



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad De Ciencias Exactas y Naturales

**Análisis por microscopía de súper-resolución de los cambios en el flagelo
espermático murino durante la fusión con el ovocito**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Martina Jabłoński

Director de tesis: Dr. Mariano G. Buffone

Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

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

Fecha de defensa oral: 14/03/23

Buenos Aires, 2023

Agradecimientos

A **Marian**, por todo. Por la confianza en incluirme en tu gran equipo de trabajo, por las oportunidades que me diste desde el principio, por el entusiasmo que transmitís, por creer en mí más que yo misma, por la dirección durante estos años, por las palabras tranquilizadoras en los momentos justos, por la paciencia y por la buena predisposición siempre.

A **Guille, Jami y Pau**, mis compañeras durante estos años de doctorado que inmediatamente se transformaron en amigas con las que disfruté cada minuto de trabajo. Sin duda, no hubiese sido lo mismo sin ustedes. Gracias por bancarme, por hacerme reír y por acompañarme en esta etapa.

A **Guille**, por enseñarme todo lo que sé en el laboratorio, por explicarme y ayudarme con amor y paciencia siempre, por tu prolijidad y criterio que hacen que seas un modelo a seguir y por tu revisión minuciosa de la tesis.

A **Jami**, por ser mi compañera de mesada y de un viaje hermoso, por los Electrolit y Ruffles compartidos, por las risas, en especial en esos días caóticos donde todo nos salía mal y por estar siempre dispuesta a dar una mano en lo que sea.

A **Pau**, por ser mi melli, por tu optimismo, por ayudarme cada vez que lo necesité, por la habilidad compartida de hablar por tres redes sociales diferentes de diferentes temas, por nuestras salidas de expediciones, por ser una excelente compañera de viaje y por los mil memes compartidos.

A **Mati**, por la compañía y por el aguante durante los experimentos de fusión, por entender y actuar todos los memes conmigo, trabajar con vos es muy divertido.

A **Ani**, por la alegría que traes al laboratorio y por la ayuda y los consejos sobre célula única durante la primera etapa del proyecto.

A **Clari, Nati, Lu y Nechu**, por la buena onda y predisposición de todos los días.

A **Pablo**, por la confianza y la libertad para usar sola el microscopio y por las charlas compartidas que hicieron más llevaderas las mil horas de experimento.

A **Alberto y Adán**, por darme la oportunidad de viajar y trabajar en sus laboratorios, fueron experiencias muy fructíferas de las cuales derivaron gran parte de los resultados de esta tesis. A **Alberto**, por la generosidad, por la mirada crítica y por brindar todo tu conocimiento para mejorar este proyecto. A **Adán**, por el optimismo y entusiasmo por hacer ciencia, por la paciencia para

Agradecimientos

enseñarme a programar y por hacer, junto con R, mi cuarentena más divertida, disfruté mucho trabajar con vos en incontables horas de Zoom.

A **Clau**, por las infinitas horas en el microscopio llenas de charlas y risas, por tu amistad y por todos los chais compartidos. Trabajar a la par con vos fue una de las experiencias más lindas de México.

A **Gaby**, por tu amistad desde el primer día que pisamos México, por tu alegría y por la compañía durante toda mi estadía.

A **Giuli, Yae, Tati y Meli**, por estar siempre, por las juntadas llenas de risas o llantos y por la amistad de tantos años.

A **Mamá, Papá, Jaz, Marian, Abuela**, por el amor incondicional. En especial a **Mamá, Papá y Jaz** por bancarme, por la contención en los momentos difíciles, por el apoyo en todas mis decisiones, por la paciencia infinita y por ayudarme siempre que lo necesité, no sería nada sin ustedes.

Al **IBYME**, por brindarme un excelente ambiente de trabajo.

Al **CONICET**, por financiar el desarrollo de esta tesis. A **Male Contraceptive Initiative** y **Chan Zuckerberg Initiative**, por financiar las estancias en México.

A la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA**, por formarme.

