia verde) /Ds-Red2 (fluorescencia roja) KO, heterocigotas (HET) o salvajes (WT) para SLO3 fueron usadas (RGM-SLO3; RGM: Red y Green Mouse). Hembras mayores a 8 meses F1 WT (F1 de: C57BL/6 macho x BALB/c hembra) fueron súper-ovuladas. Los ratones fueron criados en condiciones de temperatura controlada y ciclos de oscuridad/luz de 12 hs (luces prendidas de 07:00 am hasta las 07:00 pm), con acceso *ad libitum* a agua de canilla y comida. Para todos los experimentos, se siguieron las guías de cuidado de animales institucionales, revisadas y aprobadas por el comité de ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina #32/2021. Además, se trabajó bajo la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio aprobado por el *National Institutes of Health* (NIH).

Medios de cultivo para espermatozoides y desarrollo embrionario:

Para la obtención y manipulación de espermatozoides murinos se utilizó el medio modificado de Toyoda-Yokoyama-Hosi (TYH modificado) (Toyoda et al., 1971).

Se utilizó como medio no capacitante (medio NC) medio TYH el cual contiene, 119,3 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,71 mM CaCl₂.2H₂O; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄.7H₂O; 0,51 mM Piruvato de Sodio, 5,56 mM Glucosa; 20 mM HEPES; y 10 µg/mL de Gentamicina. Se agregó 5 mg/ml de BSA y 15 mM de NaHCO₃ para preparar un medio que favorece la capacitación espermática (medio CAP). En todos los casos el pH fue ajustado a 7,4 utilizando NaOH.

Embriones de una célula (1C) fueron cultivados para promover el desarrollo a embriones de dos células (2C) en un medio TYH en ausencia de HEPES, con el agregado de 4 mg/ml de BSA y 25 mM de NaHCO₃ (medio TYH FIV). Para evaluar el desarrollo a blastocisto se utilizó el medio KSOM formulado de la siguiente manera: 95 mM NaCl; 2,55 mM KCl, 1,7 mM CaCl₂.2H₂O; 0,37 mM KH₂PO₄; 0,20 mM MgSO₄.7H₂O; 0,18 mM Piruvato de Sodio; 0,22 mM Glucosa, 10 mM Lactato de Sodio; 0,014 mM EDTA; 1 mM L-glutamina; 0,18 mg/ml Penicilina G; 0,05 mg/ml Estreptomicina; 1 mg/ml BSA y 25 mM NaHCO₃. Para que los medios TYH FIV y KSOM tengan pH=7,4 se los incubó *overnight* (ON) en una estufa con 5% CO₂.

Obtención y capacitación espermática:

Luego de realizar la eutanasia de los ratones macho en cámara de gas, se procedió a obtener los *caudas* de ambos epidídimos para recuperar los espermatozoides maduros. Para ello se realizó la técnica de *swim-out* (SO), se realizaron pequeños cortes en ambos caudas y se los depositó en el fondo de un tubo de 2 ml cónico el cual contiene medio NC. Se permitió que los espermatozoides naden fuera del *cauda* durante 15 min a 37°C. Luego de 15 min, se obtuvo una suspensión espermática y utilizando la cámara de Neubauer se obtuvo la concentración espermática la cual se ajustó a 10x10⁶ células/ml en el medio apropiado según el experimento. Para capacitar los espermatozoides, se los incubó en un medio TYH CAP durante 60 min a 37°C. Para inducir la hiperpolarización del Em, los espermatozoides fueron capacitados en presencia de 1 µM Val.

Determinación de la exocitosis acrosomal murina (EA) *in vitro* mediante citometría de flujo:

Para evaluar la EA *in vitro*, se utilizaron espermatozoides provenientes de ratones EGFP/Ds-Red2 los cuales contienen EGFP en el acrosoma y Ds-Red2 en las mitocondrias. Espermatozoides obtenidos por SO fueron capacitados en presencia o ausencia de 1 μ M Val, de manera de inducir farmacológicamente la hiperpolarización del Em. Una vez capacitados, se indujo la EA utilizando 30 μ M Prog, 10 μ M A23187 o DMSO (vehículo) por 30 min a 37°C. Para determinar la viabilidad celular se cargó a las células con 2 ng/ μ l de ioduro de propidio (IP) 30 segundos previos a la adquisición por el citómetro. Se utilizó el citómetro FACSCanto II TM (Biosciences; Becton, Dickinson y Company) para grabar los datos de cada evento, siendo un evento igual a una célula. Una vez adquiridos los datos se definió la población espermática realizando un gráfico de puntos en dos dimensiones: el área para el *forward-scatter* (FSC-A) y el área para el *side-scatter* (SSC-A). El FSC-A está determinado por el tamaño celular; mientras que el SSC-A lo determina la complejidad celular interna. Para tener valores representativos de las muestras se recolectaron 20.000 eventos por muestra. Para evitar la inclusión de dobletes, dos células que fueron leídas por el citómetro en simultáneo resultando en un único evento, a la población de espermatozoides se la filtró ahora al graficar el FSC-A y la altura del FSC (FSC-H). Seleccionando la población que cae en la diagonal del gráfico de puntos en dos dimensiones (FSC-A vs FSC-H) nos aseguramos de excluir dobletes y solo trabajar con eventos que representen la medida de una única célula. Se registró la fluorescencia para EGFP y IP utilizando los filtros para fluoresceína-5-isotiocianato (FITC; 530/30) y para el complejo peridinina-clorofila-proteína (PerCP 670LP) respectivamente. Los espermatozoides que carecen de fluorescencia para IP fueron clasificados como vivos. Dentro de la población de espermatozoides vivos aquellos que son positivos para EGFP tienen el acrosoma intacto, mientras que los que son negativos para la fluorescencia de EGFP se encuentran reaccionados. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo (X 10.0.7r2).

Análisis de movilidad espermática murina (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA):

Espermatozoides NC fueron diluidos utilizando medio CAP a doble concentración (CAP 2X: 10 mg/ml BSA y 30 mM NaHCO₃) para obtener una

concentración espermática final de $2,5 \times 10^6$ cel/ml. Para permitir el nado libre de los espermatozoides, se sembraron 10 μl de la suspensión de espermatozoides entre un portaobjetos y un cubreobjetos de 18x18 mm. Los parámetros espermáticos fueron medidos y analizados inmediatamente utilizando el Sperm Class Analyzer® system (SCA v.6.2.0.1.; Microptic SL, Barcelona, España). La temperatura fue controlada a 37°C utilizando un bloque termorregulador. Se adquirieron al menos 10 campos con un mínimo de 200 células fueron analizadas y con 60 cuadros por segundo. Se limpiaron los videos manualmente para eliminar toda partícula detectada que no sea un espermatozoide. La velocidad media del recorrido (VAP), la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad rectilínea (VSL), linealidad (LIN), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la rectitud (STR) fueron medidas. Espermatozoides que presentaran valores de $\text{VCL} \geq 271 \mu\text{m/sec}$, $\text{LIN} < 50\%$, y $\text{ALH} \geq 3.5 \mu\text{m}$ fueron considerados como hiperactivados (Brukman et al., 2016).

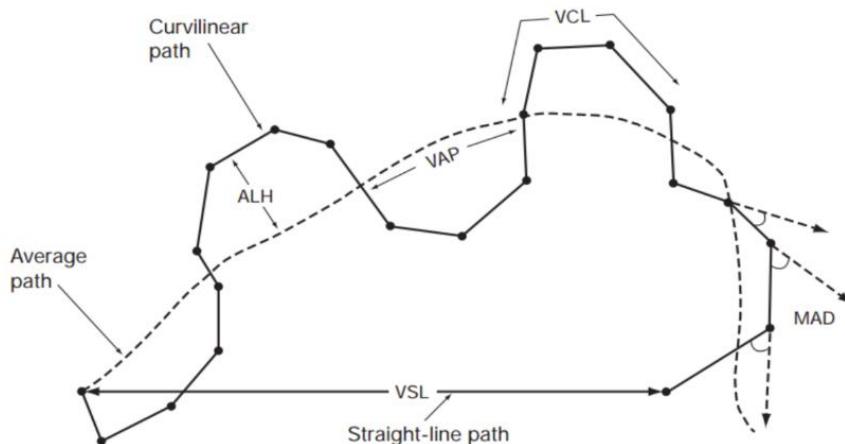


Figura 29: Esquema de la terminología de las variables medidas por el sistema CASA [Extraído de (WHO, 2010)] 1. **VCL**, velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$). Tiempo de la velocidad promedio de una cabeza de espermatozoide a lo largo de su trayectoria curvilínea real, tal como se percibe en dos dimensiones en el microscopio. Una medida del vigor celular. 2. **VSL**, velocidad lineal (rectilínea) ($\mu\text{m/s}$). Velocidad promediada en el tiempo de una cabeza de espermatozoide a lo largo de la línea recta entre su primera posición detectada y su última. 3. **VAP**, velocidad de trayectoria media ($\mu\text{m/s}$). Velocidad promediada en el tiempo de una cabeza de espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio. 4. **ALH**, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm). Magnitud del desplazamiento lateral de una cabeza de espermatozoide alrededor de su trayectoria promedio. 5. **LIN**, linealidad. La linealidad de una trayectoria curvilínea, VSL / VCL . 6. **WOB**, tambaleo. Una medida de la oscilación de la trayectoria real sobre el promedio de la ruta, VAP / VCL . 7. **STR**, rectitud. Linealidad de la vía media, VSL / VAP . 8. **BCF**, frecuencia lateral de batido (Hz). La tasa promedio a la que el camino curvilíneo cruza la trayectoria media. 9. **MAD**, desplazamiento angular medio (grados). Los valores absolutos promediados en el tiempo del ángulo de giro instantáneo de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria curvilínea.

Recolección de imágenes *in vivo* de la migración espermática:

Para evaluar la migración y la EA de los espermatozoides *in vivo*, hembras WT F1 fueron súper-ovuladas mediante inyecciones intraperitoneales de 5 IA de PMSG y 48 horas más tarde 5 IA de hCG. Se realizaron dos esquemas de apareos diferentes donde las hembras fueron apareadas con machos RGM-SLO3 WT o KO 12 horas post inyección con hCG, durante 40 minutos: esquema de Apareo AM, o luego de la inyección con hCG, por 15 hs: esquema de apareo *overnight* (ON). Los apareos se confirmaron evidenciando la presencia de tapón copulatorio en las hembras o *plug*. En ambos casos, 16 hs post hCG (4 hs post ovulación) las hembras fueron sacrificadas y se procedió a diseccionar y estirar los oviductos. Para esto, se ligaron los cuernos uterinos para evitar que los espermatozoides salgan del tracto y se peguen por fuera. Una vez estirados se los lavó con TYH CAP para asegurarnos que no haya presencia de espermatozoides por fuera del tracto. Los tractos estirados fueron montados sobre un vidrio en una cámara para luego evaluar la presencia de espermatozoides por microscopía de epifluorescencia, como fue descrito previamente por La Spina en el 2016. La temperatura (37°C) y humedad fue controlada mediante una cámara de temperatura controlada con agua (Tokai Hit) incorporada al microscopio. Las imágenes de los espermatozoides en el oviducto fueron obtenidas utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia (Olympus IX38) unido a una cámara digital (CMOS Hamamatsu Orca Flash 4.0) y un software de adquisición CellSens Dimensions (Olympus). Se obtuvieron imágenes en distintos planos focales en el eje z (Z-Stack) para la fluorescencia de Ds-Red2 proveniente de la pieza media del flagelo de los espermatozoides y la fluorescencia de EGFP de los acrosomas. Los Z-Stacks fueron realizados cada 10 µm en cada región del oviducto, utilizando los filtros U-FGWA y U-FBWA respectivamente. También se obtuvieron imágenes en mosaico del oviducto completo en una baja magnificación (4x). Las imágenes fueron procesadas utilizando el software libre ImageJ 1.53q (National Institutes of Health, USA) para contar los espermatozoides con acrosomas intactos o reaccionados dentro de cada plano del Z-Stack.

Determinación de la formación de pronúcleos:

Para evidenciar los primeros pasos de la fecundación, se evaluó la presencia de dos pronúcleos (2PN). Hembras WT súper-ovuladas fueron apareadas con machos RGM-SLO3 KO o WT, ON. 20 hs post hCG se colectaron las *ampullas* y se obtuvieron los posibles embriones de 1C a los que se les disgregó la matriz de *cumulus oophorus* con 12,5 mg/ml de hialuronidasa en medio TYH FIV durante 30 seg, o hasta que los presuntos cigotos se encontraban libres de células del *cumulus*. Fueron lavados rápidamente con medio TYH FIV y fijados con 4% de PFA durante 30 minutos, una vez fijados, se los lavó 4 veces en gotas de PBS-BSA (4 mg/ml BSA). Para evidenciar la formación de pronúcleos en aquellos oocitos que hayan sido fecundados, se los tiñó con 0,1 mg/ml de Hoechst durante 10 minutos, se los lavó con PBS-BSA y se procedió a montarlos cuidadosamente utilizando Vectashield entre porta y cubreobjetos. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia (Olympus IX38) unido a una cámara digital (CMOS Hamamatsu Orca Flash 4.0) y un software de adquisición CellSens Dimensions (Olympus). Los PN pudieron ser identificados mediante la fluorescencia de Hoechst, luz UV, o mediante microscopía diferencial de contraste por interferencia (DIC). Las imágenes fueron procesadas con ImageJ 1.53q (National Health, USA) y se obtuvieron los porcentajes de 2-PN sobre el total de oocitos observados.

Evaluación del desarrollo embrionario a blastocisto *in vitro*:

Luego de 20 hs post inyección con hCG, los complejo cumulus-oocito (COC) obtenidos de hembras apareadas fueron incubados en gotas de TYH FIV inmersas en aceite mineral. Los oocitos, posibles embriones de 1C, fueron lavados inmediatamente 3 veces con medio TYH FIV para limpiar las células del *cumulus*. Una vez limpios se los incubó en una estufa a temperatura y CO₂ constante (5% CO₂ y 37°C) durante 24 hs. Al día siguiente, se evaluó la progresión al estadio de 2C. Se cuantificó porcentaje de embriones de 2C a partir del total de oocitos obtenidos. Luego, los embriones de 2C fueron lavados e incubados en gotas de medio KSOM inmersos en aceite mineral. El medio KSOM permite el desarrollo a blastocisto. Se incubaron los embriones de 2C en estufa por 72 hs y se evaluó el desarrollo a blastocisto. Tanto los blastocitos intermedios, completamente desarrollados y eclosionados fueron considerados

como blastocistos positivos. Se cuantificó el porcentaje de desarrollo a blastocisto sobre el total de embriones de 2C.

Análisis Estadístico:

Los datos son expresados como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de al menos 3 experimentos independientes para todas las determinaciones. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA). Comparaciones paramétricas o no paramétricas fueron utilizadas según la distribución de los datos. El análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías fue utilizado para evaluar la EA *in vitro*, los parámetros obtenidos por CASA y la EA *in vivo*; seguido de la prueba de comparaciones múltiples correspondiente, detallado en cada pie de figura. La prueba de chi² fue utilizado para evaluar la asociación entre el genotipo y el éxito según el esquema de apareo. Valores de probabilidad (p) menores a 0,05 (p<0,05) fueron considerados como estadísticamente significativos.

Introducción

En el capítulo anterior describimos el mecanismo molecular por el cual un espermatozoide es capaz de inducir la EA. En este capítulo ahondaremos en el rol del Em y la EA durante la migración espermática a lo largo del tracto reproductor femenino, ya que es durante su tránsito por el oviducto, donde los espermatozoides sufren una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que en gran medida se engloban bajo el término de capacitación (CAP). Esto permite que los espermatozoides adquieran dos eventos celulares fundamentales necesarios para la fecundación. Primero, desarrollar un patrón especial de movilidad llamado hiperactivación (HA), que es esencial para la migración de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino (Ho et al., 2009; Suarez y Pacey, 2006). En segundo lugar, los espermatozoides adquieren la capacidad de realizar la exocitosis acrosomal (EA) (Austin, 1951; Chang, 1951), un tipo único de secreción regulada donde el acrosoma, una sola vesícula, se secreta después de la estimulación sin ningún reciclaje de membrana, lo que hace que este evento sea irreversible (Mayorga et al., 2007). La EA es necesaria para la relocalización de las proteínas responsables de la fusión espermatozoide-oocito, lo que hace que este evento sea indispensable para la fecundación (Inoue et al., 2005; Satouh et al., 2012).

A nivel molecular, la hiperpolarización del potencial de membrana (Em) que tiene lugar durante la capacitación es fundamental tanto para la hiperactivación como para la EA (Balestrini et al., 2021; De La Vega-Beltran et al., 2012; Torrezan-Nitao et al., 2020). El Em está regulado por la apertura/cierre de diferentes canales iónicos como CFTR/ENaC; Slo1 y SLO3 (Mannowetz et al., 2013; Puga Molina et al., 2018a; Puga Molina et al., 2018b; Santi et al., 2010). En ratones, un canal iónico de potasio (K^+) específico del espermatozoide, SLO3, es el principal regulador del Em del espermatozoide. Los ratones SLO3 *knock-out* (KO) son estériles, sus espermatozoides no hiperpolarizan el Em durante la CAP, tienen la movilidad espermática alterada, no realizan la EA y no pueden fecundar *in vitro* (Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011). La hiperpolarización farmacológica con Valinomicina, un ionóforo K^+ , permite que las células que no son capaces de iniciar la EA (espermatozoides de ratones no capacitados y SLO3 KO) respondan a estímulos induciendo la exocitosis (Balestrini et al., 2021; De La Vega-Beltran

et al., 2012). Tanto los experimentos de pérdida de función (ratón SLO3 KO) como de ganancia de función (Valinomicina) demostraron que la hiperpolarización del Em es necesaria y suficiente para preparar a las células para inducir la EA. En humanos, la importancia de la hiperpolarización del Em se asoció recientemente con la tasa de éxito en la fertilización *in vitro* (FIV) (Baro Graf et al., 2020a; Puga Molina et al., 2020).

La regulación del Em también es importante en las vías de señalización que conducen a la HA de los espermatozoides. En este sentido, la alcalinización del pH del citoplasma (pH_i) espermático activa la apertura del canal de calcio específico de los espermatozoides CatSper (Ren et al., 2001), lo que conduce al desarrollo de la HA, necesaria para la migración de los espermatozoides a través del oviducto (Ho et al., 2009; Kirichok et al., 2006; Lishko et al., 2010). En ratones, un actor clave en la alcalinización del pH es el intercambiador sNHE de Na^+/H^+ específico del espermatozoide (Wang et al., 2007). Si bien aún no se comprende cómo se activa este intercambiador, el sNHE contiene un dominio de unión a nucleótidos cuya función es completamente desconocida, lo que sugiere que el intercambiador podría estar controlado por los niveles de AMPc (Windler et al., 2018)(Windler et al., 2018). Por otro lado, sNHE contiene un dominio sensor de voltaje, lo que implica que el Em puede inducir la apertura del intercambiador del espermatozoide para inducir la alcalinización del pH_i que es necesaria para la activación de CatSper (Chávez et al., 2014; de Prelle et al., 2022; Windler et al., 2018).

A pesar de los numerosos artículos que demuestran claramente el papel crítico de la hiperpolarización del Em en la función espermática, poco se sabe sobre este fenómeno en el contexto fisiológico: el tracto reproductivo femenino. La mayoría de los datos disponibles se recopilaron a partir de experimentación *in vitro*, en la que se obtienen espermatozoides del epidídimos y la capacitación se produce *in vitro*. Es posible que estos escenarios experimentales no reflejen necesariamente lo que ocurre *in vivo*. Por ejemplo, se pensaba que la EA era inducida por la unión a la zona pelúcida (ZP) (Saling, 1989). Sin embargo, evidencia reciente de nuestro grupo y otros laboratorios demostró que *in vivo*, los espermatozoides de ratón comienzan a realizar la EA en los segmentos superiores del tracto reproductivo femenino, lejos del oocito (Hino et al., 2016;

La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016). La implicancia de la inducción de la EA en ese segmento particular del oviducto aún no se conoce. Además, los espermatozoides CatSper KO muestran enormes dificultades para migrar dentro del oviducto (Ho et al., 2009). Sin embargo, no está bien establecido si la hiperpolarización del Em es crítica para la función de CatSper y la migración de los espermatozoides *in vivo*.

Por lo tanto, en este estudio generamos un nuevo modelo de ratón cruzando ratones hembra SLO3 KO con ratones macho EGFP/DsRed2 que expresan DsRed2 en la pieza media y EGFP en el acrosoma (Hasuwa et al., 2010; Santi et al., 2010). Este nuevo modelo, ratones RGM-SLO3, nos permitió estudiar el papel de la hiperpolarización del Em *in vivo*.

Hipótesis y Objetivos

Objetivos:

Evaluar el rol del Em en un contexto fisiológico utilizando al ratón RGM-SLO3:

- 1) Evaluar cómo las alteraciones en el Em afectan la migración de espermatozoides dentro del oviducto.
- 2) Estudiar la relevancia de la hiperpolarización del Em para iniciar la EA *in vivo* en los segmentos altos del oviducto.

Hipótesis:

La hiperpolarización del Em es necesaria para la migración de los espermatozoides a lo largo del oviducto y para gatillar la EA en los segmentos altos del tracto. A su vez, espermatozoides que no inducen la EA no son capaces de migrar hacia la *ampulla*, el sitio de fecundación.

Resultados

Generación y validación de espermatozoides transgénicos que carecen de canales SLO3 y que contienen EGFP/DsRed2.

Se generó un nuevo modelo de ratón transgénico apareando ratones hembra SLO3 KO con ratones macho transgénicos EGFP/Ds-Red2 (RGM-SLO3). Los ratones RGM-SLO3 nos permitieron seguir la migración de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo femenino *in vivo*, al visualizar la fluorescencia DsRed2 y el estado acrosomal usando EGFP como marcador. Por lo tanto, este modelo nos permitió estudiar la importancia de la hiperpolarización del Em *in vivo*.

Para validar el modelo RGM-SLO3, se estudió *in vitro* la inducción de la EA en espermatozoides de ratones WT, HET y KO mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 30A, se indujo la EA en espermatozoides capacitados usando concentraciones crecientes de progesterona (Prog) o ionóforo de calcio (Ca^{2+}) A23187. La concentración de 30 μM de Prog es la mínima que indujo EA en RGM-SLO3 WT pero no en espermatozoides KO en comparación con su correspondiente control no capacitado (NC). Concentraciones más altas de Prog (50 y 100 μM) indujeron la EA en los tres genotipos. Sorprendentemente, los ratones RGM-SLO3 HET presentaron un fenotipo intermedio (Figura 30A), por lo que para todos los siguientes experimentos se usaron ratones macho RGM-SLO3 WT como control. Además, los espermatozoides se incubaron con A23187, donde los ratones RGM-SLO3 WT y HET aumentaron significativamente el porcentaje de EA, mientras que los RGM-SLO3 KO no lo hicieron. Para evaluar en profundidad este nuevo modelo de ratón, los espermatozoides se capacitaron en presencia o ausencia de Valinomicina (Val) para inducir la hiperpolarización farmacológica del Em. Los espermatozoides de ratones RGM-SLO3 WT realizaron la EA en presencia o ausencia de Val cuando se trajeron con A23187 o 30 μM Prog, mientras que los espermatozoides de ratones KO solo indujeron la EA cuando se promovió la hiperpolarización farmacológica. Estos resultados respaldan hallazgos previos que demuestran que la hiperpolarización del Em es necesaria y suficiente para que los espermatozoides realicen la EA (Balestrini et al., 2021; De La Vega-Beltran et al., 2012; Santi et al., 2010; Torrezan-Nitao et al., 2020) (Figura 30B y C).

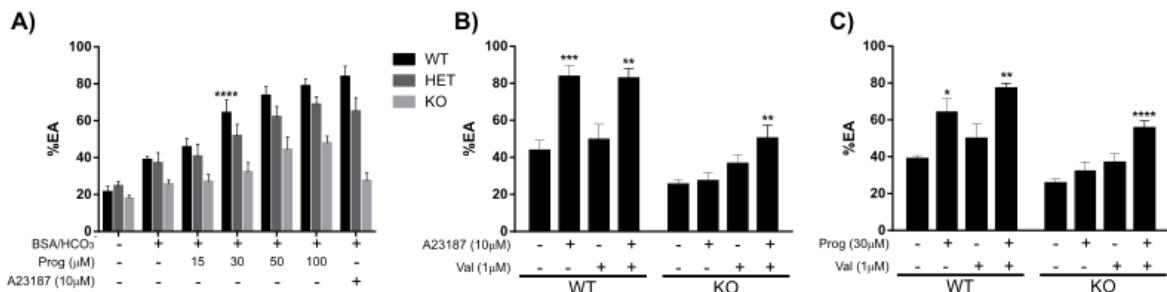


Figura 30: Evaluación de la EA *in vitro* en espermatozoides RGM-SLO3. A, Se incubaron espermatozoides vivos de ratones de *Wild Type* (WT), heterocigotos (HET) o *Knock-out* (KO) para SLO3 durante 60 minutos en un medio capacitante (CAP) y se desafiaron con una concentración creciente de progesterona (Prog) para inducir la exocitosis acrosomal (EA) durante 30 minutos; como control de EA se utilizó 10 μ M de A23187. El porcentaje de espermatozoides EA vivos se analizó mediante citometría de flujo. B-C) Se incubaron espermatozoides de ratones WT o KO durante 60 minutos en un medio CAP en presencia o ausencia de Valinomicina (VAL) 1 μ M y se indujo EA usando 10 μ M A23187 (B) o 30 μ M Prog (C). Los valores representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos diferentes (N=3). ***p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05. Se realizó ANOVA de dos vías, en combinación con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey o la prueba de comparaciones múltiples de Sidak cuando se analizó WT vs KO.

A partir de los resultados obtenidos para la EA *in vitro*, decidimos evaluar la concentración, morfología y movilidad espermática con el fin de caracterizar este nuevo modelo. Primero, no se observaron diferencias significativas en el conteo de espermatozoides obtenidos de caudas epididimarios (Figura 31A). si bien no se observaron diferencias significativas en la morfología entre los espermatozoides del ratón KO y los del WT, nos llamó la atención encontrar una mayor incidencia de morfología flagelar en horquilla en los espermatozoides del KO. Esto concuerda con lo reportado por Zeng y colaboradores (Zeng et al., 2011). (Figura 31B). Al analizar la movilidad espermática, encontramos una tendencia a que los espermatozoides de los ratones KO posean una disminución en la movilidad progresiva, HA y movilidad total en comparación al WT WT (Figura 31C-E). Estos hallazgos están de acuerdo con reportes previos sobre el fenotipo de los KO para SLO3. La diferencia entre el porcentaje de HA obtenido para los espermatozoides recuperados del SO vs los CAP se debe a que para medir los parámetros de CASA en espermatozoides obtenidos de SO se agregó medio CAP, el breve contacto con bicarbonato induce un aumento en los valores de HA que a lo largo de la capacitación disminuyen (Figura 31E). En la Figura 31F se muestran los valores obtenidos para los distintos parámetros medidos

por el sistema CASA, asociados a la movilidad HA. A pesar de no observar diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides HA (Figura 31E), encontramos varios parámetros asociados a la HA que se encuentran significativamente disminuidos en espermatozoides de ratones KO vs WT, como la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad lineal o rectilínea (VSL) y la velocidad de la trayectoria media (VAP) (ver Figura 29) (Figura 31F).

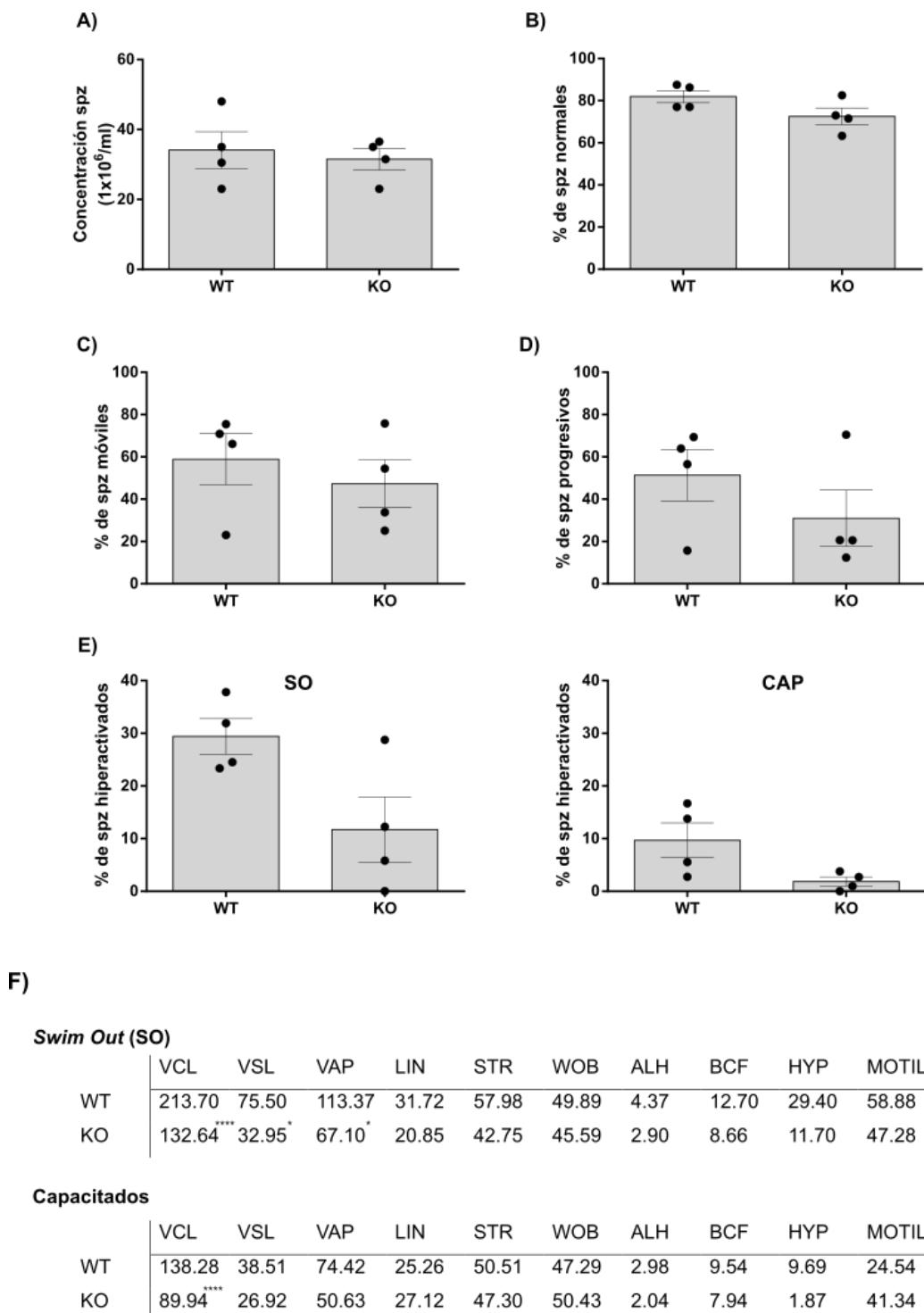


Figura 31: Análisis de la concentración, morfología flagelar y movilidad espermática en espermatozoides de ratones RGM-SLO3. A-E) Los espermatozoides (Spz) de ratones WT o KO se recuperaron del Swim-Out (SO) de cauda epidídimo durante 15 minutos. Se evaluó la concentración (A) mediante una cámara de Neubauer y se observó el porcentaje de morfología espermática normal en los espermatozoides vivos (B). Los valores representan la media \pm SEM de al menos 4 experimentos diferentes (N=4). *p>0.05. Se realizó un T-test pareado de dos colas, no paramétrico. C-D) El porcentaje de espermatozoides móviles y progresivos se analizó mediante CASA sobre espermatozoides obtenidos de SO. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 4 experimentos diferentes (N=4). E) Se graficó el porcentaje de espermatozoides hiperactivados para espermatozoides obtenidos de SO o capacitados durante 60 min (CAP). F) Valores obtenidos mediante el análisis de CASA para espermatozoides recuperados del SO o CAP. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 4 experimentos diferentes (N=4). ***p<0,0001, *p>0.05. Los valores de la tabla fueron analizados con ANOVA de dos vías, en combinación con la prueba de comparaciones múltiples de Sidak cuando se analizó WT vs KO.

Knock-Out del gen SLO3 alteró el comportamiento de apareamiento de los ratones macho.

Para investigar la migración de espermatozoides y la EA a través del tracto femenino, se realizaron dos esquemas de apareo diferentes. Se aparearon hembras WT súper-ovuladas con ratones macho RGM-SLO3 WT o KO durante 40 minutos, 12 horas después de la inyección de hCG (apareo AM) o inmediatamente después de la inyección de hCG y se dejaron durante la noche (apareo ON). Se comprobó la presencia de tapón vaginal y en todos los casos, mediante microscopía de fluorescencia, la presencia de espermatozoides en el oviducto femenino. Solo el 33,3 % y el 50 % de los apareamientos AM y ON de RGM-SLO3 KO tuvieron éxito, respectivamente. Por el contrario, el 80 % del apareamiento AM y el 100 % del apareamiento ON de machos WT dieron como resultado un apareo exitoso (Figura 32). Por lo tanto, los machos KO se aparearon menos veces en los esquemas de apareo que los ratones macho WT. Esto es consecuente con observaciones realizadas en ratones KO para la subunidad auxiliar del canal SLO3, LRRC52. Los ratones KO de LRRC52 son sub-fértiles a diferencia del KO de SLO3. La deficiencia de esta subunidad auxiliar no solo disminuyó el número de camadas obtenidas, sino también aumentó el tiempo promedio desde que se inicia el apareo hasta el nacimiento de la camada (Zeng et al., 2015). Es posible que la dificultad en realizar un

apareo exitoso, que reportamos en esta tesis, para los ratones KO de SLO3 sea parte del fenotipo infértil de este ratón.

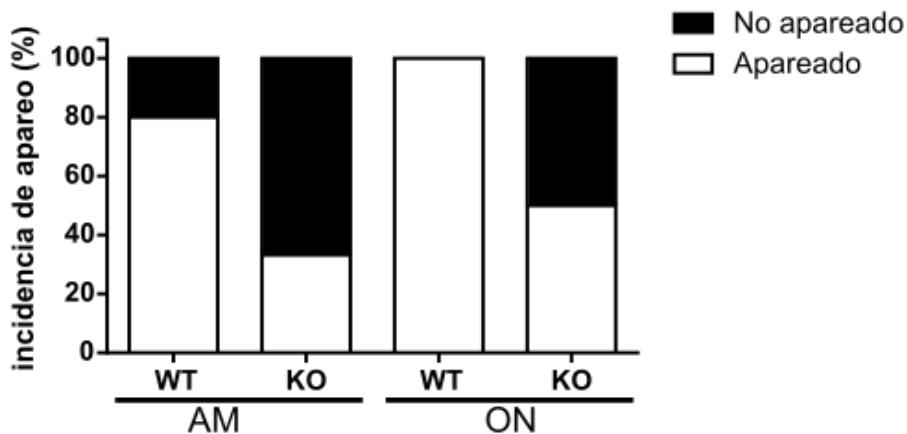


Figura 32: Comportamiento de apareamiento en ratones macho RGM-SLO3. Se aparearon ratones macho WT o KO y hembras WT súper-ovuladas. El apareamiento exitoso se evidenció por la presencia de tapón vaginal y espermatozoides en el oviducto femenino. Los ratones se aparearon a las 5 am y los tapones se revisaron 40 minutos más tarde (AM) o se aparearon durante la noche (ON), la presencia de espermatozoides en el tracto de la hembra se observó mediante microscopía de epifluorescencia. Los valores indican el porcentaje medio de al menos 5 experimentos diferentes usando 4 ratones machos diferentes para el WT y 6 experimentos diferentes usando 4 ratones machos diferentes para el KO para el apareamiento AM. Al menos 4 experimentos diferentes usando 3 ratones machos diferentes para el WT y 8 experimentos diferentes usando 4 ratones machos diferentes para el KO, para el apareamiento ON. Se realizó la prueba de chi-cuadrado para evaluar la asociación entre el genotipo y el esquema de apareamiento, $p= 0.094$ para el apareamiento AM y $p= 0.083$ para el apareamiento ON.

Espermatozoides del ratón SLO3 KO pueden migrar a través del oviducto y llegar a la ampolla de forma similar a los del WT.

Para estudiar la migración de los espermatozoides, primero se analizó la capacidad de los espermatozoides SLO3 KO para desarrollar la movilidad HA. Este tipo particular de movimiento que solo una fracción de los espermatozoides desarrolla durante la capacitación es esencial para su migración en el tracto reproductor femenino (Demott y Suarez, 1992). Los ratones que carecen del canal de calcio CatSper no pueden migrar en el oviducto y no desarrollan la HA (Ho et al., 2009). Espermatozoides de los ratones WT y KO se incubaron en condiciones de capacitación y se evaluó la HA mediante un análisis de espermatozoides asistido por computadora. Como se mostró en la Figura 31, los espermatozoides SLO3 KO tienden a desarrollar en menor medida la movilidad HA en comparación a los espermatozoides del ratón WT.

Para evaluar si los espermatozoides son capaces de migrar dentro del tracto reproductor femenino, se realizaron imágenes del tránsito de los espermatozoides a través del oviducto después de que las hembras WT superovuladas se aparearan con ratones macho RGM-SLO3 WT o KO. Se observó y contó el número de espermatozoides en la unión útero-tubárica (UTJ), el *isthmus* y la *ampulla* (AMP). Para una descripción más detallada, el *isthmus* se dividió arbitrariamente en 3 segmentos: el más cercano a la UTJ es el bajo (IB), el medio (IM) y el alto (IA) más cercano a la *ampulla* (AMP).

La observación después de 16 horas de la inyección de hCG (apareo AM), reveló que espermatozoides de los machos WT colonizaron cada segmento del oviducto como se describió previamente (La Spina et al., 2016) (Figura 33). El mayor número de espermatozoides se observó en la UTJ (~ 200 espermatozoides), el número disminuyó gradualmente a medida que los espermatozoides se acercaban a la AMP. En este último segmento se observaron muy pocos espermatozoides lo cual es consistente con observaciones reportadas previamente por varios grupos (Hino et al., 2016; La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016).

Aunque los espermatozoides de los machos KO presentan la movilidad alterada *in vitro*, se los encontró en todos los segmentos del oviducto (Figura 33A,B). En comparación con el WT, se encontraron menos espermatozoides de ratones KO en el IB (~ 200 vs 78 espermatozoides de WT y KO respectivamente), el reservorio de espermatozoides (Figura 33B). A pesar de esto, no se encontraron diferencias significativas en los segmentos superiores del oviducto. Sorprendentemente, se encontraron espermatozoides del ratón KO en la AMP, el sitio de la fecundación, en un número similar al observado en los espermatozoides WT (~ 13 espermatozoides) (Figura 33A,B). Se observó una tendencia similar cuando las hembras se aparearon durante la noche (ON) con los ratones macho WT o KO (Figura 35). Al comparar ambos esquemas de apareamiento, AM y ON, se encontraron menos espermatozoides en cada segmento del oviducto en los apareamientos ON cuando se analizó el WT. Los espermatozoides de los machos KO parecen acumularse en los segmentos inferiores del oviducto en los apareos ON, comenzando con 220 espermatozoides en la UTJ, 81 espermatozoides en IB y 30 en IM. En el IA

aproximadamente solo se encontraron 3 espermatozoides y solo se observaron en promedio 5 espermatozoides por AMP (Figura 35C). Estos hallazgos sugieren que, aunque los espermatozoides alcanzan la AMP, parecería que el Em juega un papel importante en la colonización de los segmentos superiores del tracto femenino.

En general, estos resultados indican que, aunque los espermatozoides SLO3 KO parecen tener un porcentaje de HA disminuido *in vitro*, parecen *in vivo* desarrollar la movilidad HA para progresar hacia los segmentos superiores del oviducto.