Índice

Resumen	9
Abstract.....	13
Abreviaturas	16
Introducción.....	19
La espermatogénesis	20
Maduración espermática	22
Morfología espermática.....	24
Cabeza	25
Flagelo	25
Capacitación.....	29
Hiperactivación	38
Exocitosis acrosomal (EA).....	41
Fusión de membranas durante la EA.....	42
El sitio y los inductores de la EA	44
Fecundación	48
Proteínas de reconocimiento.....	49
Fases de la fusión de las gametas	50
Fusión y movilidad espermática	52
Activación ovocitaria.....	52
Objetivo e Hipótesis	54
Materiales y Métodos	56
Reactivos	57
Animales	57
Medio de cultivo y capacitación	57
<i>Live imaging</i> de espermatozoides transgénicos durante la EA	58
Análisis de la movilidad espermática.....	58
<i>Live imaging</i> de la MP de la pieza media durante la EA	59

Microscopía óptica y de súper-resolución	59
SRRF y MSSR	67
Curva de relación de los datos de contracción y fluorescencia de FM4-64.	
Transformación de datos de fluorescencia a contracción	69
<i>Live imaging</i> de los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ y EA	70
Kimograma 3D	70
<i>Live imaging</i> de la MP de la pieza media y la actina-F durante la EA.....	71
Análisis de colocalización	71
Análisis del cambio de posición de los máximos de fluorescencia	72
STORM 3D	73
Ensayo de fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	75
Ensayo de fusión de espermatozoides y ovocitos	75
Análisis estadístico	76
Resultados	82
La EA promueve el cese de la movilidad en un subconjunto de espermatozoides	83
La EA ocurre concomitantemente con una disminución en el diámetro de la pieza media	88
La contracción de la pieza media se inicia preferentemente en la parte proximal del flagelo	90
La reducción del diámetro de la pieza media se produce concomitantemente con un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el flagelo	95
El citoesqueleto de actina se aproxima a la MP durante la contracción de la pieza media	98
El citoesqueleto de actina en la pieza media se remodela durante la EA	103
La mayoría de los espermatozoides localizados en el espacio perivitelino muestran una contracción de la pieza media	105

La contracción de la pieza media se produce luego de la fusión del espermatozoide y el ovocito	107
Luego de la fusión, una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ precede a la contracción de la pieza media.....	110
Discusión	114
Bibliografía.....	124

Resumen

Las ciliias y los flagelos son estructuras celulares altamente conservadas presentes en la mayoría de los animales, así como en muchas plantas y protozoos eucariotas. El flagelo puede funcionar como una hélice oscilante autónoma en presencia de adenosín trifosfato (ATP) y un entorno iónico apropiado. En el caso de los espermatozoides de mamífero, para llegar al sitio de fecundación, utilizan el flagelo para desplazarse dentro del aparato reproductor femenino. Este transporte ocurre en el oviducto femenino concomitantemente con un proceso llamado capacitación, donde los espermatozoides atraviesan una serie compleja de cambios bioquímicos y celulares para adquirir la capacidad de fecundar. La capacitación permite que los espermatozoides desarrollen dos eventos celulares esenciales: uno es la adquisición de la movilidad hiperactivada y el otro es la capacidad de realizar la exocitosis acrosomal (EA; también conocida como reacción acrosomal) en respuesta a estímulos específicos.

Aunque la EA es esencial para la fecundación, poco se sabe de los espermatozoides que pierden el acrosoma. Esto es particularmente importante *in vivo*, ya que los espermatozoides luego de la EA aún necesitan realizar procesos importantes como la migración a la *ampulla*, la localización de los ovocitos no fecundados, la penetración de la matriz del *cumulus* y la zona pellucida (ZP) y, finalmente, la fusión con el ovocito. Por lo tanto, es fundamental estudiar este subconjunto de gametas. En este trabajo investigamos los cambios celulares y moleculares que ocurren en el flagelo del espermatozoide murino después del inicio de la EA, momento a partir del cual están listos para fecundar al ovocito.