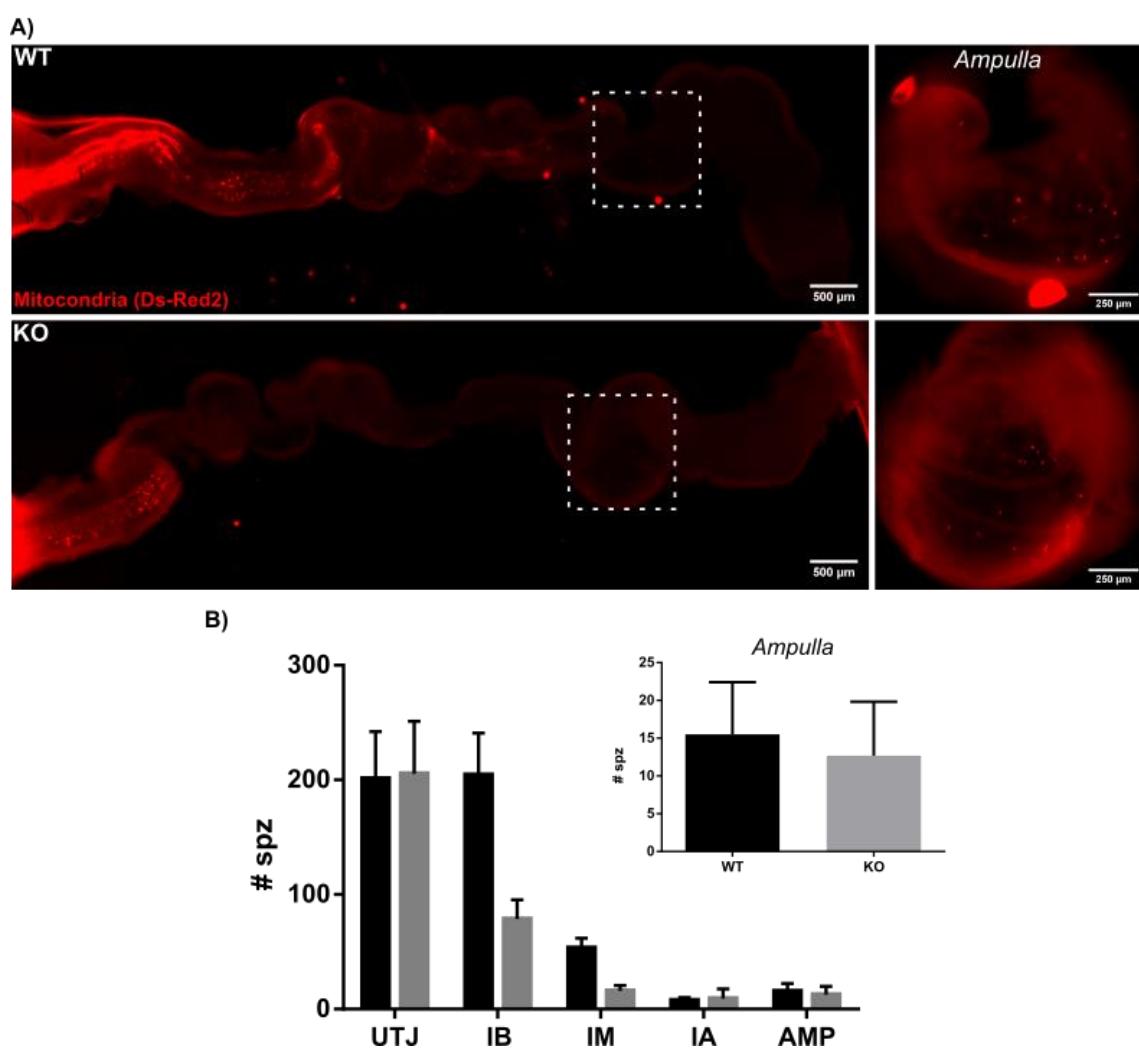


Figura 33: Evaluación de la migración espermática *in vivo* en apareos AM. Se aparearon ratones macho WT o KO y hembras WT súper-ovuladas. El apareamiento exitoso se evidenció por la presencia de tapón vaginal y espermatozoides en el tracto femenino. Los ratones se aparearon a las 5 am y los tapones se revisaron 35 minutos más tarde (AM). A) Imágenes representativas de epifluorescencia donde se observan los flagelos espermáticos marcados con DsRed2 a través del tracto femenino 4 horas después del coito. El panel superior izquierdo muestra espermatozoides de un ratón WT a través de todo el oviducto

y el panel superior derecho muestra una ampliación de la región de la *ampulla*. El panel inferior izquierdo muestra espermatozoides de un ratón KO a través de todo el oviducto y el panel inferior derecho muestra una ampliación de la región de la *ampulla*, que evidencia la presencia de espermatozoides de ratones KO en la región. B) Cuantificación del número de espermatozoides para ratones WT o KO en las diferentes regiones del oviducto, unión útero-tubárica (UTJ), *isthmus* bajo (IB), *isthmus* medio (IM), *isthmus* alto (IA) y *ampulla* (AMP). Los valores indican la media ± SEM de 4 ratones macho diferentes para WT y 3 ratones machos diferentes para KO. **p<0,01 representa la diferencia estadística entre WT y KO.

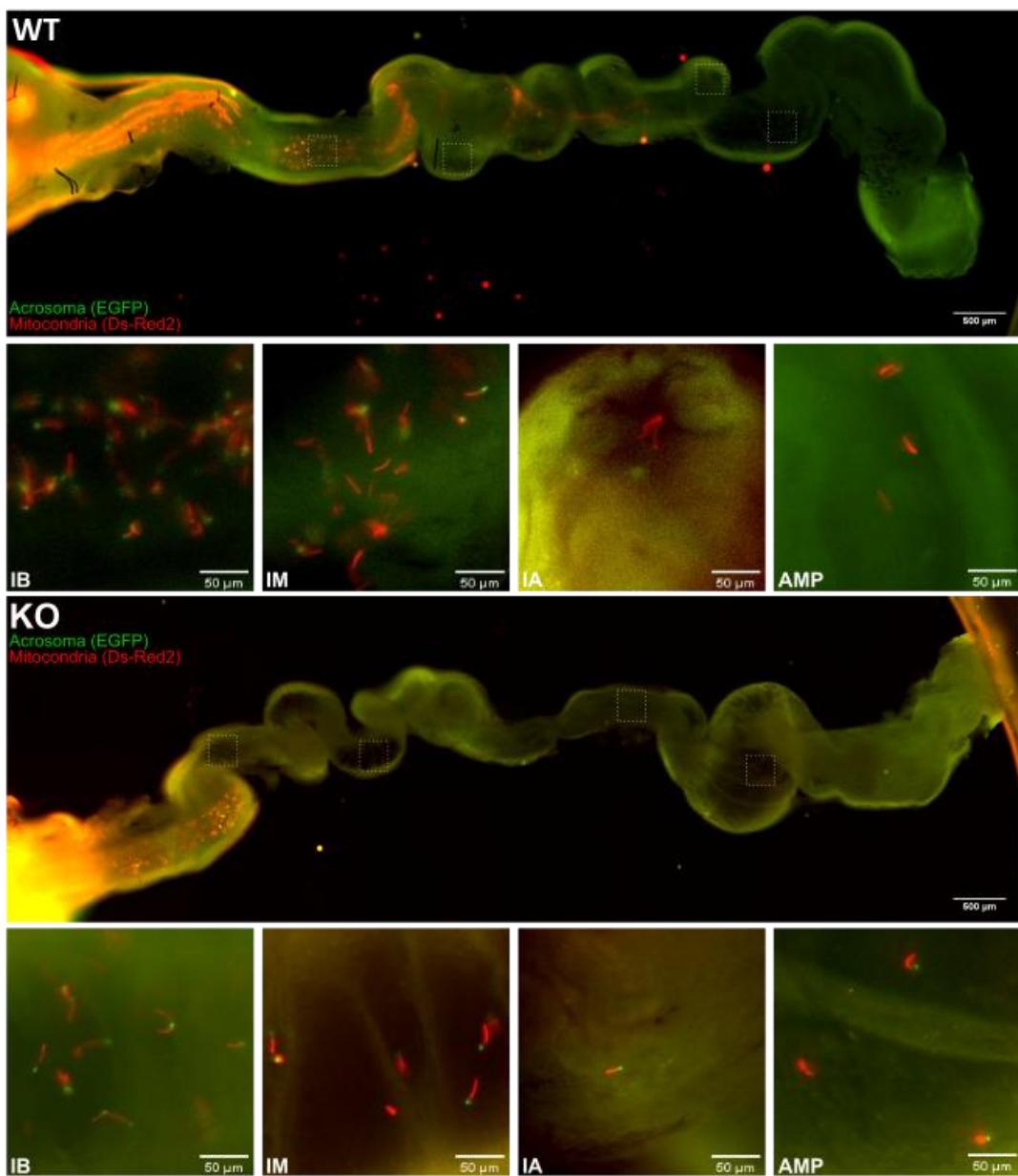
La mayoría de los espermatozoides de ratones SLO3 KO llegan al sitio de fecundación con un acrosoma intacto.

Se evaluó el estado acrosomal de los espermatozoides en cada segmento del oviducto. La presencia de fluorescencia de EGFP indica un espermatozoide con acrosoma intacto, mientras que la ausencia de EGFP denota espermatozoides que realizaron la exocitosis acrosomal. De acuerdo con la observación previa de nuestro grupo (La Spina et al., 2016), los espermatozoides de los ratones WT comienzan a experimentar la EA en el IM y el IA, y no se encontraron espermatozoides con acrosomas intactos en la AMP, cuando se realizó el apareamiento AM (Figura 34 A, B). Cuando el apareo se realizó ON, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto que encontramos en la UTJ es comparable al del apareamiento AM, pero en el *isthmus* del oviducto hay un porcentaje menor de espermatozoides con acrosoma intacto en cada segmento (Figura 34B y 35D). En promedio, solo 2 de un total de 48 espermatozoides que alcanzan la AMP tenían el acrosoma intacto, cuando se analizaron 5 AMP diferentes en los apareamientos ON (Figura 35).

Las imágenes de espermatozoides del ratón RGM-SLO3 KO revelaron que, de manera similar al WT, la mayoría de los espermatozoides en la UTJ y el *isthmus* bajo estaban predominantemente con su acrosoma intacto. Sin embargo, la diferencia más llamativa entre ambos genotipos fue que los espermatozoides de los machos KO que alcanzaron la AMP estaban en su mayoría con el acrosoma intacto (69 y 84% de los espermatozoides para el apareamiento AM y ON, respectivamente) (Figura 34 y 35). El porcentaje de espermatozoides intactos en ratones WT en la AMP fue del 0 % para el apareo AM y del 4 % para el ON (Figura 34B y 35D). En conjunto, estos resultados indican que: 1) no se requiere la inducción de la EA para la migración de los espermatozoides a través del tracto femenino *in vivo*; 2) la hiperpolarización del potencial de membrana causada por

los canales SLO3 es esencial para que los espermatozoides de ratón puedan iniciar la exocitosis acrosomal.

A)



B)

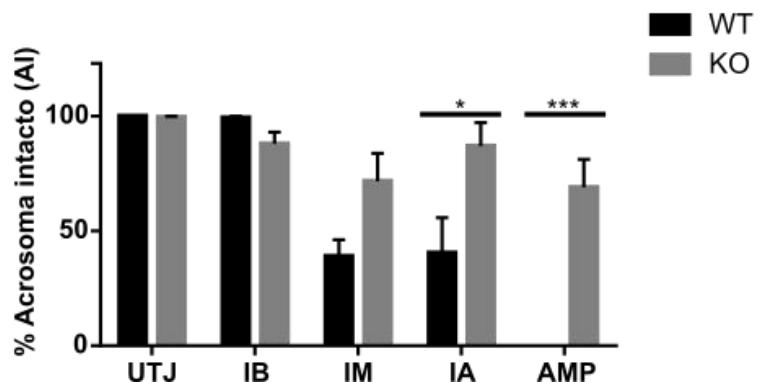


Figura 34: Exocitosis acrosomal en el oviducto femenino en apareos AM. Las hembras WT superovuladas se aparearon con ratones macho RGM-SLO3 WT o KO. La presencia de tapón vaginal y espermatozoides (Spz) en el oviducto se utilizó como indicador de apareamiento exitoso. Los ratones se aparearon a las 5 am y los tapones se revisaron 35 minutos más tarde (AM). A) Imágenes representativas de epifluorescencia de DsRed2 y EGFP visibles a través del tracto femenino 4 horas después del coito/ovulación. Los paneles superiores muestran espermatozoides del ratón WT a través de todo el oviducto y los recuadros punteados blancos representan la ubicación de las imágenes adquiridas con mayor aumento de las 4 regiones diferentes: isthmus inferior (IB), isthmus medio (IM), isthmus superior (IA) y la ampolla (AMP), que se muestran debajo. Los paneles inferiores muestran el tránsito de espermatozoides de ratones RGM-SLO3 KO a través del oviducto y los recuadros punteados blancos representan la ubicación de las imágenes adquiridas con mayor aumento de las 4 regiones diferentes: isthmus inferior (IB), isthmus medio (IM), isthmus superior (IA) y la ampolla (AMP), que se muestran debajo. B) Cuantificación del porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (AI) de ratones WT o KO en las diferentes regiones del oviducto, unión útero-tubárica (UTJ), IB, IM, IA y AMP. Los valores indican la media \pm SEM de 4 ratones macho diferentes para WT y 3 ratones machos diferentes para KO. *p<0,05, ***p<0,001 representa la diferencia estadística entre WT y KO. Se realizó ANOVA de dos vías, en combinación con la prueba de comparación múltiple de Sidak.

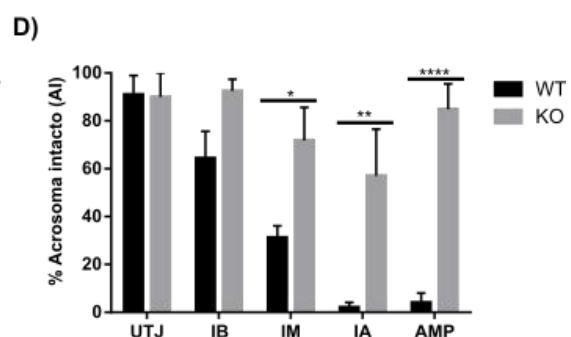
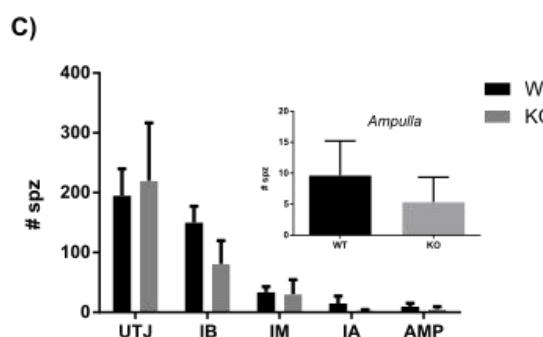
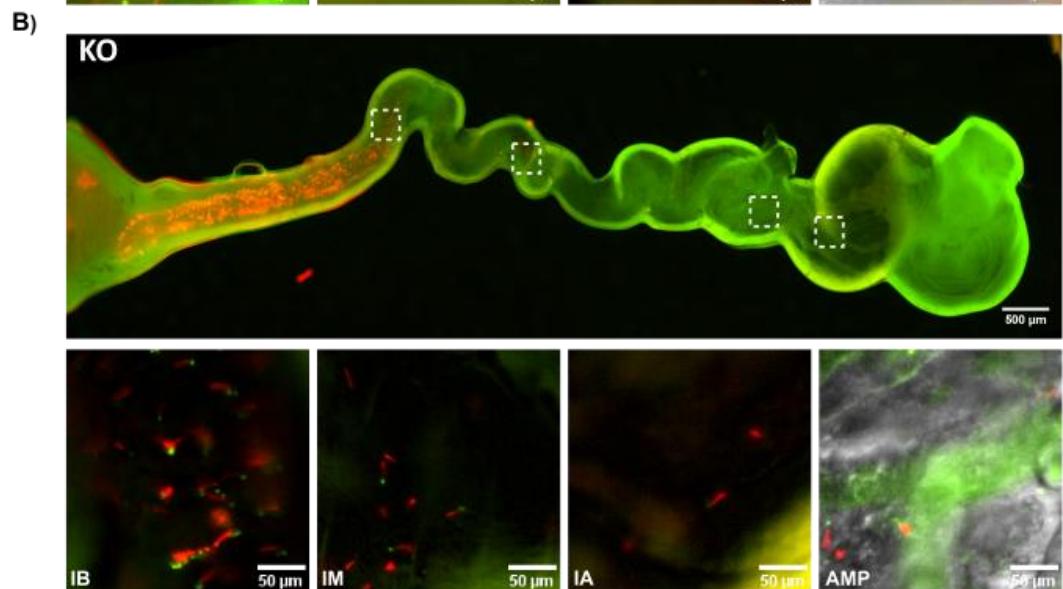
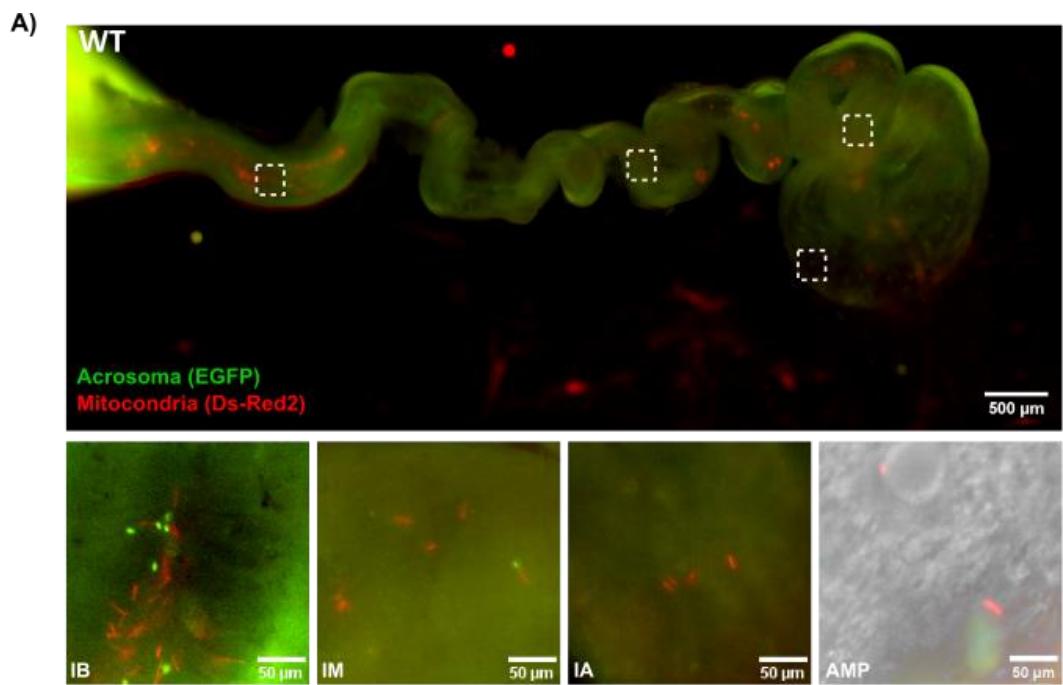


Figura 35: Migración y exocitosis acrosomal en el oviducto femenino en apareos ON. Las hembras WT súper-ovuladas se aparearon con ratones macho RGM-SLO3 WT o KO. La presencia de tapón vaginal y espermatozoides (Spz) en el oviducto se utilizó como indicador de apareamiento exitoso. Los ratones se aparearon a las 5:30 pm y se los dejó hasta las 9:00 am juntos, donde se revisaron las hembras en búsqueda de tapones vaginales, apareo overnight (ON), 4 hs post ovulación se obtuvieron los oviductos. A)

Imágenes representativas de epifluorescencia de DsRed2 y EGFP visibles a través del tracto femenino 4 horas después de la ovulación. Los paneles superiores muestran espermatozoides del ratón WT a través de todo el oviducto y los recuadros punteados blancos representan la ubicación las imágenes obtenidas con mayor aumento de las 4 regiones diferentes: *isthmus* inferior (IB), *isthmus* medio (IM), *isthmus* superior (IA) y la ampolla (AMP), que se muestran debajo. Los paneles inferiores muestran el tránsito de espermatozoides de ratones RGM-SLO3 KO a través del oviducto y los recuadros punteados blancos representan la ubicación de las imágenes adquiridas con mayor aumento de las 4 regiones diferentes: *isthmus* inferior (IB), *isthmus* medio (IM), *isthmus* superior (IA) y la ampolla (AMP), que se muestran debajo. B) Cuantificación del porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (AI) de ratones WT o KO en las diferentes regiones del oviducto, unión útero-tubárica (UTJ), IB, IM, IA y AMP. Los valores indican la media ± SEM de 4 ratones macho diferentes para WT y 3 ratones macho diferentes para KO. *p<0,05, ***p<0,001 representa la diferencia estadística entre WT y KO. Se realizó ANOVA de dos vías, en combinación con la prueba de comparación múltiple de Sidak.

Los espermatozoides de ratones SLO3-KO no fecundan *in vivo*.

A pesar de que la gran mayoría de los espermatozoides SLO3 KO que llegan a la *ampulla* permanecen con su acrosoma intacto, una proporción considerable de ellos (~20%) llegan al sitio de la fecundación con el acrosoma reaccionado (Figura 34B y 35D). Estas células serían capaces de penetrar la ZP y fusionarse con los óvulos. Para investigar si los espermatozoides que reaccionan son capaces de fertilizar los oocitos MII ovulados, se aparearon ON hembras WT súper-ovuladas con machos WT o SLO3 KO. Se usó como control negativo, hembras súper-ovuladas que no fueron apareadas. Los posibles embriones de una célula (1C) se recogieron 20 horas después de la inyección de hCG. El desarrollo al estadio de dos células (2C) se analizó al día siguiente, 44 hs post hCG.

Como era de esperar, solo el 3,75 % de los oocitos desarrollaron a embriones de 2C en el control negativo, mientras que el 90,8 % de los oocitos obtenidos de hembras apareadas con ratones macho WT desarrollaron embriones de 2C. Solo el 19,3 % de los oocitos de hembras apareadas con machos SLO3 KO alcanzaron la etapa de 2C (Figura 36A). Aunque no se encontró una diferencia significativa en el porcentaje obtenido de embriones de 2C entre el control negativo y el SLO3 KO, los embriones de 2C se transfirieron a un medio que favorece el desarrollo de blastocistos. Casi el 80 % de los embriones de 2C obtenidos de hembras apareadas con machos SLO3 WT desarrollaron a blastocisto, mientras que solo 1 del total de 52 embriones de 2C desarrollaron a blastocisto en el apareo con machos SLO3 KO (Figura 36B).

Para investigar si las proporciones de embriones de 2C (~20 %) observadas cuando se usaron machos SLO3 KO en el apareo fueron el resultado de la fecundación por este pequeño subconjunto de espermatozoides que alcanzan la AMP reaccionados, se evaluó la formación de dos pronúcleos (2-PN). En este caso, los posibles embriones de 1C recogidos *in vivo* se fijaron y tiñeron con Hoechst 33342. Solo 1 de 100 ovocitos presentó 2-PN de los apareos con machos SLO3-KO (Figura 36C). Por el contrario, en los espermatozoides de machos WT se observó cerca de ~80% de los embriones de 1C con 2-PN (Figura 36C). Este resultado indica que las observaciones anteriores se debieron a partenogénesis y se encuentran en concordancia con resultados previos obtenidos de FIV (Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011).

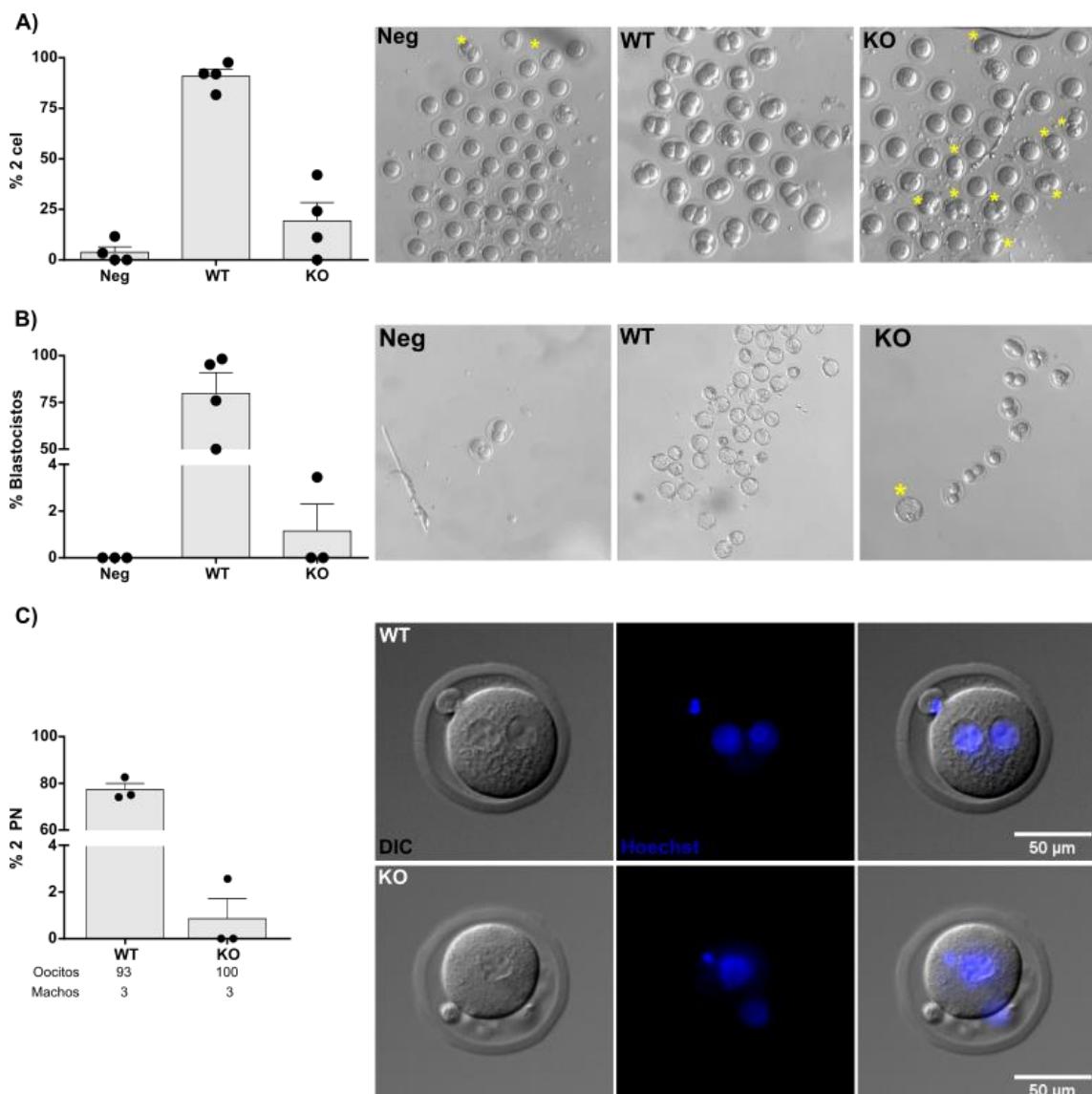


Figura 36: Evaluación de fecundación y desarrollo embrionario. Los COCs se recogieron 20 h después de la inyección de hCG de hembras WT súper-ovuladas apareadas ON con ratones macho RGM-SLO3 WT o KO o no apareadas como control negativo (Neg). La presencia de un tapón vaginal se utilizó como indicador de un apareamiento exitoso. A-C) Los COCs se lavaron para eliminar las células del cúmulo y se dejaron en la incubadora en medio TYH IVF para evaluar el desarrollo embrionario de dos células (2C). A) Se obtuvo el porcentaje de embriones de 2C para cada apareo. El panel de la derecha muestra imágenes representativas del desarrollo de 1C a embriones de 2C, de 4 experimentos independientes usando 3 pares diferentes de machos KO y WT. Los asteriscos amarillos indican la presencia de embriones de 2 células en el control Neg y KO. B) A continuación, los embriones de 2C se lavaron en medio KSOM y se incubaron durante 3 días para estudiar el desarrollo del blastocisto. Se obtuvo el porcentaje de blastocisto para cada apareo sobre el número de embriones de 2C. Se muestran imágenes representativas de cada genotipo para al menos tres experimentos independientes (N=3), los asteriscos amarillos representan la presencia de blastocisto en el apareamiento KO. C) Para evaluar la presencia de dos pronúcleos (2-PN) en embriones de 1C, los COCs obtenidos 20 h después de las inyecciones de hCG se trataron con 12,5 mg/ml de hialuronidasa durante 30 segundos o hasta que los embriones de 1C quedaron libres de células del cúmulo, los embriones de 1C se enjuagaron rápidamente, se fijaron con PFA al 4 % durante 20 minutos, luego se lavaron con PBS-BSA y finalmente se tiñeron con 0,1 mg/ml de Hoechst durante 10 minutos. La presencia de 2-PN se evaluó mediante imágenes de epifluorescencia de Hoechst. El porcentaje de 2-PN se graficó para los apareos WT y KO para tres experimentos independientes (N=3), y las imágenes representativas se muestran a la derecha, el panel superior muestra un embrión de 1C obtenido del apareamiento con machos WT y el panel inferior para el macho KO.

Discusión

La hiperpolarización del potencial de membrana que ocurre durante la capacitación es esencial para la fecundación (Chávez et al., 2014; Puga Molina et al., 2018b; Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011). En ratones y humanos, la hiperpolarización modula la señalización de Ca^{2+} , necesaria para la EA (Ver capítulo 1) (Balestrini et al., 2021; De La Vega-Beltran et al., 2012; Torrezan-Nitao et al., 2020). Cómo la mayoría de los estudios se realizaron *in vitro*, aún no se ha dilucidado la relevancia de la hiperpolarización del Em durante la capacitación *in vivo*, en el tracto reproductor femenino. En este capítulo, se evaluó el rol fisiológico de la hiperpolarización del Em en espermatozoides de ratón mediante el uso de un nuevo ratón transgénico.

Numerosas observaciones demostraron que experimentos realizados *in vitro* podrían no reflejar necesariamente lo que ocurre en un contexto fisiológico. En este sentido, casi todos los estudios que utilizan ratones como modelo para evaluar la capacitación espermática se realizan con espermatozoides obtenidos del *cauda* del epidídimo. Si bien estas células están maduras, no fueron expuestas al plasma seminal y, por lo tanto, no han sufrido cambios en la osmolaridad y el pH. Además, los espermatozoides del *cauda* epididimario no contactan con vesículas seminales que podrían proporcionar proteínas u otros componentes que pueden servir para ciertas funciones en el tracto reproductivo femenino (Mcgraw et al., 2015; Peitz y Olds-Clarke, 1986). Además, los espermatozoides del *cauda* del epidídimo nunca fueron expuestos a los fluidos y células que están presentes en el tracto reproductivo femenino. A pesar de que la capacitación se lleva a cabo en un medio definido que permite que los espermatozoides fecunden a los oocitos *in vitro* (Austin, 1951; Chang, 1951; Yanagimachi, 1994a), la eficiencia se considera muy pobre. Mientras que *in vivo*, solo se necesitan unos pocos espermatozoides que llegan al sitio de la fecundación para fecundar la mayoría de los oocitos MII, la fecundación *in vitro* se realiza en presencia de miles de espermatozoides.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de evaluar los eventos moleculares y celulares que se han asociado con la capacitación en un contexto fisiológico. La literatura está llena de ejemplos que muestran resultados contradictorios cuando se comparan las condiciones *in vivo* e *in vitro* (Mahé et al., 2021; Okabe, 2013;

Yanagimachi, 2022). Por ejemplo, las proteínas que se creía que participaban en la unión a la ZP o la fusión de espermatozoides y oocitos mediante experimentación *in vitro* no mostraron un fenotipo significativo cuando fueron eliminadas (ver varios ejemplos en (Mahé et al., 2021; Okabe, 2013; Yanagimachi, 2022)). Otro ejemplo es la inducción de la fosforilación de proteína en residuos tirosina (pY) que se produce durante la capacitación *in vitro* y que fue ampliamente estudiada durante años. Un informe reciente mostró que los espermatozoides que llegan a la *ampulla* carecen de pY, lo que cuestiona la relevancia de pY durante la capacitación *in vivo* (Ded et al., 2020). De manera similar, se pensaba que la EA era inducida por la unión de los espermatozoides a la ZP (Saling et al., 1979); estas conclusiones se derivaron de experimentos *in vitro* en los que se usó ZP solubilizada (Buffone et al., 2009; Ren y Xia, 2010). Sin embargo, las observaciones *in vivo* de espermatozoides con EGFP demostraron que los espermatozoides inducen la EA antes de contactar con la ZP en los segmentos superiores del oviducto (Hino et al., 2016; La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016).

Por lo tanto, para investigar el rol de la hiperpolarización del Em de los espermatozoides *in vivo*, se utilizó un nuevo ratón transgénico cruzando espermatozoides EGFP/DsRed2 con ratones SLO3 KO. Estos ratones se usaron para evaluar el papel del Em en los espermatozoides dentro del oviducto con dos objetivos principales: 1) Estudiar la migración de los espermatozoides mediante la detección de la fluorescencia de DsRed2; 2) investigar si la hiperpolarización Em es necesaria para EA *in vivo* mediante la evaluación de la presencia de EGFP. En comparación con los espermatozoides WT, los ratones RGM-SLO3 KO presentaron una concentración de espermatozoides similar, pero presentaron una morfología de la cola particular y una movilidad progresiva e hiperactivada reducida. En concordancia con reportes previos sobre los ratones SLO3 KO (Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011) no lograron gatillar la EA.

Para migrar a través del tracto reproductor femenino, los espermatozoides requieren la movilidad HA (Ho et al., 2009). Además, los movimientos peristálticos del oviducto juegan un papel en el ascenso de los espermatozoides a la *ampulla* (Fujihara et al., 2018). A su vez, se ha demostrado que el transporte a la *ampulla* es más rápido durante el período peri-ovulatorio (Hino y

Yanagimachi, 2019). Se ha propuesto que son necesarios otros mecanismos para la guía de los espermatozoides, como la termotaxis (Bahat et al., 2003; De Toni et al., 2016), la quimiotaxis (Gatica et al., 2013) y la reotaxis (Miki y Clapham, 2013). Este último mecanismo ha sido cuestionado recientemente por observaciones que indican que el flujo en el tracto femenino va desde el útero hasta la *ampulla* (Bianchi et al., 2021; Hino y Yanagimachi, 2019).

Aunque los espermatozoides SLO3 KO presentan una movilidad HA reducida *in vitro*, encontramos que son capaces de ascender a través de la UTJ y colonizar todos los segmentos del oviducto. Se encontró que el número de espermatozoides que coloniza el *isthmus* bajo está ligeramente reducido en los oviductos de los apareos con ratones KO en comparación con los WT. El *isthmus* bajo es considerado el reservorio de espermatozoides donde éstos interactúan con el epitelio, y se requiere de la movilidad HA para que los espermatozoides se desprendan y nadan libremente hacia la *ampulla* (Suarez, 2016; Suarez y Pacey, 2006). Esto está de acuerdo con las observaciones de ratones Ppp3cc KO y ratones Catsper1 KO, donde la movilidad de los espermatozoides se ve afectada y, por lo tanto, la migración a través de la UTJ se ve reducida (Ded et al., 2020; Ho et al., 2009; Miyata et al., 2015). En estos ratones KO, menos espermatozoides pudieron llegar a la *ampulla* en comparación con los WT, lo que indica que no solo el flujo de los oviductos y las contracciones peristálticas son necesarios para la migración, sino que, la capacidad de los espermatozoides para HA es también fundamental. Nuestros resultados mostraron que, aunque se encontró que el conteo de espermatozoides en el *isthmus* bajo se redujo en el RGM-SLO3 KO, éstos fueron capaces de colonizar todos los segmentos del oviducto de manera similar al WT.

En ausencia de la hiperpolarización del Em, podría activarse la movilidad HA durante la CAP *in vivo*, en contraste con lo observado en Catsper 1 y Ppp3cc KO (Ded et al., 2020; Ho et al., 2009; Miyata et al., 2015). Se postula que la hiperpolarización de Em activa el NHE específico del espermatozoide (sNHE) a través de su dominio de detección de voltaje (Windler et al., 2018). A su vez, sNHE promueve la alcalinización citoplasmática para inducir la apertura de CatSper, lo que resulta en un aumento del Ca^{2+} intracelular requerido para la movilidad HA (de Prelle et al., 2022; Hwang et al., 2019). Por lo tanto, en

ausencia de canales SLO3, es probable que otro mecanismo compensatorio induzca la alcalinización del pH citoplasmático para activar CatSper. Entre ellos, la entrada de HCO_3^- puede darse a través de diferentes co-transportadores como NBC y NKCC (Arcelay et al., 2008; Puga Molina et al., 2018a; Wertheimer et al., 2008) o mediante otro transportador asociado al canal CFTR (Chávez et al., 2012). También es posible que las anhidrasas carbónicas (José et al., 2015; Wandernoth et al., 2010) u otros NHE (Chen et al., 2016) puedan contribuir a la alcalinización del pH. Independientemente del mecanismo involucrado, los espermatozoides SLO3 KO serían capaces de desarrollar HA *in vivo* para llegar a la *ampulla*. Este es otro ejemplo de discrepancias entre las observaciones *in vivo* e *in vitro*.

La inducción de la EA *in vivo* se analizó visualizando la presencia de EGFP en diferentes secciones del oviducto. Sorprendentemente, se observó que más del 80% de los espermatozoides SLO3 KO llegan con el acrosoma intacto a la *ampulla*, en contraste con los espermatozoides WT, donde prácticamente todos llegan al sitio de la fecundación con el acrosoma reaccionado. Este resultado tiene numerosas implicaciones. Primero, se confirma experimentalmente que el Em es importante para preparar a las células para gatillar la EA. Sin embargo, un número significativo (~20 %) de espermatozoides de ratones SLO3 KO llegó con el acrosoma reaccionado a la *ampulla*. Hay al menos dos posibles explicaciones para esta observación. En primer lugar, esto podría deberse a la EA espontánea, como también se observó en experimentos *in vitro*. La ocurrencia de la EA espontánea se observa en espermatozoides KO incubados en condiciones NC o CAP o en presencia de activadores del proceso. En segundo lugar, la hiperpolarización del Em puede compensarse parcialmente a través de otro mecanismo, como la activación de SLO1 y/o CFTR/ENaC, aunque la presencia del primero es controvertida en ratones. Además, estos resultados demuestran que la EA no es necesaria para la migración de los espermatozoides a través del oviducto. Previo a este resultado no se sabía el rol que tenía la EA en los segmentos altos del *isthmus*, a una distancia considerable de los oocitos y las capas que los rodean.

Está muy bien establecido que los espermatozoides que reaccionan son las células que pueden penetrar la ZP y fecundar los oocitos (Jin et al., 2011).

Debido a que algunos espermatozoides que llegaron a la *ampulla* se encontraban reaccionados, evaluamos si éstos eran capaces de fecundar. Sin embargo, cuando los ratones SLO3 KO se aparearon con hembras WT no se observó formación de 2-PN, lo que indica que la ausencia de SLO3 o la ocurrencia temporal deficiente de la EA impidió que los espermatozoides fecundaran los oocitos. La falta de fecundación de los oocitos podría explicarse por 1) los espermatozoides SLO3 KO no son capaces de penetrar la ZP; ó 2) no pueden fusionarse con la membrana plasmática del oocito. La evidencia previa que muestra que los espermatozoides SLO3 KO no pueden fusionarse con los oocitos respalda la segunda opción (Santi et al., 2010). De acuerdo con otros informes, no se observaron crías en las cruzas con machos SLO3 KO (Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011).

Como se muestra en nuestros experimentos *in vitro*, la Valinomicina surge como un posible método para superar la deficiencia de hiperpolarización en ratones SLO3 KO. Esto sería particularmente interesante como método para tratar pacientes que realizan tratamientos de reproducción asistida, ya que varios trabajos realizados en humanos han demostrado que la hiperpolarización del Em asociada a la capacitación se correlaciona con las tasas de éxito de la FIV (Baro Graf et al., 2020a; Puga Molina et al., 2020).

CONCLUSIÓN

Los espermatozoides maduros se enfrentan a escenarios con distintas composiciones iónicas: *in vivo* a lo largo de su trayecto desde el testículo hasta la *ampulla* en el tracto reproductor femenino e *in vitro* en medios de cultivo. Estos cambios extracelulares impactan sobre la composición iónica intracelular, iniciando la CAP espermática. El rápido ingreso de HCO_3^- mediado por NBC (Puga Molina et al., 2018a) induce el ingreso de Ca^{2+} en una subpoblación de espermatozoides, mediado por CatSper (Luque et al., 2018). La apertura de CatSper se encuentra asociada a la alcalinización del pH_i y la hiperpolarización del Em (Chávez et al., 2014), generando el aumento de Ca^{2+} necesario para desencadenar dos eventos fundamentales: la HA y la EA (Vyklicka y Lishko, 2020). De esta manera, la activación de mecanismos moleculares durante la capacitación culmina en eventos fisiológicos necesarios para la fecundación. En esta tesis estudiamos cómo los cambios en el Em, inducidos por la CAP, repercuten sobre eventos moleculares tales como la dinámica del calcio intracelular, resultando en la adquisición de la movilidad HA y la EA, esenciales para la fecundación en mamíferos.