Para esto, realizamos ensayos de célula única combinado con microscopía de fluorescencia para estudiar, en principio, el patrón de movimiento de las células que perdieron el acrosoma. Utilizando el ratón transgénico que expresa EGFP en el acrosoma combinado con otro marcador de la EA como es la sonda de membrana FM4-64 se pudo ver que la mayoría de las células reaccionadas pierden movilidad. Sorprendentemente, este grupo de células presentan alta fluorescencia de FM4-64 en la pieza media. Para estudiar este fenómeno en más detalle, se procedió a emplear técnicas y algoritmos de súper-resolución. Entre ellos, se utilizaron Fluctuaciones Radiales de Súper-resolución (*Super-*

Resolution Radial Fluctuations, SRRF) y Súper-Resolución de la Media Desplazada (*Mean Shift Super-Resolution*, MSSR). Gracias a estas tecnologías, encontramos que este cambio de fluorescencia de FM4-64 está asociado a una disminución en el diámetro de la pieza media del espermatozoide.

Muchos reportes previos han mostrado que la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) juega un rol fundamental en la EA en ratón. Específicamente, se observó que hay un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza y luego este ion se trasporta a la pieza media. Es por ello, que realizamos experimentos de célula única utilizando la sonda Fluo4 (marcador de la $[Ca^{2+}]_i$) junto con FM4-64 para ver si el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ es coincidente con la contracción de la pieza media. Luego de la inducción con progesterona, se vio que la mayoría de las células presentan un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en la pieza media, que ocurre previo a la contracción del flagelo.

Por otra parte, se estudió la relación entre la contracción y la doble hélice de actina que acompaña a las mitocondrias en la pieza media. Para esto, por un lado, se realizaron experimentos de célula única con FM4-64 y una sonda que se une a actina polimerizada, SiR-actin. Estos resultados demuestran que a medida que la pieza media se contrae, la doble hélice de actina y la membrana se acercan ya que aumenta la colocalización de ambas sondas. Por otro lado, también se emplearon otras técnicas de súper-resolución en espermatozoides fijados como la Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*, STORM) para ver en detalle la estructura de dicha doble hélice de actina. Se encontró que, con la EA, la doble hélice cambia su estructura tanto en el radio como en la periodicidad de las vueltas.

Por último, para estudiar estos cambios estructurales de la pieza media en un ensayo funcional, se hicieron experimentos con ovocitos de fecundación *in vitro* y de fusión de las gametas en tiempo real. Como resultado, se observó que la pieza media del espermatozoide murino presenta una disminución en la $[Ca^{2+}]_i$ seguido de la contracción a medida que progresa la fusión con el ovocito.

En conclusión, los resultados de esta tesis demuestran que la pieza media del flagelo murino atraviesa cambios estructurales y dinámicos durante la fusión con el ovocito que pueden ser esenciales para que el flagelo detenga su movilidad y se fusione correctamente con la gameta femenina.

Palabras clave: capacitación, exocitosis acrosomal (EA), flagelo, fusión de las gametas.

Abstract

Super-resolution microscopy analysis of changes in the murine sperm flagellum during fusion with the oocyte

Cilia and flagella are highly conserved cellular structures present in most animals, as well as in plants and eukaryotic protozoa. The flagellum can function as an autonomous oscillating helix in the presence of adenosine triphosphate (ATP) and an appropriate ionic environment. In the case of mammalian sperm, to reach the site of fertilization, they use the flagellum to swim within the female reproductive tract. This transport occurs in the female oviduct concomitantly with a process called capacitation, where sperm go through a complex series of biochemical and cellular changes to acquire the ability to fertilize. Capacitation allows sperm to perform two essential cellular events: one is the acquisition of hyperactivated motility and the other is the ability to undergo acrosomal exocytosis (AE; also known as acrosomal reaction) in response to specific stimuli.

Although AE is essential for fertilization, little is known about sperm that lose the acrosome. This is particularly important *in vivo*, after AE, as sperm still need to perform important processes such as migration to the *ampulla*, localization of unfertilized eggs, penetration of the *cumulus* matrix and zona pellucida, and finally, fusion with the oocyte. Therefore, it is essential to study this subset of gametes. In this work we investigate the cellular and molecular changes that occur in the sperm flagellum after the onset of AE, when the sperm are ready to fertilize the oocyte.