En primer lugar, en esta tesis describimos el rol fundamental que tiene la hiperpolarización del Em en la inducción de la EA en dos especies distintas (en humano y ratón), tanto *in vitro* como *in vivo*. Únicamente aquellos espermatozoides que se encuentran hiperpolarizados pueden responder a un estímulo y realizar la EA. En este sentido, encontramos que el Em modula la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ permitiendo la exocitosis del acrosoma inducido por agonistas. Por otro lado, a partir de observaciones realizadas *in vitro*, donde reportes previos demostraron la importancia del canal SLO3 en la apertura de CatSper (Chávez et al., 2014), y en la movilidad espermática (Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011) nos propusimos estudiar la migración de espermatozoides de ratones KO para SLO3. A partir de esas observaciones postulamos nuestra hipótesis: en ausencia de SLO3, no se induciría la hiperpolarización de membrana necesaria para el ingreso de Ca^{2+} citoplasmático mediado por CatSper. De esta manera, la adquisición de la movilidad HA, necesaria para despegarse de las células epiteliales del oviducto y avanzar hasta el sitio de

fecundación se vería fuertemente afectada. Para nuestra sorpresa, en nuestros experimentos *in vivo* encontramos que los espermatozoides de ratones KO para SLO3, no solo son capaces de atravesar la UTJ, sino también de migrar hacia la *ampulla*. Estos resultados indicarían que, los espermatozoides son capaces de adquirir *in vivo* la movilidad HA independientemente de SLO3, contrario a reportes realizados *in vitro* (Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011). Teniendo en cuenta las discrepancias que se han observado y fueron descriptas en esta tesis entre observaciones *in vitro* vs *in vivo*, consideramos que los espermatozoides son capaces de inducir la alcalinización del pH_i necesario para la HA y de esta manera llegar hasta los oocitos. Por otro lado, un porcentaje bajo de espermatozoides de ratones SLO3 KO se encontraron reaccionados en la *ampulla*. Este porcentaje podría deberse a la EA espontánea, observada también *in vitro*. La relevancia de la EA espontánea no se conoce, se la ha asociado a la manipulación de las gametas y/o a la muerte celular, se reportó que estos espermatozoides no son capaces de unirse a la ZP, ni de fecundar a los oocitos (Saling, 1989). A pesar de que los espermatozoides sean capaces de alcanzar el sitio de fecundación y algunos realicen la EA, no son capaces de fecundar a los oocitos. Esto demuestra que la hiperpolarización del Em es necesaria para la EA inducida y la fecundación en mamíferos. De esta manera, el Em y el Ca²⁺ actúan mediando las vías de señalización que se encienden en un compartimento, el flagelo, sobre otro compartimento, la cabeza, permitiendo así que el espermatozoide realice la EA frente a un inductor.

Reportes de otros grupos demostraron que la hiperpolarización del Em correlaciona positivamente con la FIV (Baro Graf et al., 2020a; Puga Molina et al., 2020) y con donantes con paternidad conocida (Matamoros-Volante et al., 2020). Asimismo, se encontró que las oscilaciones de Ca²⁺ en espermatozoides humanos, correlaciona con el éxito en la FIV (Kelly et al., 2018). Los resultados de esta tesis generan un aporte significativo en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la adquisición de la capacidad de respuestas de los espermatozoides a agonistas de la EA y a su vez, el rol fundamental que tiene la hiperpolarización de membrana en la fecundación en mamíferos. En este contexto, la modulación del Em surge como un posible método para regular la fecundación en mamíferos. La utilización de Valinomicina

en técnicas de reproducción asistida podría favorecer el éxito de la FIV. Mientras que, favorecer la despolarización del E_m y/o mantener las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$, podría utilizarse como un método anticonceptivo.

PERSPECTIVAS A FUTURO

- Evaluar qué canales modulados por el Em inducen los distintos patrones de aumento de $[Ca^{2+}]_i$. En este sentido realizar medidas de célula única utilizando inhibidores/activadores de distintos canales de Ca^{2+} . A su vez, evaluar si la acción de Prog y KCl sobre los patrones de Ca^{2+} son inducidos por las mismas vías.
- A partir de los resultados obtenidos *in vivo*, donde encontramos que los espermatozoides son capaces de migrar hasta la *ampulla*, es nuestra intención primero evaluar la HA. Ya que observar la HA *in vivo* presenta ciertas dificultades técnicas (el flagelo de los RGM-SLO3 presenta fluorescencia roja únicamente en la pieza media), es de nuestro interés estudiar la alcalinización del pH_i necesaria para la apertura de CatSper y subsecuente adquisición de la movilidad HA. En este sentido, evaluaremos mediante citometría de flujo el pH_i en relación al Em.
- Para evaluar si la Valinomicina podría utilizarse como tratamiento en espermatozoides de pacientes, nos proponemos inseminar hembras con espermatozoides de machos SLO3 KO pre-tratados con Val y evaluar su migración, la inducción de la EA y el número de camadas y crías obtenidas de los apareos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, K., Takano, H. and Ito, T.** (1984). Microvasculature of the mouse epididymis, with special reference to fenestrated capillaries localized in the initial segment. *Anat. Rec.* **209**, 209–218.
- Achikanu, C., Pendekanti, V., Teague, R. and Publicover, S.** (2018). Effects of pH manipulation, CatSper stimulation and Ca²⁺-store mobilization on [Ca²⁺]i and behaviour of human sperm. *Hum. Reprod.* **33**, 1802–1811.
- Aguilar, J. and Reyley, M.** (2005). The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. *Anim. Reprod.* **2**, 91–105.
- Aitken, R. J., Nixon, B., Lin, M., Koppers, A. J., Lee, Y. H. and Baker, M. A.** (2007). Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J. Androl.* **9**, 554–564.
- Alasmari, W., Costello, S., Correia, J., Oxenham, S. K., Morris, J., Fernandes, L., Ramalho-Santos, J., Kirkman-Brown, J., Michelangeli, F., Publicover, S., et al.** (2013). Ca²⁺ Signals Generated by CatSper and Ca²⁺ Stores Regulate Different Behaviors in Human Sperm. *J. Biol. Chem.* **288**, 6248–6258.
- Alvau, A., Battistone, M. A., Gervasi, M. G., Navarrete, F. A., Xu, X., Sánchez-Cárdenas, C., de la Vega-Beltran, J. L., da Ros, V. G., Greer, P. A., Darszon, A., et al.** (2016). The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Dev.* **143**, 2325–33.
- Arcelay, E., Salicioni, A. M., Wertheimer, E. and Visconti, P. E.** (2008). Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 463–72.
- Ardon, F., Markello, R. D., Hu, L., Deutsch, Z. I., Tung, C. K., Wu, M. and Suarez, S. S.** (2016). Dynamics of Bovine Sperm Interaction with Epithelium Differ Between Oviductal Isthmus and Ampulla. *Biol. Reprod.* **95**,
- Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villaz, M. and Florman, H. M.** (1999). Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6757–62.

- Austin, C. R.** (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.* **4**, 581–596.
- Austin, C. R.** (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* **170**, 326.
- Austin, C. R. and Bishop, M. W. H.** (1958). Capacitation of Mammalian Spermatozoa. *Nature* **181**, 851–851.
- Avidor-Reiss, T., Mazur, M., Fishman, E. L. and Sindhwan, P.** (2019). The Role of Sperm Centrioles in Human Reproduction - The Known and the Unknown. *Front. cell Dev. Biol.* **7**,
- Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S. and Toyoda, Y.** (1994). Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J. Biol. Chem.* **269**, 31845–9.
- Bahat, A., Tur-Kaspa, I., Gakamsky, A., Giojalas, L. C., Breitbart, H. and Eisenbach, M.** (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: A potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat. Med.* **9**, 149–150.
- Baibakov, B., Gauthier, L., Talbot, P., Rankin, T. L. and Dean, J.** (2007). Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* **134**, 933–943.
- Bailey, J. L.** (2010). Factors regulating sperm capacitation. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **56**, 334–48.
- Balestrini, P. A., Sanchez-Cardenas, C., Luque, G. M., Baro Graf, C., Sierra, J. M., Hernández-Cruz, A., Visconti, P. E., Krapf, D., Darszon, A. and Buffone, M. G.** (2021). Membrane hyperpolarization abolishes calcium oscillations that prevent induced acrosomal exocytosis in human sperm. *FASEB J.* **35**,
- Balhorn, R.** (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* **8**, 227.
- Baro Graf, C., Ritagliati, C., Torres-Monserrat, V., Stival, C., Carizza, C., Buffone, M. G. and Krapf, D.** (2020a). Membrane Potential Assessment by Fluorimetry as a Predictor Tool of Human Sperm Fertilizing Capacity. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 383.
- Baro Graf, C., Ritagliati, C., Stival, C., Luque, G. M., Gentile, I., Buffone, M. G. and Krapf, D.** (2020b). Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation. *Mol. Cell.*

Endocrinol. **518**,

- Barrachina, F., Battistone, M. A., Castillo, J., Mallofré, C., Jodar, M., Breton, S. and Oliva, R.** (2022). Sperm acquire epididymis-derived proteins through epididymosomes. *Hum. Reprod.* **37**, 651–668.
- Barratt, C. L. R., Aitken, R. J., Bjorndahl, L., Carrell, D. T., de Boer, P., Kvist, U., Lewis, S. E. M., Perreault, S. D., Perry, M. J., Ramos, L., et al.** (2010). Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications--a position report. *Hum. Reprod.* **25**, 824–838.
- Bedford, J. M.** (1994). The status and the state of the human epididymis. *Hum. Reprod.* **9**, 2187–2199.
- Bedford, J. M. and Kim, H. H.** (1993). Cumulus oophorus as a sperm sequestering device, *in vivo*. *J. Exp. Zool.* **265**, 321–328.
- Bedu-Addo, K., Barratt, C. L. R., Kirkman-Brown, J. C. and Publicover, S. J.** (2007). Patterns of $[Ca^{2+}]$ (i) mobilization and cell response in human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev. Biol.* **302**, 324–32.
- Benoff, S.** (1997). Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 599–637.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D. and Wright, G. J.** (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* **508**, 483–487.
- Bianchi, E., Sun, Y., Almansa-Ordonez, A., Woods, M., Goulding, D., Martinez-Martin, N. and Wright, G. J.** (2021). Control of oviductal fluid flow by the G-protein coupled receptor Adgrd1 is essential for murine embryo transit. *Nat. Commun.* **12**.
- Bleil, J. D. and Wassarman, P. M.** (1980). Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* **20**, 873–82.
- Bleil, J. D. and Wassarman, P. M.** (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* **95**, 317–324.
- Bleil, J. D., Greve, J. M. and Wassarman, P. M.** (1988). Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev. Biol.*

128, 376–385.

- Borland, R. M., Hazra, S., Biggers, J. D. and Lechene, C. P.** (1977). The elemental composition of the environments of the gametes and preimplantation embryo during the initiation of pregnancy. *Biol. Reprod.* **16**, 147–57.
- Branham, M. T., Mayorga, L. S. and Tomes, C. N.** (2006). Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* **281**, 8656–8666.
- Braun, T. and Dods, R. F.** (1975). Development of a Mn²⁺ sensitive, “soluble” adenylate cyclase in rat testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 1097–1101.
- Bray, C., Son, J.-H., Kumar, P., Harris, J. D. and Meizel, S.** (2002). A role for the human sperm glycine receptor/Cl⁽⁻⁾ channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. *Biol. Reprod.* **66**, 91–7.
- Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J. and Breitbart, H.** (2003). Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* **68**, 837–845.
- Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N. D., Naruse, M., Krähling, M., Müller, A., Kaupp, U. B. and Strünker, T.** (2012). The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J.* **31**, 1654–1665.
- Brenker, C., Zhou, Y., Müller, A., Echeverry, F. A., Trötschel, C., Poetsch, A., Xia, X.-M., Bönigk, W., Lingle, C. J., Kaupp, U. B., et al.** (2014). The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3. *Elife* **3**, e01438–e01438.
- Brukman, N. G., Miyata, H., Torres, P., Lombardo, D., Caramelo, J. J., Ikawa, M., Da Ros, V. G. and Cuasnicú, P. S.** (2016). Fertilization defects in sperm from Cysteine-rich secretory protein 2 (Crisp2) knockout mice: implications for fertility disorders. *Mol. Hum. Reprod.* **22**, 240–251.
- Brukman, N. G., Nuñez, S. Y., Puga Molina, L. D. C., Buffone, M. G., Darszon, A., Cuasnicu, P. S. and Da Ros, V. G.** (2019). Tyrosine phosphorylation signaling regulates Ca²⁺ entry by affecting intracellular pH during human sperm capacitation. *J. Cell. Physiol.* **234**, 5276–5288.
- Brukman, N. G., Nakajima, K. P., Valansi, C., Flyak, K., Li, X., Higashiyama,**

- T. and Podbilewicz, B.** (2023). A novel function for the sperm adhesion protein IZUMO1 in cell-cell fusion. *J. Cell Biol.* **222**,
- Buck, J., Sinclair, M. L., Schapal, L., Cann, M. J. and Levin, L. R.** (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 79–84.
- Buffone, M. G., Brugo-Olmedo, S., Calamera, J. C., Verstraeten, S. V, Urrutia, F., Grippo, L., Corbetta, J. P. and Doncel, G. F.** (2006). Decreased protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 1591–1599.
- Buffone, M. G., Foster, J. A. and Gerton, G. L.** (2008). The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 511–522.
- Buffone, M. G., Rodriguez-Miranda, E., Storey, B. T. and Gerton, G. L.** (2009). Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida. *J. Cell. Physiol.* **220**, 611–620.
- Buffone, M. G., Hirohashi, N. and Gerton, G.** (2014). Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biol. Reprod.* **90**, 112.
- Burkart, A. D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M. and Dean, J.** (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J. Cell Biol.* **197**, 37–44.
- Burton, K. A., Treash-Osio, B., Muller, C. H., Dunphy, E. L. and McKnight, G. S.** (1999). Deletion of type IIa regulatory subunit delocalizes protein kinase A in mouse sperm without affecting motility or fertilization. *J. Biol. Chem.* **274**, 24131–24136.
- Calzada, L. and Tellez, J.** (1997). Defective function of membrane potential (psi) on sperm of infertile men. *Arch Androl* **38**, 151–155.
- Carafoli, E. and Krebs, J.** (2016). Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *J. Biol. Chem.* **291**, 20849–20857.
- Chakravarty, S., Suraj, K. and Gupta, S. K.** (2005). Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Mol. Hum. Reprod.* **11**, 365–372.
- Chakravarty, S., Kadunganattil, S., Bansal, P., Sharma, R. K. and Gupta, S.**

- K.** (2008). Relevance of glycosylation of human zona pellucida glycoproteins for their binding to capacitated human spermatozoa and subsequent induction of acrosomal exocytosis. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 75–88.
- Chang, M. C.** (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**, 697–698.
- Chang, M. C.** (1959). Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* **184**, 466–7.
- Chang, J. C. and Oude-Elferink, R. P. J.** (2014). Role of the bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase in pH sensing and metabolic regulation. *Front. Physiol.* **5** FEB, 1–12.
- Chang, H. and Suarez, S. S.** (2012). Unexpected Flagellar Movement Patterns and Epithelial Binding Behavior of Mouse Sperm in the Oviduct1. *Biol. Reprod.* **86**,.
- Charpentier, M., Sun, J., Martins, T. V., Radhakrishnan, G. V., Findlay, K., Soumpourou, E., Thouin, J., Véry, A. A., Sanders, D., Morris, R. J., et al.** (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science (80-)* **352**, 1102–1105.
- Chávez, J. C., Hernández-González, E. O., Wertheimer, E., Visconti, P. E., Darszon, A. and Treviño, C. L.** (2012). Participation of the Cl-/HCO3- Exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl- Channel CFTR, and the Regulatory Factor SLC9A3R1 in Mouse Sperm Capacitation. *Biol. Reprod.* **86**, 1–14.
- Chávez, J. C., De La Vega-Beltrá N, J. L., Escoffier, J., Visconti, P. E., Treviñ O, C. L., Darszon, A., Salkoff, L., Santi, C. M., Travis, A. J., de la Vega-Beltrán, J. L., et al.** (2013). Ion permeabilities in mouse sperm reveal an external trigger for SLO3-dependent hyperpolarization. *PLoS One* **8**, e60578.
- Chávez, J. C., Ferreira, J. J., Butler, A., De La Vega Beltran, J. L., Trevino, C. L., Darszon, A., Salkoff, L., Santi, C. M., Chavez, J. C., Ferreira, J. J., et al.** (2014). SLO3 K+ Channels Control Calcium Entry through CATSPER Channels in Sperm. *J. Biol. Chem.* **289**, 32266–32275.
- Chen, M. S., Tung, K. S. K., Coonrod, S. A., Takahashi, Y., Bigler, D., Chang, A., Yamashita, Y., Kincade, P. W., Herr, J. C. and White, J. M.** (1999). Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between

- sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11830–11835.
- Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin, L. R. and Buck, J.** (2000). Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor. *Science (80-).* **289**, 625–628.
- Chen, S.-R., Chen, M., Deng, S.-L., Hao, X.-X., Wang, X.-X. and Liu, Y.-X.** (2016). Sodium–hydrogen exchanger NHA1 and NHA2 control sperm motility and male fertility. *Cell Death Dis.* **7**, e2152–e2152.
- Cherr, G. N., Lambert, H., Meizel, S. and Katz, D. F.** (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev. Biol.* **114**, 119–31.
- Chevrier, C. and Dacheux, J. -L** (1992). Evolution of the flagellar waveform of ram spermatozoa in relation to the degree of epididymal maturation. *Cell Motil. Cytoskeleton* **23**, 8–18.
- Chung, J.-J. J., Shim, S.-H. H., Everley, R. A., Gygi, S. P., Zhuang, X. and Clapham, D. E.** (2014). Structurally distinct Ca²⁺ signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell* **157**, 808–822.
- Chung, J.-J., Miki, K., Kim, D., Shim, S.-H., Shi, H. F., Hwang, J. Y., Cai, X., Iseri, Y., Zhuang, X. and Clapham, D. E.** (2017). CatSper ζ regulates the structural continuity of sperm Ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility. *Elife* **6**,
- Clapham, D. E.** (2007). Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047–1058.
- Cohen, R., Buttke, D. E., Asano, A., Mukai, C., Nelson, J. L., Ren, D., Miller, R. J., Cohen-Kutner, M., Atlas, D. and Travis, A. J.** (2014). Lipid Modulation of Calcium Flux through CaV2.3 Regulates Acrosome Exocytosis and Fertilization. *Dev. Cell* **28**, 310–321.
- Corkidi, G., Montoya, F., Hernández-Herrera, P., Ríos-Herrera, W. A., Müller, M. F., Treviño, C. L. and Darszon, A.** (2017). Are there intracellular Ca²⁺ oscillations correlated with flagellar beating in human sperm? A three vs. two-dimensional analysis. *Mol. Hum. Reprod.* **23**, 583–593.
- Correia, J., Michelangeli, F. and Publicover, S.** (2015). Regulation and roles

- of Ca²⁺ stores in human sperm. *Reproduction* **150**, R56–R76.
- Coy, P., García-Vázquez, F. A., Visconti, P. E. and Avilés, M.** (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction* **144**, 649–660.
- Craig, A. W. B., Zirngibl, R., Williams, K., Cole, L.-A. and Greer, P. A.** (2001). Mice devoid of fer protein-tyrosine kinase activity are viable and fertile but display reduced cortactin phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 603–613.
- Cross, N. L.** (1996). Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol. Reprod.* **54**, 138–145.
- Da Silva, N. and Barton, C. R.** (2016). Macrophages and dendritic cells in the post-testicular environment. *Cell Tissue Res.* **363**, 97–104.
- Da Silva, N., Cortez-Retamozo, V., Reinecker, H. C., Wildgruber, M., Hill, E., Brown, D., Swirski, F. K., Pittet, M. J. and Breton, S.** (2011). A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* **141**, 653–663.
- Dam, A. H. D. M., Feenstra, I., Westphal, J. R., Ramos, L., van Golde, R. J. T. and Kremer, J. A. M.** (2007). Globozoospermia revisited. *Hum. Reprod. Update* **13**, 63–75.
- Dan, J. . C. .** (1952). Studies on the Acrosome . I. Reaction to Egg-Water. *Biol. Bull.* **103**, 54–66.
- Darszon, A., Treviño, C. L., Wood, C., Galindo, B., Rodríguez-Miranda, E., Acevedo, J. J., Hernandez-González, E. O., Beltrán, C., Martínez-López, P. and Nishigaki, T.** (2007). Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* **65**, 229–44.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C. and Treviño, C. L.** (2011). Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol. Rev.* **91**, 1305–1355.
- David, A., Serr, D. M. and Czernobilsky, B.** (1973). Chemical Composition of Human Oviduct Fluid**Presented in part at the VIIth World Congress on Fertility and Sterility, Tokyo, Japan, October 17–25, 1971. *Fertil. Steril.* **24**, 435–439.
- De Blas, G., Michaut, M., Treviño, C. L., Tomes, C. N., Yunes, R., Darszon, A. and Mayorga, L. S.** (2002). The intraacrosomal calcium pool plays a

- direct role in acrosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 49326–49331.
- De Blas, G. A., Roggero, C. M., Tomes, C. N. and Mayorga, L. S.** (2005). Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol.* **3**, e323.
- De Jonge, C. J., Han, H. -L., Lawrie, H., Mack, S. R. and Zaneveld, L. J. D.** (1991). Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J. Exp. Zool.* **258**, 113–125.
- De La Vega-Beltran, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Krapf, D., Hernandez-González, E. O., Wertheimer, E., Treviño, C. L., Visconti, P. E. and Darszon, A.** (2012). Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* **287**, 44384–44393.
- de Prelle, B., Lybaert, P. and Gall, D.** (2022). A Minimal Model Shows that a Positive Feedback Loop Between sNHE and SLO3 can Control Mouse Sperm Capacitation. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**,
- De Toni, L., Garolla, A., Menegazzo, M., Magagna, S., Di Nisio, A., Šabović, I., Rocca, M. S., Scattolini, V., Filippi, A. and Foresta, C.** (2016). Heat Sensing Receptor TRPV1 Is a Mediator of Thermotaxis in Human Spermatozoa. *PLoS One* **11**, e0167622.
- Dean, J.** (2004). Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays* **26**, 29–38.
- Ded, L., Hwang, J. Y., Miki, K., Shi, H. F. and Chung, J.-J.** (2020). 3D in situ imaging of the female reproductive tract reveals molecular signatures of fertilizing spermatozoa in mice. *Elife* **9**,
- Delgado-Bermúdez, A., Yeste, M., Bonet, S. and Pinart, E.** (2022). A Review on the Role of Bicarbonate and Proton Transporters during Sperm Capacitation in Mammals. *Int. J. Mol. Sci.* **23**,
- Demarco, I. A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., de la Vega-Beltrán, J. L., Hockensmith, J. W., Kopf, G. S., Darszon, A. and Visconti, P. E.** (2003). Involvement of a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation. *J. Biol. Chem.* **278**, 7001–7009.
- Demott, R. P. and Suarez, S. S.** (1992). Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol. Reprod.* **46**, 779–785.

- Drobnis, E. Z., Yudin, A. I., Cherr, G. N. and Katz, D. F.** (1988a). Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Dev. Biol.* **130**, 311–323.
- Drobnis, E. Z., Yudin, A. I., Cherr, G. N. and Katz, D. F.** (1988b). Kinematics of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete Res.* **21**, 367–83.
- Dunn, P. F. and Picologlou, B. F.** (1976). Viscoelastic properties of cumulus oöphorus. *Biorheology* **13**, 379–384.
- Eddy, E. M.** (2006). The spermatozoon. *J. D. Neill*, ed. *Knobil Neill's - Physiol. Reprod.* 3–53.
- Elfgen, V., Mietens, A., Mewe, M., Hau, T. and Middendorff, R.** (2018). Contractility of the epididymal duct: function, regulation and potential drug effects. *Reproduction* **156**, R125–R141.
- Escoffier, J., Krapf, D., Navarrete, F., Darszon, A. and Visconti, P. E.** (2012). Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *J. Cell Sci.* **125**, 473–485.
- Escoffier, J., Navarrete, F., Haddad, D., Santi, C. M., Darszon, A. and Visconti, P. E.** (2015). Flow Cytometry Analysis Reveals That Only a Subpopulation of Mouse Sperm Undergoes Hyperpolarization During Capacitation. *Biol. Reprod.* **92**, 2–3.
- Espinosa, F. and Darszon, A.** (1995). Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca²⁺. *FEBS Lett.* **372**, 119–125.
- Familiari, G., Relucenti, M., Heyn, R., Micara, G. and Correr, S.** (2006). Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microsc. Res. Tech.* **69**, 415–426.
- Fayomi, A. P. and Orwig, K. E.** (2018). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res.* **29**, 207–214.
- Ferreira, J. J., Cassina, A., Irigoyen, P., Ford, M., Pietroroia, S., Peramsetty, N., Radi, R., Santi, C. M. and Sapiro, R.** (2021). Increased mitochondrial activity upon CatSper channel activation is required for mouse sperm capacitation. *Redox Biol.* **48**.
- Fijak, M., Pilatz, A., Hedger, M. P., Nicolas, N., Bhushan, S., Michel, V., Tung, K. S. K., Schuppe, H. C. and Meinhardt, A.** (2018). Infectious, inflammatory and “autoimmune” male factor infertility: how do rodent

- models inform clinical practice? *Hum. Reprod. Update* **24**, 416–441.
- Finkelstein, M., Etkovitz, N. and Breitbart, H.** (2010). Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization. *J. Biol. Chem.* **285**, 39702–39709.
- Florman, H. M. and Storey, B. T.** (1982). Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev. Biol.* **91**, 121–30.
- Foster, J. A., Friday, B. B., Maulit, M. T., Blobel, C., Winfrey, V. P., Olson, G. E., Kim, K. S. and Gerton, G. L.** (1997). AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 12714–22.
- Fujihara, Y., Okabe, M. and Ikawa, M.** (2014). GPI-anchored protein complex, LY6K/TEX101, is required for sperm migration into the oviduct and male fertility in mice. *Biol. Reprod.* **90**,.
- Fujihara, Y., Miyata, H. and Ikawa, M.** (2018). Factors controlling sperm migration through the oviduct revealed by gene-modified mouse models. *Exp. Anim.* **67**, 91–104.
- Fujihara, Y., Noda, T., Kobayashi, K., Oji, A., Kobayashi, S., Matsumura, T., Larasati, T., Oura, S., Kojima-Kita, K., Yu, Z., et al.** (2019). Identification of multiple male reproductive tractspecific proteins that regulate sperm migration through the oviduct in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 18498–18506.
- Fujihara, Y., Lu, Y., Noda, T., Oji, A., Larasati, T., Kojima-Kita, K., Yu, Z., Matzuk, R. M., Matzuk, M. M. and Ikawa, M.** (2020). Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 9393–9400.
- Gadella, B. M. M.** (2008). Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* **107**, 229–236.
- Ganguly, A., Sharma, R. K. and Gupta, S. K.** (2008). Bonnet monkey (*Macaca radiata*) ovaries, like human oocytes, express four zona pellucida glycoproteins. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 156–166.
- Gao, T., Li, K., Liang, F., Yu, J., Liu, A., Ni, Y. and Sun, P.** (2021). KCNQ1 Potassium Channel Expressed in Human Sperm Is Involved in Sperm Motility, Acrosome Reaction, Protein Tyrosine Phosphorylation, and Ion

- Homeostasis During Capacitation. *Front. Physiol.* **12**,.
- Garbers, D. L., Tubb, D. J. and Hyne, R. V** (1982). A requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **257**, 8980–4.
- Garcia, M. A. and Meizel, S.** (1999). Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na⁺/H⁺ exchanger. *Mol. Reprod. Dev.* **52**, 189–195.
- Gatica, L. V., Guidobaldi, H. A., Montesinos, M. M., Teves, M. E., Moreno, A. I., Uñates, D. R., Molina, R. I. and Giojalas, L. C.** (2013). Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples. *Mol. Hum. Reprod.* **19**, 559–69.
- Geng, Y., Ferreira, J. J., Dzikunu, V., Butler, A., Lybaert, P., Yuan, P., Magleby, K. L., Salkoff, L. and Santi, C. M.** (2017). A genetic variant of the sperm-specific SLO3 K⁺ channel has altered pH and Ca²⁺ sensitivities. *J. Biol. Chem.* **292**, 8978–8987.
- Gervasi, M. G., Xu, X., Carbajal-Gonzalez, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E. and Krapf, D.** (2018). The actin cytoskeleton of the mouse sperm flagellum is organized in a helical structure. *J. Cell Sci.* **131**, jcs.215897.
- Goodson, S. G., Qiu, Y., Sutton, K. A., Xie, G., Jia, W. and O'Brien, D. A.** (2012). Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. *Biol. Reprod.* **87**, 75.
- Goudet, G., Mugnier, S., Callebaut, I. and Monget, P.** (2008). Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biol. Reprod.* **78**, 796–806.
- Graf, C. B., Ritagliati, C., Stival, C., Balestrini, P. A., Buffone, M. G. and Krapf, D.** (2019). Determination of a robust assay for human sperm membrane potential analysis. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**,
- Greve, J. M. and Wassarman, P. M.** (1985). Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J. Mol. Biol.* **181**, 253–264.
- Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Uñates, D. R., Anastasía, A. and Giojalas, L. C.** (2008). Progesterone from the Cumulus Cells Is the Sperm Chemoattractant Secreted by the Rabbit Oocyte Cumulus Complex. *PLoS*

One **3**, e3040.

- Guidobaldi, H. A., Hirohashi, N., Cubilla, M., Buffone, M. G. and Giojalas, L. C.** (2017). An intact acrosome is required for the chemotactic response to progesterone in mouse spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **84**, 310–315.
- Gunderson, S., Molina, L. P., Spies, N. C., Balestrini, P., Buffone, M., Jungheim, E., Riley, J. and Santi, C.** (2020). A machine learning algorithm incorporating capacitated sperm intracellular pH predicts conventional in vitro fertilization success in normospermic patients. *Fertil. Steril.*
- Gupta, S. K. and Bhandari, B.** (2011). Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J. Androl.* **13**, 97–105.
- Gupta, S. K., Bansal, P., Ganguly, A., Bhandari, B. and Chakrabarti, K.** (2009). Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *J. Reprod. Immunol.* **83**, 50–55.
- Harper, C. V. and Publicover, S. J.** (2005). Reassessing the role of progesterone in fertilization - Compartmentalized calcium signalling in human spermatozoa? *Hum. Reprod.* **20**, 2675–2680.
- Harper, C. V., Cummesson, J. A., White, M. R. H., Publicover, S. J. and Johnson, P. M.** (2008). Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J. Cell Sci.* **121**, 2130–5.
- Harrison, R. A. P.** (2004). Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol. Reprod. Dev.* **67**, 337–52.
- Harrison, R. A. P. and Miller, N. G. A.** (2000). cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol. Reprod. Dev.* **55**, 220–228.
- Harwalkar, K., Ford, M. J., Teng, K., Yamanaka, N., Yang, B., Burtscher, I., Lickert, H. and Yamanaka, Y.** (2021). Anatomical and cellular heterogeneity in the mouse oviduct-its potential roles in reproduction and preimplantation development†. *Biol. Reprod.* **104**, 1249–1261.
- Hasuwa, H., Muro, Y., Ikawa, M., Kato, N., Tsujimoto, Y. and Okabe, M.** (2010). Transgenic Mouse Sperm that Have Green Acrosome and Red Mitochondria Allow Visualization of Sperm and Their Acrosome Reaction in Vivo. *Exp. Anim.* **59**, 105–107.

- Hedrick, J. L. and Wardrip, N. J.** (1987). On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Dev. Biol.* **121**, 478–488.
- Hernández-Garduño, S., Chávez, J. C., Matamoros-Volante, A., Sánchez-Guevara, Y., Torres, P., Treviño, C. L. and Nishigaki, T.** (2022). Hyperpolarization induces cytosolic alkalization of mouse sperm flagellum probably through sperm Na^+/H^+ exchanger. *Reproduction* **164**, 125–134.
- Hernández-González, E. O., Sosnik, J., Edwards, J., Acevedo, J. J., Mendoza-Lujambio, I., López-González, I., Demarco, I. A., Wertheimer, E., Darszon, A. and Visconti, P. E.** (2006). Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J. Biol. Chem.* **281**, 5623–5633.
- Hernández-González, E. O., Treviño, C. L., Castellano, L. E., de la Vega-Beltrán, J. L., Ocampo, A. Y., Wertheimer, E., Visconti, P. E. and Darszon, A.** (2007). Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *J. Biol. Chem.* **282**, 24397–24406.
- Herrick, S. B., Schweissinger, D. L., Kim, S.-W., Bayan, K. R., Mann, S. and Cardullo, R. A.** (2005). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J. Cell. Physiol.* **202**, 663–671.
- Hertwig, O.** (1875). Beiträge zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies. *W. Engelmann.* **1**.
- Hess, K. C., Jones, B. H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T. S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J. H., Kopf, G. S., Suarez, S. S., et al.** (2005). The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev. Cell* **9**, 249–259.
- Hicks, G. A. and Marrion, N. V.** (1998). Ca^{2+} -dependent inactivation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channels in rat hippocampal neurones produced by pore block from an associated particle. *J. Physiol.* **508 (Pt 3)**, 721–734.
- Hino, T. and Yanagimachi, R.** (2019). Active peristaltic movements and fluid production of the mouse oviduct: their roles in fluid and sperm transport and fertilization†. *Biol. Reprod.* **101**, 240–249.
- Hino, T., Muro, Y., Tamura-Nakano, M., Okabe, M., Tateno, H. and Yanagimachi, R.** (2016). The Behavior and Acrosomal Status of Mouse

- Spermatozoa In Vitro, and Within the Oviduct During Fertilization after Natural Mating. *Biol. Reprod.* **95**, 50–50.
- Hinton, B. T., Pryor, J. P., Hirsh, A. V and Setchell, B. P.** (1981). The concentration of some inorganic ions and organic compounds in the luminal fluid of the human ductus deferens. *Int. J. Androl.* **4**, 457–461.
- Hirohashi, N. and Yanagimachi, R.** (2018). Sperm acrosome reaction: Its site and role in fertilization. *Biol. Reprod.* **99**, 127–133.
- Hirose, M., Honda, A., Fulka, H., Tamura-Nakano, M., Matoba, S., Tomishima, T., Mochida, K., Hasegawa, A., Nagashima, K., Inoue, K., et al.** (2020). Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 2513–2518.
- Ho, K., Wolff, C. A. and Suarez, S. S.** (2009). CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod. Fertil. Dev.* **21**, 345–350.
- Holt, W. V. and Fazeli, A.** (2010). The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *Mol. Reprod. Dev.* **77**, 934–943.
- Hoodbhoy, T. and Dean, J.** (2004). Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction* **127**, 417–422.
- Hunter, R. H. F.** (1973). Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *J. Exp. Zool.* **183**, 57–62.
- Hunter, R. H. F. and Léglise, P. C.** (1971). Tubal surgery in the rabbit: fertilization and polyspermy after resection of the isthmus. *Am. J. Anat.* **132**, 45–52.
- Hunter, R. H. F., Cook, B. and Poyser, N. L.** (1983). Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **14**, 225–232.
- Hutt, D. M., Baltz, J. M. and Ngsee, J. K.** (2005). Synaptotagmin VI and VIII and syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* **280**, 20197–20203.
- Hwang, J. Y., Mannowetz, N., Zhang, Y., Everley, R. A., Gygi, S. P., Bewersdorf, J., Lishko, P. V. and Chung, J.-J.** (2019). Dual Sensing of Physiologic pH and Calcium by EFCAB9 Regulates Sperm Motility. *Cell* **177**, 1480-1494.e19.

- Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M. and Okabe, M.** (2010). Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J. Clin. Invest.* **120**, 984–94.
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. and Okabe, M.** (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**, 234–238.
- Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M. and Yanagimachi, R.** (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20008–20011.
- Inoue, N., Hagihara, Y. and Wada, I.** (2021). Evolutionarily conserved sperm factors, DCST1 and DCST2, are required for gamete fusion. *Elife* **10**,.
- Jaiswal, B. S. and Conti, M.** (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 10676–10681.
- James, E. R., Carrell, D. T., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Yeste, M. and Salas-Huetos, A.** (2020). The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–17.
- Jansen, R. P. S. and Bajpai, V. K.** (1982). Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. *Biol. Reprod.* **26**, 155–168.
- Jimenez-Gonzalez, C., Michelangeli, F., Harper, C. V., Barratt, C. L. R. and Publicover, S. J.** (2006). Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Hum. Reprod. Update* **12**, 253–267.
- Jimenez, T., Sanchez, G. and Blanco, G.** (2012). Activity of the Na,K-ATPase a4 Isoform Is Regulated During Sperm Capacitation to Support Sperm Motility. *J. Androl.* **33**, 1047–1057.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K. and Hirohashi, N.** (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4892–4896.
- Johnson, L. and Varner, D. D.** (1988). Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis.

- Biol. Reprod.* **39**, 812–817.
- Jones, R. E. and Lopez, K. H.** (2013). Human Reproductive Biology: Fourth Edition. *Hum. Reprod. Biol. Fourth Ed.* 1–381.
- José, O., Torres-Rodríguez, P., Forero-Quintero, L. S., Chávez, J. C., De la Vega-Beltrán, J. L., Carta, F., Supuran, C. T., Deitmer, J. W. and Treviño, C. L.** (2015). Carbonic anhydrases and their functional differences in human and mouse sperm physiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**, 713–718.
- Kang-Decker, N., Mantchev, G. T., Juneja, S. C., McNiven, M. a and van Deursen, J. M.** (2001). Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science* **294**, 1531–1533.
- Kang, H., Liu, M., Zhang, W., Huang, R. Z., Zhao, N., Chen, C. and Zeng, X. H.** (2021). Na⁺/H⁺ Exchangers Involve in Regulating the pH-Sensitive Ion Channels in Mouse Sperm. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–13.
- Kantsler, V., Dunkel, J., Blayney, M. and Goldstein, R. E.** (2014). Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. *Elife* **3**, e02403–e02403.
- Kawano, N. and Yoshida, M.** (2007). Semen-Coagulating Protein, SVS2, in Mouse Seminal Plasma Controls Sperm Fertility1. *Biol. Reprod.* **76**, 353–361.
- Kawano, N., Yoshida, K., Iwamoto, T. and Yoshida, M.** (2008). Ganglioside GM1 mediates decapacitation effects of SVS2 on murine spermatozoa. *Biol. Reprod.* **79**, 1153–9.
- Kelly, M. C., Brown, S. G., Costello, S. M., Ramalingam, M., Drew, E., Publicover, S. J., Barratt, C. L. R. and Da Silva, S. M.** (2018). Single-cell analysis of [Ca²⁺] _i signalling in sub-fertile men: characteristics and relation to fertilization outcome. *Hum. Reprod.* **33**, 1023–1033.
- Kiim, J. S. and Kim, J.** (2013). Viscoelastic characterization of mouse zona pellucida. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **60**, 569–575.
- Killian, G.** (2011). Physiology and endocrinology symposium: evidence that oviduct secretions influence sperm function: a retrospective view for livestock. *J. Anim. Sci.* **89**, 1315–1322.
- Kim, K. S. and Gerton, G. L.** (2003). Differential release of soluble and matrix components: Evidence for intermediate states of secretion during

- spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev. Biol.* **264**, 141–152.
- Kim, K. S., Cha, M. C. and Gerton, G. L.** (2001). Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biol. Reprod.* **64**, 36–43.
- Kirichok, Y. and Lishko, P. V** (2011). Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol. Hum. Reprod.* **17**, 478–499.
- Kirichok, Y., Navarro, B. and Clapham, D. E.** (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature* **439**, 737–740.
- Knaus, H. G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J., Smith, M. and Swanson, R.** (1994). Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance $\text{Ca}(2+)$ -activated K^+ channel from smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **269**, 17274–17278.
- Ko, S. B. H., Zeng, W., Dorwart, M. R., Luo, X., Kim, K. H., Millen, L., Goto, H., Naruse, S., Soyombo, A., Thomas, P. J., et al.** (2004). Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat. Cell Biol.* **6**, 343–350.
- Kölle, S., Hughes, B. and Steele, H.** (2020). Early embryo-maternal communication in the oviduct: A review. *Mol. Reprod. Dev.* **87**, 650–662.
- Komeya, M., Sato, T. and Ogawa, T.** (2018). In vitro spermatogenesis: A century-long research journey, still half way around. *Reprod. Med. Biol.* **17**, 407–420.
- Kornblihtt, A. R., Flavia, M. M. and Torres, H. N.** (1981). Manganese Ion Dependent Adenylate Cyclase Activity in Rat Testes: Purification and Properties. *Biochemistry* **20**, 1262–1267.
- Kwitny, S., Klaus, A. V and Hunnicutt, G. R.** (2010). The annulus of the mouse sperm tail is required to establish a membrane diffusion barrier that is engaged during the late steps of spermiogenesis. *Biol. Reprod.* **82**, 669–78.
- La Spina, F. A., Puga, L. C., Romarowski, A., Vitale, A. M., Falzone, T. L., Krapf, D., Hirohashi, N. and Buffone, M. G.** (2016). Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev. Biol.* **411**, 172–182.