For this, we performed single cell experiments combined with fluorescence microscopy to study, first, the motility pattern of the acrosome-reacted cells. Using the transgenic mouse that expresses EGFP in the acrosome combined with another AE marker such as the membrane probe FM4-64, it was noticed that most of the acrosome-reacted cells lose motility. Surprisingly, this group of cells exhibited high FM4-64 fluorescence in the midpiece. To study this phenomenon in more detail, super-resolution techniques and algorithms were used. Among them, Super-Resolution Radial Fluctuations (SRRF) and Mean Shift Super-Resolution (MSSR) were employed. Thanks to these technologies, we found that this change in FM4-64 fluorescence is associated with a decrease in the diameter of the sperm midpiece.

Previous reports have shown that intracellular calcium plays a fundamental role in AE in mice, specifically, it was seen that there is a transient increase in intracellular calcium in the head and then this ion is transported to the midpiece. For this reason, single cell experiments were carried out using Fluo4 (intracellular calcium probe) together with FM4-64 to see if the increase in calcium is coincident with the contraction of the midpiece. After induction with progesterone, it was seen that most cells showed a transient increase in calcium in the midpiece, which occurs prior to the contraction.

Furthermore, the relation of the contraction with the actin double helix that accompanies the mitochondria in the midpiece was studied. To achieve this, firstly, single cell experiments were performed with FM4-64 and the F-actin probe, SiR-actin. These results demonstrate that as the midpiece contracts, the actin double helix and the membrane come closer as colocalization of both probes increases. Secondly, other super-resolution techniques were also used in fixed sperm, such as Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) to see in detail the structure of the actin double helix. It was found that with AE, the double helix changes its structure both in the magnitude of the radius and in the periodicity of the helix turns.

Finally, in order to study these structural changes in the midpiece in a functional assay, *in vitro* fertilization and gamete fusion experiments were carried out in real time. As a result of these, it was found that the midpiece of the murine sperm exhibits a decrease in intracellular calcium followed by contraction as fusion with the oocyte progresses.

In conclusion, the results of this thesis demonstrate that the midpiece of the murine flagellum undergoes structural and dynamic changes during fusion with the oocyte that may be essential for the flagellum to stop moving and fuse correctly with the female gamete.

Keywords: capacitation, acrosomal exocytosis (AE), flagellum, gamete fusion.

Abreviaturas

ACs	Adenilato ciclasa soluble
Actina-F	Actina fibrilar
Actina-G	Actina globular
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
CAP	Capacitante
CO	<i>Cumulus oophorus</i>
COC	Complejo <i>cumulus</i> -ovocito
DIC	Contraste de interferencia diferencial
EA	Exocitosis acrosomal
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EGFP-DsRed2	Ratón transgénico B6D2F1-Tg (CAG/mt-DsRed2, Acr-EGFP) RBGS002Osb
Em	Potencial de membrana
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
MAE	Membrana acrosomal externa
MAI	Membrana acrosomal interna
MP	Membrana plasmática
MS	Media desplazada
MSSR	Súper-Resolución de la Media Desplazada (<i>Mean Shift Super-Resolution</i>)
NC	No capacitante
pH_i	pH intracelular
PKA	Proteína quinasa A
PMCA	Bomba de Ca ²⁺ ATPasa de membrana plasmática

pPKA	Sustratos fosforilados por PKA
PSF	Función de punto extendido (<i>Point spread fuction</i>)
pY	Sustratos fosforilados en tirosina
SEM	Error estándar de la media
SRRF	Fluctuaciones Radiales de Súper-Resolución (<i>Super-Resolution Radial Fluctuations</i>)
STORM	Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica (<i>Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>)
ZP	Zona pellucida

Introducción

La fecundación es un proceso fundamental y necesario para la unión de dos gametas haploides, el espermatozoide y el ovocito, con el fin de producir un individuo único. Las gametas interactúan, se reconocen y fusionan creando un cigoto, permitiendo así la continuidad de la especie. Se necesitan gametas maduras y competentes para lograr este proceso impecablemente regulado. Sin embargo, hasta el día de hoy, aún estamos lejos de comprender completamente el diálogo molecular intracelular que ocurre entre ambas gametas y es necesario para la fecundación (Darszon et al., 2011).