- Larasati, T., Noda, T., Fujihara, Y., Shimada, K., Tobita, T., Yu, Z., Matzuk, M. M. and Ikawa, M.** (2020). Tmprss12 is required for sperm motility and uterotubal junction migration in mice†. *Biol. Reprod.* **103**, 254–263.
- Lees, J. A., Messa, M., Sun, E. W., Wheeler, H., Torta, F., Wenk, M. R., De Camilli, P. and Reinisch, K. M.** (2017). Lipid transport by TMEM24 at ER-plasma membrane contacts regulates pulsatile insulin secretion. *Science (80-.)* **355**,.
- Lefebvre, R., Chenoweth, P. J., Drost, M., LeClear, C. T., MacCubbin, M., Dutton, J. T. and Suarez, S. S.** (1995). Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biol. Reprod.* **53**, 1066–1074.
- Lefèvre, L., Conner, S. J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I. A., Monk, M., et al.** (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.* **19**, 1580–1586.
- Leonetti, M. D., Yuan, P., Hsiung, Y. and MacKinnon, R.** (2012). Functional and structural analysis of the human SLO3 pH- and voltage-gated K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 19274–19279.
- Lin, Y.-N., Roy, A., Yan, W., Burns, K. H. and Matzuk, M. M.** (2007). Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6794–805.
- Linares-Hernández, L., Guzmán-Grenfell, A. M., Hicks-Gomez, J. J. and González-Martínez, M. T.** (1998). Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1372**, 1–12.
- Lindemann, C. B. and Lesich, K. A.** (2016). Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton* **73**, 652–669.
- Lippes, J., Enders, R. G., Pragay, D. A. and Bartholomew, W. R.** (1972). The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception* **5**, 85–103.
- Lishko, P. V. and Kirichok, Y.** (2010). The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J. Physiol.* **588**, 4667–4672.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., Fedorenko, A. and Kirichok, Y.** (2010). Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-

- Gated Proton Channel. *Cell* **140**, 327–337.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L. and Kirichok, Y.** (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* **471**, 387–91.
- Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J.-J., Clapham, D. E. and Polina V. Lishko, Yuriy Kirichok, Dejian Ren, Betsy Navarro, Jean-Ju Chung, and D. E. C.** (2012). The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 453–457.
- Litscher, E. S., Williams, Z. and Wassarman, P. M.** (2009). Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals. *Mol. Reprod. Dev.* **76**, 933–941.
- Liu, D. Y., Clarke, G. N. and Baker, H. W. G.** (2006). Tyrosine phosphorylation on capacitated human sperm tail detected by immunofluorescence correlates strongly with sperm-zona pellucida (ZP) binding but not with the ZP-induced acrosome reaction. *Hum. Reprod.* **21**, 1002–1008.
- Long, J. E., Lee, M. S. and Blithe, D. L.** (2021). Update on Novel Hormonal and Nonhormonal Male Contraceptive Development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **106**, E2381–E2392.
- Lopata, A., Patullo, M. J., Chang, A. and James, B.** (1976). A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil. Steril.* **27**, 677–84.
- López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís-López, A., Santi, C. M., Darszon, A. I., Treviño, C. L., Lopez-Gonzalez, I., Torres-Rodriguez, P., Sanchez-Carranza, O., et al.** (2014). Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 619–29.
- López-Úbeda, R., García-Vázquez, F. A., Romar, R., Gadea, J., Muñoz, M., Hunter, R. H. F. and Coy, P.** (2015). Oviductal Transcriptome Is Modified after Insemination during Spontaneous Ovulation in the Sow. *PLoS One* **10**,
- Lopez, C. I., Belmonte, S. A., De Blas, G. A. and Mayorga, L. S.** (2007). Membrane-permeant Rab3A triggers acrosomal exocytosis in living human sperm. *FASEB J.* **21**, 4121–4130.
- Lucchesi, O., Ruete, M. C., Bustos, M. A., Quevedo, M. F. and Tomes, C. N.** (2016). The signaling module cAMP/Epac/Rap1/PLC ϵ /IP3 mobilizes

acrosomal calcium during sperm exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 544–561.

- Luque, G. M., Dalotto-Moreno, T., Martín-Hidalgo, D., Ritagliati, C., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Balestrini, P. A., Schiavi-Ehrenhaus, L. J., Gilio, N., Krapf, D., et al.** (2018). Only a subpopulation of mouse sperm displays a rapid increase in intracellular calcium during capacitation. *J. Cell. Physiol.* **233**, 9685–9700.
- Ma, F., Wu, D., Deng, L., Secrest, P., Zhao, J., Varki, N., Lindheim, S. and Gagneux, P.** (2012). Sialidases on mammalian sperm mediate deciduous sialylation during capacitation. *J. Biol. Chem.* **287**, 38073–9.
- Machado, S. A., Sharif, M., Wang, H., Bovin, N. and Miller, D. J.** (2019). Release of Porcine Sperm from Oviduct Cells is Stimulated by Progesterone and Requires CatSper. *Sci. Rep.* **9**,
- Mahé, C., Zlotkowska, A. M., Reynaud, K., Tsikis, G., Mermilliod, P., Druart, X., Schoen, J. and Saint-Dizier, M.** (2021). Sperm migration, selection, survival, and fertilizing ability in the mammalian oviduct†. *Biol. Reprod.* **105**, 317–331.
- Malcuit, C., Kurokawa, M. and Fissore, R. A.** (2006). Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J. Cell. Physiol.* **206**, 565–573.
- Mannowetz, N., Naidoo, N. M., Choo, S.-A. A. S. S., Smith, J. F., Lishko, P. V., Sara Choo, S.-A., Smith, J. F. and Lishko, P. V.** (2013). Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *Elife* **2**, e01009.
- Mansell, S. A., Publicover, S. J., Barratt, C. L. R. and Wilson, S. M.** (2014). Patch clamp studies of human sperm under physiological ionic conditions reveal three functionally and pharmacologically distinct cation channels. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 392–408.
- Marín-Briggiler, C. I., Gonzalez-Echeverría, M. F., Harris, J. D. and Vazquez-Levin, M. H.** (2008). Recombinant human zona pellucida protein C produced in Chinese hamster ovary cells binds to human spermatozoa and inhibits sperm-zona pellucida interaction. *Fertil. Steril.* **90**, 879–882.
- Marín-Briggiler, C. I., Luque, G. M., Gervasi, M. G., Oscoz-Susino, N., Sierra, J. M., Mondillo, C., Salicioni, A. M., Krapf, D., Visconti, P. E. and Buffone, M. G.** (2021). Human Sperm Remain Motile After a Temporary Energy Restriction but do Not Undergo Capacitation-Related Events. *Front.*

Cell Dev. Biol. **9**,.

- Marquez, B., Ignatz, G. and Suarez, S. S. S.** (2007). Contributions of extracellular and intracellular Ca^{2+} to regulation of sperm motility: Release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Dev. Biol.* **303**, 214–221.
- Martínez-Menárguez, J. A., Geuze, H. J. and Ballesta, J.** (1996). Evidence for a nonlysosomal origin of the acrosome. *J. Histochem. Cytochem.* **44**, 313–20.
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S. and Stevens, G. A.** (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* **9**, e1001356.
- Mata-Martínez, E., Darszon, A. and Treviño, C. L.** (2018). pH-dependent Ca^{2+} oscillations prevent untimely acrosome reaction in human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **497**, 146–152.
- Mata-Martínez, E., Sánchez-Cárdenas, C., Chávez, J. C., Guerrero, A. d., Treviño, C. L., Corkidi, G., Montoya, F., Hernández-Herrera, P., Buffone, M. G., Balestrini, P. A., et al.** (2021). Corrigendum to “Role of calcium oscillations in sperm physiology” [BioSystems 209 (2021) 104524]. *Biosystems*. **210**,.
- Mata-Martínez, E., Sánchez-Tusie, A. A., Darszon, A., Mayorga, L. S., Treviño, C. L. and De Blas, G. A.** (2021). Epac activation induces an extracellular Ca^{2+} -independent Ca^{2+} wave that triggers acrosome reaction in human sperm. *Andrology andro.* 12989.
- Matamoros-Volante, A. and Trevino, C. L.** (2020). Capacitation-associated alkalinization in human sperm is differentially controlled at the subcellular level. *J. Cell Sci.* **133**,.
- Matamoros-Volante, A., Castillo-Viveros, V., Torres-Rodríguez, P., Treviño, M. B. and Treviño, C. L.** (2020). Time-Lapse Flow Cytometry: A Robust Tool to Assess Physiological Parameters Related to the Fertilizing Capability of Human Sperm. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–18.
- Mayorga, L. S., Tomes, C. N. and Belmonte, S. A.** (2007). Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* **59**, 286–292.
- Mcdermott, J., Sánchez, G., Nangia, A. K. and Blanco, G.** (2015). Role of

- human Na,K-ATPase alpha 4 in sperm function, derived from studies in transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.* **82**, 167–181.
- Mcgraw, L. A., Suarez, S. S. and Wolfner, M. F.** (2015). On a matter of seminal importance: The emerging influence of seminal plasma components on fertility and future progeny. *Bioessays* **37**, 142.
- McPartlin, L. A., Visconti, P. E. and Bedford-Guaus, S. J.** (2011). Guanine-nucleotide exchange factors (RAPGEF3/RAPGEF4) induce sperm membrane depolarization and acrosomal exocytosis in capacitated stallion sperm. *Biol. Reprod.* **85**, 179–188.
- Michaut, M., Tomes, C. N., De Blas, G., Yunes, R. and Mayorga, L. S.** (2000). Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9996–10001.
- Michaut, M., De Blas, G., Tomes, C. N., Yunes, R., Fukuda, M. and Mayorga, L. S.** (2001). Synaptotagmin VI participates in the acrosome reaction of human spermatozoa. *Dev. Biol.* **235**, 521–529.
- Michelangeli, F., Ogunbayo, O. A. and Wootton, L. L.** (2005). A plethora of interacting organellar Ca²⁺ stores. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 135–140.
- Miki, K. and Clapham, D. E.** (2013). Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr. Biol.* **23**, 443–452.
- Miki, K., Qu, W., Goulding, E. H., Willis, W. D., Bunch, D. O., Strader, L. F., Perreault, S. D., Eddy, E. M. and O'Brien, D. A.** (2004). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16501–16506.
- Miles, E. L., O'Gorman, C., Zhao, J., Samuel, M., Walters, E., Yi, Y. J., Sutovsky, M., Prather, R. S., Wells, K. D. and Sutovsky, P.** (2013). Transgenic pig carrying green fluorescent proteasomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 6334–6339.
- Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., Hill, R. Z., Bautista, D. M., Kirichok, Y. and Lishko, P. V** (2016). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via sex hormone progesterone. *Science* **352**, 555–559.
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F.,**

- Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., et al.** (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**, 321–324.
- Miyata, H., Satouh, Y., Mashiko, D., Muto, M., Nozawa, K., Shiba, K., Fujihara, Y., Isotani, A., Inaba, K. and Ikawa, M.** (2015). Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science* **350**, 442–5.
- Moller, C. C. and Wassarman, P. M.** (1989). Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev. Biol.* **132**, 103–112.
- Mondéjar, I., Acuña, O. S., Izquierdo-Rico, M. J., Coy, P. and Avilés, M.** (2012). The oviduct: functional genomic and proteomic approach. *Reprod. Domest. Anim.* **47 Suppl 3**, 22–29.
- Moore, E. L., Wang, S. and Larina, I. V.** (2019). Staging mouse preimplantation development in vivo using optical coherence microscopy. *J. Biophotonics* **12**.
- Muro, Y., Hasuwa, H., Isotani, A., Miyata, H., Yamagata, K., Ikawa, M., Yanagimachi, R. and Okabe, M.** (2016). Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. *Biol. Reprod.* **94**, 80–80.
- Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Toshimori, K. and Okabe, M.** (2001). Alkalization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation. *Dev. Biol.* **231**, 222–231.
- Nakanishi, T., Isotani, A., Yamaguchi, R., Ikawa, M., Baba, T., Suarez, S. S. and Okabe, M.** (2004). Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. *Biol. Reprod.* **71**, 959–965.
- Navarrete, F. A., Aguila, L., Martin-Hidalgo, D., Tourzani, D. A., Luque, G. M., Ardestani, G., Garcia-Vazquez, F. A., Levin, L. R., Buck, J., Darszon, A., et al.** (2019). Transient Sperm Starvation Improves the Outcome of Assisted Reproductive Technologies. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**.
- Navarro, B., Kirichok, Y. and Clapham, D. E.** (2007). KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7688–92.
- Navarro, B., Kirichok, Y., Chung, J.-J. and Clapham, D. E.** (2008). Ion

- channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 607–613.
- Newport, G.** (1853). X. On the impregnation of the ovum in the amphibia. (Second series, revised.) And on the direct agency of the spermatozoon. *Philos. Trans. R. Soc. London* **143**, 233–290.
- Nicolli, A. R., Alonso, C. A. I., Otamendi, C., Cerletti, M., Poetsch, A., Sharma, V., Zalazar, L., Perez-Martinez, S. and Cesari, A.** (2022). How, where and when is SPINK3 bound and removed from mouse sperm? *Reproduction* **163**, 251–266.
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A. L., Romero, F., Treviño, C. L. and Darszon, A.** (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 1149–1158.
- Noda, T., Lu, Y., Fujihara, Y., Oura, S., Koyano, T., Kobayashi, S., Matzuk, M. M. and Ikawa, M.** (2020). Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**,
- O'Toole, C. M., Roldan, E. R. and Fraser, L. R.** (1996). Protein kinase C activation during progesterone-stimulated acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 921–7.
- O'Toole, C. M. B., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R. A. and Florman, H. M.** (2000). Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1571–1584.
- Okabe, M.** (2013). The cell biology of mammalian fertilization. *Development* **140**, 4471–9.
- Okabe, M.** (2015). Mechanisms of fertilization elucidated by gene-manipulated animals. *Asian J. Androl.* **17**, 646.
- Okamura, N. and Sugita, Y.** (1983). Activation of spermatozoan adenylate cyclase by a low molecular weight factor in porcine seminal plasma. *J. Biol. Chem.* **258**, 13056–13062.
- Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H. and Sugita, Y.** (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **260**, 9699–9705.

- Okamura, N., Tajima, Y., Ishikawa, H., Yoshii, S., Koiso, K. and Sugita, Y.** (1986). *Lowered levels of bicarbonate in seminal plasma cause the poor sperm motility in human infertile patients.*
- Okunade, G. W., Miller, M. L., Pyne, G. J., Sutliff, R. L., O'Connor, K. T., Neumann, J. C., Andringa, A., Miller, D. A., Prasad, V., Doetschman, T., et al.** (2004). Targeted Ablation of Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 Indicates a Major Housekeeping Function for PMCA1 and a Critical Role in Hyperactivated Sperm Motility and Male Fertility for PMCA4. *J. Biol. Chem.* **279**, 33742–33750.
- Oliphant, G. and Brackett, B. G.** (1973). Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol. Reprod.* **9**, 404–4.
- Olson, G. E. and Linck, R. W.** (1977). Observations of the structural components of flagellar axonemes and central pair microtubules from rat sperm. *J. Ultrastruct. Res.* **61**, 21–43.
- Orta, G., Vega-Beltran, J. L., Hidalgo, D., Santi, C. M., Visconti, P. and Darszon, A.** (2018). CatSper channels are regulated by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* *jbc.RA117.001566*.
- Otani, H., Tanaka, O., Kasai, K. and Yoshioka, T.** (1988). Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: regular dispositions and synchronized changes. *Anat. Rec.* **222**, 26–33.
- Owen, D. H.** (2005). A Review of the Physical and Chemical Properties of Human Semen and the Formulation of a Semen Simulant. *J. Androl.* **26**, 459–469.
- Palermo, G. D., Colombero, L. T. and Rosenwaks, Z.** (1997). The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev. Reprod.* **2**, 19–27.
- Parrington, J., Arnoult, C. and Fissore, R. A.** (2019). The eggstraordinary story of how life begins. *Mol. Reprod. Dev.* **86**, 4–19.
- Patrat, C., Serres, C. and Jouannet, P.** (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Cell* **92**, 255–266.
- Peitz, B. and Olds-Clarke, P.** (1986). Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol. Reprod.* **35**, 608–617.
- Pelletier, R.-M., Trifaro, J.-M., Carbajal, M. E., Okawara, Y. and Vitale, M. L.**

- (1999). Calcium-dependent actin filament-severing protein scinderin levels and localization in bovine testis, epididymis, and spermatozoa. *Biol. Reprod.* **60**, 1128–1136.
- Pharazyn, A., Foxcroft, G. R. and Aherne, F. X.** (1991). Temporal relationship between plasma progesterone concentrations in the utero-ovarian and jugular veins during early pregnancy in the pig. *Anim. Reprod. Sci.* **26**, 323–332.
- Publicover, S., Harper, C. V. and Barratt, C.** (2007). [Ca²⁺]i signalling in sperm — making the most of what you've got. *Nat. Cell Biol.* **9**, 235–242.
- Puga Molina, L. C., Pinto, N. A., Torres Rodríguez, P., Romarowski, A., Vicens Sanchez, A., Visconti, P. E., Darszon, A., Treviño, C. L. and Buffone, M. G.** (2017). Essential Role of CFTR in PKA-Dependent Phosphorylation, Alkalization, and Hyperpolarization During Human Sperm Capacitation. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1404–1414.
- Puga Molina, L. D., Pinto, N. A., Torres, N. I., Ana, L. G. C., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Romarowski, A., Krapf, D., Santi, C. M., Treviño, C. L., et al.** (2018a). CFTR/ENaC-dependent regulation of membrane potential during human sperm capacitation is initiated by bicarbonate uptake through NBC. *J. Biol. Chem.* **293**, 9924–9936.
- Puga Molina, L. C., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A. and Buffone, M. G.** (2018b). Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, 72.
- Puga Molina, L. C., Gunderson, S., Riley, J., Lybaert, P., Borrego-Alvarez, A., Jungheim, E. S. and Santi, C. M.** (2020). Membrane Potential Determined by Flow Cytometry Predicts Fertilizing Ability of Human Sperm. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 387.
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I. S., Quill, T. A. and Clapham, D. E.** (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1219–1223.
- Quill, T. A., Sugden, S. A., Rossi, K. L., Doolittle, L. K., Hammer, R. E. and Garbers, D. L.** (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14869–74.

- Ramírez-Gómez, H. V., Tuval, I., Guerrero, A. and Darszon, A.** (2019). Analysis of sperm chemotaxis. *Methods Cell Biol.* **151**, 473–486.
- Reid, A. T., Lord, T., Stanger, S. J., Roman, S. D., McCluskey, A., Robinson, P. J., Aitken, R. J. and Nixon, B.** (2012). Dynamin regulates specific membrane fusion events necessary for acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **287**, 37659–37672.
- Ren, D. and Xia, J.** (2010). Calcium Signaling Through CatSper Channels in Mammalian Fertilization. *Physiology* **25**, 165–175.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L. and Clapham, D. E.** (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**, 603–609.
- Rettinger, J., Schwarz, S. and Schwarz, W.** (2022). Electrophysiology.
- Richardson, L. L. and Oliphant, G.** (1981). Steroid concentrations in rabbit oviducal fluid during oestrus and pseudopregnancy. *J. Reprod. Fertil.* **62**, 427–431.
- Ritagliati, C., Baro Graf, C., Stival, C. and Krapf, D.** (2018). Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mech. Dev.* **154**, 33–43.
- Rivkin, E., Tres, L. L. and Kierszenbaum, A. L.** (2008). Genomic origin, processing and developmental expression of testicular outer dense fiber 2 (ODF2) transcripts and a novel nucleolar localization of ODF2 protein. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 1591–1606.
- Robaire, B., Hinton, B. T. and Orgebin-Crist, M. C.** (2006). The Epididymis. *Knobil Neill's Physiol. Reprod.* 1071–1148.
- Rodríguez, F., Bustos, M. A., Zanetti, M. N., Ruete, M. C., Mayorga, L. S. and Tomes, C. N.** (2011). alpha-SNAP prevents docking of the acrosome during sperm exocytosis because it sequesters monomeric syntaxin. *PLoS One* **6**, e21925.
- Roggero, C. M., De Blas, G. A., Dai, H., Tomes, C. N., Rizo, J. and Mayorga, L. S.** (2007). Complexin/synaptotagmin interplay controls acrosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* **282**, 26335–26343.
- Romarowski, A., Battistone, M. A., La Spina, F. A., Puga Molina, L. del C., Luque, G. M., Vitale, A. M., Cuasnicu, P. S., Visconti, P. E., Krapf, D. and Buffone, M. G.** (2015). PKA-dependent phosphorylation of LIMK1 and

- Cofilin is essential for mouse sperm acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* **405**, 237–49.
- Romarowski, A., Sanchez-Cardenas, C., Ramirez-Gomez, H. V., Puga Molina, L. D. C., Trevino, C. L., Hernandez Cruz, A., Darszon, A. I., Buffone, M. G., Hernandez-Cruz, A., Darszon, A. I., et al.** (2016a). A Specific Transitory Increase in Intracellular Calcium Induced by Progesterone Promotes Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm. *Biol. Reprod.* **94**, 1–12.
- Romarowski, A., Luque, G. M., La Spina, F. A., Krapf, D. and Buffone, M. G.** (2016b). Role of Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **220**, 129–44.
- Romarowski, A., Velasco Félix, Á. G., Rodríguez, P. T., Gervasi, M. G., Xu, X., Luque, G. M., Contreras-Jiménez, G., Sánchez-Cárdenas, C., Ramírez-Gómez, H. V., Krapf, D. D., et al.** (2018). Super-resolution imaging of live sperm reveals dynamic changes of the actin cytoskeleton during acrosomal exocytosis. *J. Cell Sci.* **131**,.
- Rossato, M., Virgilio, F. Di, Rizzuto, R., Galeazzi, C. and Foresta, C.** (2001). Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 119–128.
- Saint-Dizier, M., Mahé, C., Reynaud, K., Tsikis, G., Mermilliod, P. and Druart, X.** (2020). Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.* **516**,.
- Sakata, Y., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Shimizu, Y., Noda, T., Aso, T. and Tanabe, T.** (2002). Ca(v)2.3 (alpha1E) Ca2+ channel participates in the control of sperm function. *FEBS Lett.* **516**, 229–33.
- Saling, P. M.** (1989). Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* **11**, 339–388.
- Saling, P. M., Sowinski, J. and Storey, B. T.** (1979). An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: Sequential relationship to the acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* **209**, 229–238.
- Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C. and Wei, A.** (2006). High-

conductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 921–931.