El espermatozoide es una célula especializada capaz de alcanzar, reconocer y fusionarse con el ovocito, a pesar de ser esencialmente incapaz de la transcripción génica y síntesis de proteínas. A continuación, se describen las principales características morfológicas y funcionales del espermatozoide de mamífero y los eventos fisiológicos que ocurren en el antes de la fecundación, en el marco de los objetivos de esta tesis.

La espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso biológico complejo de transformación celular que produce células germinales haploides masculinas a partir de células madre diploides, las espermatogonias. Este proceso ha sido simplificado morfológicamente al reconocer asociaciones celulares o "etapas" y "fases" de espermatogénesis, que progresa a través de ciclos altamente organizados y cronometrados con precisión. Los ciclos de espermatogénesis son esenciales para la producción continua de espermatozoides, que depende de numerosos factores, tanto intrínsecos (células de Sertoli y germinales) como extrínsecos (andrógenos), además de ser específicos de cada especie (Hess & de Franca, 2008).

En los testículos de los mamíferos, la espermatogénesis tiene lugar en el epitelio del túbulo seminífero, que es la unidad funcional que produce los espermatozoides (**Figura 1**). La espermatogénesis se divide en cuatro fases: mitosis, meiosis, espermiogénesis y espermiación. Estos eventos son concomitantes con el movimiento de desarrollo de las células germinales desde el compartimento basal al adluminal (o apical). Estos dos compartimentos son creados por la barrera hematotesticular (BHT) a través de uniones estrechas

entre las células de Sertoli. La BHT confiere una barrera inmunológica y un microambiente especializado propicio para el desarrollo de los espermatozoides (Cheng y Mruk, 2009).

En el compartimento basal, las espermatogonias (células madre germinales) primarias proliferan y después de un número fijo de divisiones mitóticas se diferencian en espermatoцитos primarios (leptonene). Este tipo celular es el único que atraviesa la BHT hacia el compartimento adluminal. Una vez en el compartimento adluminal, los espermatoцитos secundarios (paquitene y diplotene) se forman por la primera meiosis y se convierten en espermátidas redondas por la segunda meiosis. El proceso continúa con la espermiogénesis donde las espermátidas experimentan una fuerte transformación morfológica que incluye, entre otros, la formación del acrosoma, la condensación de la cromatina, y la eliminación del exceso de citoplasma para producir espermátidas alargadas que migran hacia el borde de la luz. Durante la espermiación, los espermatozoides completamente desarrollados se liberan en el lumen del túbulo seminífero (**Figura 1**). Las células espermatogénicas no realizan este proceso de forma independiente; en cambio, son alimentadas por células de Sertoli dentro de los túbulos mientras que la estimulación hormonal es proporcionada por células de Leydig del compartimento intersticial (Darszon et al., 2011).