- Sánchez-Cárdenas, C., Servín-Vences, M. R., José, O., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A. and Darszon, A.** (2014a). Acrosome reaction and Ca^{2+} imaging in single human spermatozoa: new regulatory roles of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$. *Biol. Reprod.* **91**, 67.
- Sánchez-Cárdenas, C., Servín-Vences, M. R., José, O., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A. and Darszon, A.** (2014b). Acrosome reaction and Ca^{2+} imaging in single human spermatozoa: New regulatory roles of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$. *Biol. Reprod.* **91**,
- Sánchez-Carranza, O., Torres-Rodríguez, P., Darszon, A., Treviño, C. L. and López-González, I.** (2015). Pharmacology of hSlo3 channels and their contribution in the capacitation-associated hyperpolarization of human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 554–559.
- Santi, C. M., Darszon, A. and Hernández-Cruz, A.** (1996). A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **271**,
- Santi, C. M., Butler, A., Kuhn, J., Wei, A. and Salkoff, L.** (2009). Bovine and mouse SLO3 K^{+} channels: evolutionary divergence points to an RCK1 region of critical function. *J. Biol. Chem.* **284**, 21589–21598.
- Santi, C. M., Martínez-López, P., Vega-Beltrán, J. L. De, Butler, A., Darszon, A., Salkoff, L., de la Vega-Beltrán, J. L., Butler, A., Alisio, A., Darszon, A., et al.** (2010). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett.* **584**, 1041–1046.
- Satouh, Y., Inoue, N., Ikawa, M. and Okabe, M.** (2012). Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J. Cell Sci.* **125**, 4985–90.
- Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M. and Salkoff, L.** (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K^{+} channel from mammalian spermatocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 3509–16.
- Schuh, K., Cartwright, E. J., Jankevics, E., Bundschu, K., Liebermann, J., Williams, J. C., Armesilla, A. L., Emerson, M., Oceandy, D., Knobeloch, K.-P. P., et al.** (2004). Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase 4 Is Required for Sperm Motility and Male Fertility. *J. Biol. Chem.* **279**, 28220–28226.

- Selvaraj, V., Buttke, D. E., Asano, A., McElwee, J. L., Wolff, C. A., Nelson, J. L., Klaus, A. V, Hunnicutt, G. R. and Travis, A. J.** (2007). GM1 dynamics as a marker for membrane changes associated with the process of capacitation in murine and bovine spermatozoa. *J. Androl.* **28**, 588–99.
- Seytanoglu, A., Stephen Georgiou, A., Sostaric, E., Watson, P. F., Holt, W. V. and Fazeli, A.** (2008). Oviductal cell proteome alterations during the reproductive cycle in pigs. *J. Proteome Res.* **7**, 2825–2833.
- Sharif, M., Hickl, V., Juarez, G., Di, X., Kerns, K., Sutovsky, P., Bovin, N. and Miller, D. J.** (2022). Hyperactivation is sufficient to release porcine sperm from immobilized oviduct glycans. *Sci. Rep.* **12**, 6446.
- Shi, Q. X., Yuan, Y. Y. and Roldan, E. R.** (1997). gamma-Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 677–83.
- Shiba, K., Baba, S. A., Inoue, T. and Yoshida, M.** (2008). Ca²⁺ bursts occur around a local minimal concentration of attractant and trigger sperm chemotactic response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19312–7.
- Sinowatz, F., Töpfer-Petersen, E., Kölle, S. and Palma, G.** (2001). Functional morphology of the zona pellucida. *Anat. Histol. Embryol.* **30**, 257–263.
- Siu, K. K., Serrão, V. H. B., Ziyyat, A. and Lee, J. E.** (2021). The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. *J. Cell Biol.* **220**,.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G. M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M. L., Jensen, T. K., Jørgensen, N., Swan, S. H., Sapra, K. J., et al.** (2016). Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol. Rev.* **96**, 55–97.
- Skerget, S., Rosenow, M. A., Petritis, K. and Karr, T. L.** (2015). Sperm Proteome Maturation in the Mouse Epididymis. *PLoS One* **10**, e0140650.
- Solaro, C. R. and Lingle, C. J.** (1992). Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science* **257**, 1694–1698.
- Sorum, B., Czégé, D. and Csanády, L.** (2015). Timing of CFTR Pore Opening and Structure of Its Transition State. *Cell* **163**, 724–733.
- Sosa, C. M., Pavarotti, M. A., Zanetti, M. N., Zoppino, F. C. M., De Blas, G. A. and Mayorga, L. S.** (2015). Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. *Mol. Hum. Reprod.* **21**, 244–254.

- Sosnik, J., Miranda, P. V., Spiridonov, N. A., Yoon, S., Fissore, R. A., Johnson, G. R. and Visconti, P. E.** (2009). Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J. Cell Sci.* **15**, 2741–2749.
- Steptoe, P. C. and Edwards, R. G.** (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet (London, England)* **2**, 366.
- Stival, C., La Spina, F. A., Baró Graf, C., Arcelay, E., Arranz, S. E., Ferreira, J. J., Le Grand, S., Dzikunu, V. A., Santi, C. M., Visconti, P. E., et al.** (2015). Src kinase is the connecting player between Protein Kinase A (PKA) activation and hyperpolarization through SLO3 potassium channel regulation in mouse sperm. *J. Biol. Chem.* **290**, 18855–18864.
- Stival, C., Puga Molina, L. del C., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E. and Krapf, D.** (2016). Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **220**, 93–106.
- Stival, C., Ritagliati, C., Xu, X., Gervasi, M. G., Luque, G. M., Baro Graf, C., Vega-Beltran, J. L., Torres, N. I., Darszon, A., Krapf, D., et al.** (2018). Disruption of protein kinase A localization induces acrosomal exocytosis in capacitated mouse sperm. *J. Biol. Chem.* **293**, jbc.RA118.002286.
- Storey, B. T., Lee, M. A., Muller, C., Ward, C. R. and Wirtshafter, D. G.** (1984). Binding of mouse spermatozoa to the zonae pellucidae of mouse eggs in cumulus: evidence that the acrosomes remain substantially intact. *Biol. Reprod.* **31**, 1119–1128.
- Stricker, S. A.** (1999). Comparative Biology of Calcium Signaling during Fertilization and Egg Activation in Animals. *Dev. Biol.* **211**, 157–176.
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R. and Kaupp, U. B.** (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* **471**, 382–386.
- Strünker, T., Alvarez, L. and Kaupp, U. B.** (2015). At the physical limit - chemosensation in sperm. *Curr. Opin. Neurobiol.* **34**, 110–116.
- Suarez, S. S.** (2001). Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. *Cells Tissues Organs* **168**, 105–112.
- Suarez, S. S.** (2002). Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod. Domest. Anim.* **37**, 140–143.
- Suarez, S. S.** (2008a). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 455–462.

- Suarez, S. S.** (2008b). Control of hyperactivation in sperm. *Hum. Reprod. Update* **14**, 647–657.
- Suarez, S. S.** (2016). Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.* **363**, 185–194.
- Suarez, S. S. and Dai, X.** (1992). Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol. Reprod.* **46**, 686–691.
- Suarez, S. S. and Ho, H. C.** (2003). Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **49**, 351–356.
- Suarez, S. S. and Pacey, A. A.** (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update* **12**, 23–37.
- Suarez, S. S., Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B. and Powell, R. L.** (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol. Reprod.* **44**, 375–381.
- Suarez, S. S., Varosi, S. M. and Dai, X.** (1993). Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 4660–4664.
- Suarez, S. S., Brockman, K. and Lefebvre, R.** (1997). Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol. Reprod.* **56**, 447–453.
- Sullivan, R.** (2015). Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian J. Androl.* **17**, 726–729.
- Swann, K. and Lai, F. A.** (2016). The sperm phospholipase C- ζ and Ca²⁺ signalling at fertilization in mammals. *Biochem. Soc. Trans.* **44**, 267–272.
- Syeda, S. S., Sánchez, G., McDermott, J. P., Hong, K. H., Blanco, G. and Georg, G. I.** (2020). The Na⁺ and K⁺ transport system of sperm (ATP1A4) is essential for male fertility and an attractive target for male contraception†. *Biol. Reprod.* **103**, 343–356.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M. and de Kruif, A.** (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 414–24.
- Tavares, R. S., Mansell, S., Barratt, C. L. R., Wilson, S. M., Publicover, S. J. and Ramalho-Santos, J.** (2013). p,p'-DDE activates CatSper and compromises human sperm function at environmentally relevant

- concentrations. *Hum. Reprod.* **28**, 3167–77.
- Taylor, S. S., Zhang, P., Steichen, J. M., Keshwani, M. M. and Kornev, A. P.** (2013). PKA: lessons learned after twenty years. *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 1271–1278.
- Terada, Y., Schatten, G., Hasegawa, H. and Yaegashi, N.** (2010). Essential roles of the sperm centrosome in human fertilization: developing the therapy for fertilization failure due to sperm centrosomal dysfunction. *Tohoku J. Exp. Med.* **220**, 247–258.
- Teves, M. E., Barbano, F., Guidobaldi, H. A., Sanchez, R., Miska, W. and Giojalas, L. C.** (2006). Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil. Steril.* **86**, 745–749.
- Teves, M. E., Guidobaldi, H. A., Uñates, D. R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S. J., Morales Garcia, A. A., Giojalas, L. C., Stephen, J., Teves, M. E., et al.** (2009). Molecular Mechanism for Human Sperm Chemotaxis Mediated by Progesterone. *PLoS One* **4**, e8211.
- Thomas, P.** (2008). Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progestin actions. *Front. Neuroendocrinol.* **29**, 292–312.
- Tomes, C. N., De Blas, G. A., Michaut, M. A., Farr??, E. V., Cherhitin, O., Visconti, P. E. and Mayorga, L. S.** (2005). alpha-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* **11**, 43–51.
- Torres-Fuentes, J. L., Rios, M. and Moreno, R. D.** (2015). Involvement of a P2X7 Receptor in the Acrosome Reaction Induced by ATP in Rat Spermatozoa. *J. Cell. Physiol.* **230**, 3068–75.
- Torres-Quesada, O., Mayrhofer, J. E. and Stefan, E.** (2017). The many faces of compartmentalized PKA signalosomes. *Cell. Signal.* **37**, 1–11.
- Torrezan-Nitao, E., Brown, S. G., Mata-Martínez, E., Treviño, C. L., Barratt, C. and Publicover, S.** (2020). [Ca $^{2+}$]i oscillations in human sperm are triggered in the flagellum by membrane potential-sensitive activity of CatSper. *Hum. Reprod.*
- Torrezan-Nitao, E., Guidobaldi, H., Giojalas, L., Barratt, C. and Publicover, S.** (2021). Behavioural switching during oscillations of intracellular Ca $^{2+}$

- concentration in free-swimming human sperm. *Reprod. Fertil.* **2**, L5–L7.
- Toshimori, K.** (2009). Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **204**, 5–94.
- Tourmente, M., Sansegundo, E., Rial, E. and Roldan, E. R. S.** (2022). Capacitation promotes a shift in energy metabolism in murine sperm. *Front. cell Dev. Biol.* **10**,
- Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hosi, T.** (1971). Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn. J. Anim. Reprod.* **16**, 147–151.
- Tsai, P.-S., Garcia-Gil, N., van Haeften, T. and Gadella, B. M.** (2010). How pig sperm prepares to fertilize: stable acrosome docking to the plasma membrane. *PLoS One* **5**, e11204.
- Tsirulnikov, E., Huta, Y. and Breitbart, H.** (2019). PKA and PI3K activities during capacitation protect sperm from undergoing spontaneous acrosome reaction. *Theriogenology* **128**, 54–61.
- Tulsiani, D. R. P. and Abou-Haila, A.** (2008). Male contraception: an overview of the potential target events. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **8**, 122–31.
- Tung, C. K., Hu, L., Fiore, A. G., Ardon, F., Hickman, D. G., Gilbert, R. O., Suarez, S. S. and Wu, M.** (2015). Microgrooves and fluid flows provide preferential passageways for sperm over pathogen *Tritrichomonas foetus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 5431–5436.
- Tung, C. K., Lin, C., Harvey, B., Fiore, A. G., Ardon, F., Wu, M. and Suarez, S. S.** (2017). Fluid viscoelasticity promotes collective swimming of sperm. *Sci. Rep.* **7**,
- Ueda, Y., Yamaguchi, R., Ikawa, M., Okabe, M., Morii, E., Maeda, Y. and Kinoshita, T.** (2007). PGAP1 Knock-out Mice Show Otocephaly and Male Infertility. *J. Biol. Chem.* **282**, 30373–30380.
- Uhler, M. L., Leung, A., Chan, S. Y. W. and Wang, C.** (1992). Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil. Steril.* **58**, 1191–1198.
- van Duin, M., Polman, J. E., De Breet, I. T., van Ginneken, K., Bunschoten, H., Grootenhuis, A., Brindle, J. and Aitken, R. J.** (1994). Recombinant

- human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.* **51**, 607–17.
- Visconti, P. E.** (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 667–668.
- Visconti, P. E., Muschietti, J. P., Flavia, M. M. and Tezon, J. G.** (1990). Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* **1054**, 231–236.
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P. and Kopf, G. S.** (1995). Capacitation of mouse spermatozoa I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**, 1129–1137.
- Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S. and Diekman, A. B.** (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J. Reprod. Immunol.* **53**, 133–50.
- Visconti, P. E., Krapf, D., de la Vega-Beltrán, J. L., Acevedo, J. J. and Darszon, A.** (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* **13**, 395–405.
- Voisin, A., Saez, F., Drevet, J. and Guiton, R.** (2019). The epididymal immune balance: a key to preserving male fertility. *Asian J. Androl.* **21**, 531–539.
- Vyklicka, L. and Lishko, P. V.** (2020). Dissecting the signaling pathways involved in the function of sperm flagellum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **63**, 154–161.
- Walensky, L. D. and Snyder, S. H.** (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell Biol.* **130**, 857–869.
- Wandernoth, P. M., Raubuch, M., Mannowetz, N., Becker, H. M., Deitmer, J. W., Sly, W. S. and Wennemuth, G.** (2010). Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. *PLoS One* **5**, e15061–e15061.
- Wang, S. and Larina, I. V.** (2018). In vivo three-dimensional tracking of sperm behaviors in the mouse oviduct. *Dev.* **145**,.
- Wang, D., King, S. M., Quill, T. A., Doolittle, L. K. and Garbers, D. L.** (2003).

- A new sperm-specific Na^+/H^+ Exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat. Cell Biol.* **5**, 1117–1122.
- Wang, Y., Shibasaki, F. and Mizuno, K.** (2005). Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by slingshot via calcineurin. *J. Biol. Chem.* **280**, 12683–12689.
- Wang, D., Hu, J., Bobulescu, I. A., Quill, T. A., McLeroy, P., Moe, O. W. and Garbers, D. L.** (2007). A sperm-specific Na^+/H^+ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 9325–9330.
- Wassarman, P. M. and Litscher, E. S.** (2008). Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 665–676.
- Wennemuth, G., Westenbroek, R. E., Xu, T., Hille, B. and Babcock, D. F.** (2000). $\text{CaV}2.2$ and $\text{CaV}2.3$ (N- and R-type) Ca^{2+} channels in depolarization-evoked entry of Ca^{2+} into mouse sperm. *J. Biol. Chem.* **275**, 21210–7.
- Wertheimer, E. V., Salicioni, A. M., Liu, W., Trevino, C. L., Chávez, J. C., Hernández-González, E. O., Darszon, A. and Visconti, P. E.** (2008). Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **283**, 35539–35550.
- Wertheimer, E., Krapf, D., De La Vega-Beltran, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Navarrete, F., Haddad, D., Escoffier, J., Salicioni, A. M., Levin, L. R., Buck, J., et al.** (2013). Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J. Biol. Chem.* **288**, 35307–35320.
- Westbrook-Case, V. A., Winfrey, V. P. and Olson, G. E.** (1994). A domain-specific 50-kilodalton structural protein of the acrosomal matrix is processed and released during the acrosome reaction in the guinea pig. *Biol. Reprod.* **51**, 1–13.
- Windler, F., Bönigk, W., Körschen, H. G., Grahn, E., Strünker, T., Seifert, R. and Kaupp, U. B.** (2018). The solute carrier SLC9C1 is a Na^+/H^+ -exchanger gated by an S4-type voltage-sensor and cyclic-nucleotide binding. *Nat. Commun.* **9**,.
- Wolf, D. E., Hagopian, S. S. and Ishijima, S.** (1986). Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *J. Cell Biol.* **102**, 1372–7.

- World Health Organization, W. H.** (2010). *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*. 5th ed. Geneva: World Health Organization.
- Xia, J. and Ren, D.** (2009). Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels. *Biol. Reprod.* **80**, 1092–8.
- Xia, J., Reigada, D., Mitchell, C. H. and Ren, D.** (2007). CATSPER channel-mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biol. Reprod.* **77**, 551–9.
- Xu, W. M., Shi, Q. X., Chen, W. Y., Zhou, C. X., Ni, Y., Rowlands, D. K., Yi Liu, G., Zhu, H., Ma, Z. G., Wang, X. F., et al.** (2007). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 9816–9821.
- Xu, Y., Fan, Y., Fan, W., Jing, J., Xue, K., Zhang, X., Ye, B., Ji, Y., Liu, Y. and Ding, Z.** (2018). RNASET2 impairs the sperm motility via PKA/PI3K/calcium signal pathways. *Reproduction* **155**, 383–392.
- Yamashita, Y., Shimada, M., Okazaki, T., Maeda, T. and Terada, T.** (2003). Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* **68**, 1193–1198.
- Yanagimachi, R.** (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J. Reprod. Fertil.* **23**, 193–196.
- Yanagimachi, R.** (1989). Sperm capacitation and gamete interaction. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **38**, 27–33.
- Yanagimachi, R.** (1994a). *Mammalian fertilization*. (ed. Neill, J. D.) and E, K.) New York: Raven Press.
- Yanagimachi, R.** (1994b). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* **2**, 371–372.
- Yanagimachi, R.** (2022). Mysteries and unsolved problems of mammalian fertilization and related topics. *Biol. Reprod.* **106**, 644–675.
- Yanagimachi, R. and Chang, M. C.** (1963). Fertilization of Hamster Eggs in vitro. *Nature* **200**, 281–282.
- Yanagimachi, R., Kamiguchi, Y., Mikamo, K., Suzuki, F. and Yanagimachi, H.** (1985). Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *Am. J. Anat.* **172**, 317–30.

- Yunes, R., Tomes, C., Michaut, M., De Blas, G., Rodriguez, F., Regazzi, R. and Mayorga, L. S.** (2002). Rab3A and calmodulin regulate acrosomal exocytosis by mechanisms that do not require a direct interaction. *FEBS Lett.* **525**, 126–130.
- Zalazar, L., Stival, C., Nicolli, A. R., De Blas, G. A., Krapf, D. and Cesari, A.** (2020). Male Decapacitation Factor SPINK3 Blocks Membrane Hyperpolarization and Calcium Entry in Mouse Sperm. *Front. cell Dev. Biol.* **8**.
- Zamir, N., Barkan, D., Keynan, N., Naor, Z. and Breitbart, H.** (1995). Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am. J. Physiol.* **269**, E216-21.
- Zanetti, N. and Mayorga, L. S.** (2009). Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biol. Reprod.* **81**, 396–405.
- Zeng, Y., Clark, E. N. and Florman, H. M.** (1995). Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* **171**, 554–63.
- Zeng, Y., Oberdorf, J. A. and Florman, H. M.** (1996). 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. *Dev. Biol.* **173**, 510–520.
- Zeng, X.-H., Yang, C., Kim, S. T., Lingle, C. J. and Xia, X.-M. X.-M.** (2011). Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K⁺ current in mouse spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5879–5884.
- Zeng, X. H., Yang, C., Xia, X. M., Liua, M. and Lingle, C. J.** (2015). SLO3 auxiliary subunit LRRC52 controls gating of sperm KSPER currents and is critical for normal fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 2599–2604.
- Zhao, L., Burkin, H. R., Shi, X., Li, L., Reim, K. and Miller, D. J.** (2007). Complexin I is required for mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* **309**, 236–244.
- Zhou, W., De Iuliis, G. N., Dun, M. D. and Nixon, B.** (2018). Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**.