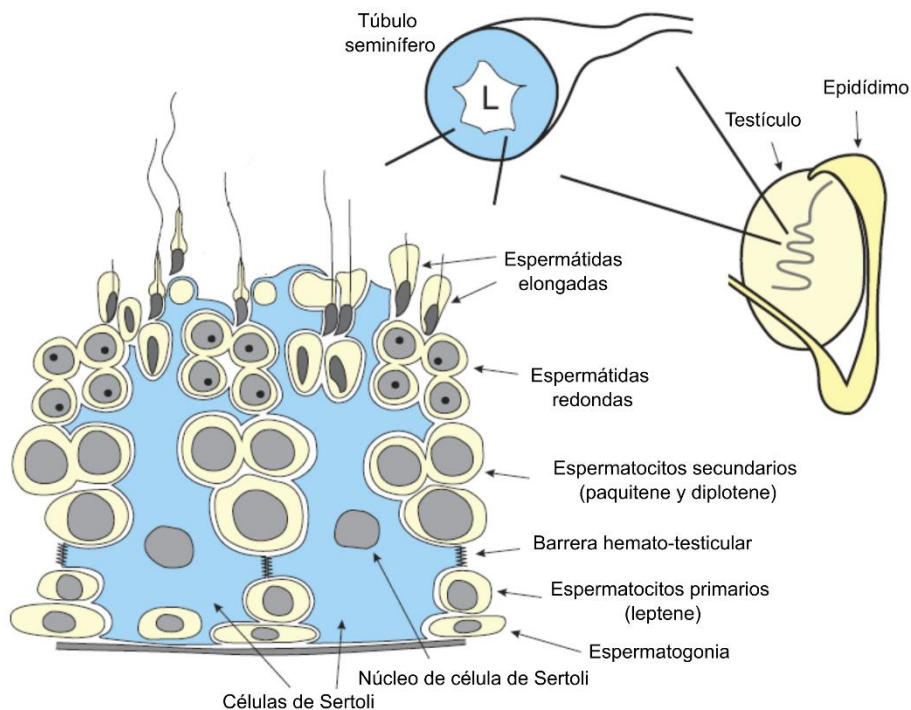


Figura 1. Diagrama de los órganos reproductores masculinos de mamífero y la espermatogénesis.
Adaptado de (Darszon et al., 2011).

Maduración espermática

Los túbulos seminíferos convergen para formar la *rete testis*, que a su vez da lugar a los conductos eferentes. Estos convergen para formar un solo conducto altamente enrollado y largo, el epidídimo (**Figura 2**) (Robaire et al., 2006). Los espermatozoides que salen de los testículos, aunque morfológicamente diferenciados, no están listos para fecundar a los ovocitos. Se consideran funcionalmente inmaduros debido a su incapacidad para nadar de manera progresiva e interactuar con el complejo *cumulus*-ovocito (COC). Estas capacidades se desarrollan progresivamente durante el descenso de las células a través del epidídimo. Esto se logra mediante interacciones continuas con el microambiente luminal del epidídimo y notablemente, ocurre en ausencia completa de transcripción de genes *de novo* y traducción de proteínas (Zhou et al., 2018). En la mayoría de los animales, los espermatozoides tardan unos 10 días en pasar a través del epidídimo a pesar de las enormes variaciones de longitud entre las especies (Yanagimachi, 1994b).

El epidídimo generalmente se divide en cuatro grandes regiones anatómicas: el segmento inicial, *caput* (cabeza), *corpus* (cuerpo) y *cauda* (cola) (**Figura 2**).

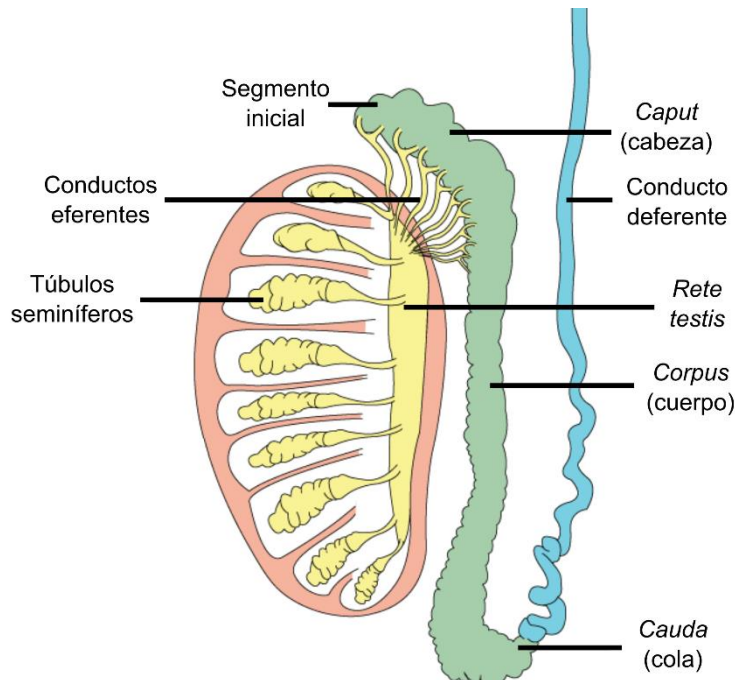


Figura 2. Estructura del epidídimo. Adaptado de <https://www.geeksforgeeks.org/testes-anatomy-and-functions>.

El sitio donde los espermatozoides comienzan a adquirir capacidad fecundante varía según la especie, pero generalmente es el *corpus* o *cauda* del epidídimo

(Yanagimachi, 1994b). El segmento inicial y los conductos eferentes son responsables de la absorción de la mayor parte del líquido testicular que ingresa al conducto. A partir de entonces, el *caput* del epidídimo es más activo en términos de síntesis y secreción de proteínas, y una pequeña porción de los espermatozoides que pasan por esta región comienzan a exhibir la capacidad de nadar de manera progresiva y reconocer a un ovocito (Chevrier y Dacheux, 1992). Estas características funcionales continúan desarrollándose en el *corpus* del epidídimo antes de alcanzar un nivel óptimo en el segmento distal del *cauda*. Esta última región se caracteriza por una luz relativamente grande y las células epiteliales que la rodean exhiben una fuerte actividad de absorción. Dichos atributos se alinean con la función dominante del *cauda* epididimario de almacenamiento de espermatozoides (Zhou et al., 2018).

De esta manera, las cuatro funciones principales del epidídimo son: el transporte de espermatozoides, el desarrollo de la movilidad, la adquisición de la capacidad fecundante de los espermatozoides y la creación de un entorno luminal especializado y propicio del proceso de maduración a través de la absorción y actividades secretoras del epitelio del epidídimo (Robaire et al., 2006).

En lo que al transporte respecta, los espermatozoides entran al epidídimo impulsados por el líquido testicular y el batido de las células ciliadas de los conductos eferentes. Sin embargo, en el epidídimo, el epitelio está revestido por estereocilias inmóviles y la captación masiva de líquido que tiene lugar en los conductos eferentes y el segmento inicial del epidídimo reduce drásticamente el flujo de este fluido. No obstante, el epidídimo está rodeado por una capa de músculo liso de espesor creciente e innervación α -adrenérgica desde las regiones proximales a las más distales. Por lo tanto, el mecanismo responsable de impulsar el contenido a través de la luz del epidídimo en reposo se ha atribuido principalmente a las contracciones rítmicas del músculo liso que recubre el epidídimo (Robaire et al., 2006).

Por otra parte, la maduración del potencial de movilidad de los espermatozoides implica tanto un aumento en el porcentaje de espermatozoides que ganan movilidad como una diferencia cualitativa en los patrones de movilidad. Los espermatozoides testiculares son inmóviles o muestran solo una leve vibración del flagelo. En cambio, los espermatozoides liberados del *caput* del epidídimo

nadan en forma circular, mientras que los espermatozoides liberados del *cauda* son capaces de avanzar de manera progresiva y vigorosa (Robaire et al., 2006).

El epitelio epididimario es pseudoestratificado y bajo estimulación adrenérgica, las células epiteliales secretan una mezcla compleja de proteínas. Estas proteínas, así como otras macromoléculas del compartimento intraluminal del epidídimo, interactúan con los espermatozoides en tránsito a través de epididimosomas. La composición del medio intraluminal va variando a lo largo del epidídimo y las modificaciones bioquímicas que atraviesan los espermatozoides van ocurriendo de manera secuencial a través del mismo (Sullivan, 2015). Los epididimosomas fueron descritos por primera vez por Yanagimachi a mediados de la década de 1980 (Yanagimachi et al., 1985). Son vesículas unidas a la membrana que se pueden encontrar en estrecho contacto con la membrana plasmática (MP) del espermatozoide en el compartimento intraluminal. Se ha planteado la hipótesis de que los epididimosomas del compartimento intraluminal del epidídimo están involucrados en la transferencia de proteínas a los espermatozoides (Sullivan, 2015). Recientemente se realizó un estudio proteómico de espermatozoides murinos colectados del *caput*, *corpus* y *cauda* epididimario y se determinó la identidad y número de proteínas que se incorporan o remueven de las células durante su tránsito por cada segmento. Los espermatozoides de los segmentos iniciales del *caput* y *corpus*, están enriquecidos en proteínas relacionadas a la reorganización lipídica, mientras que los de *cauda* se caracterizan por poseer elementos de reconocimiento espermatozoide-ovocito y de movilidad (Skerget et al., 2015).

Morfología espermática

El espermatozoide es una célula altamente especializada con características estructurales y funcionales únicas que le otorgan la singular capacidad de aportar el genoma masculino al ovocito. Es además una célula polarizada donde los dos componentes principales son la cabeza y el flagelo, unidos por un cuello (**Figura 3**) (Eddy, 2006).

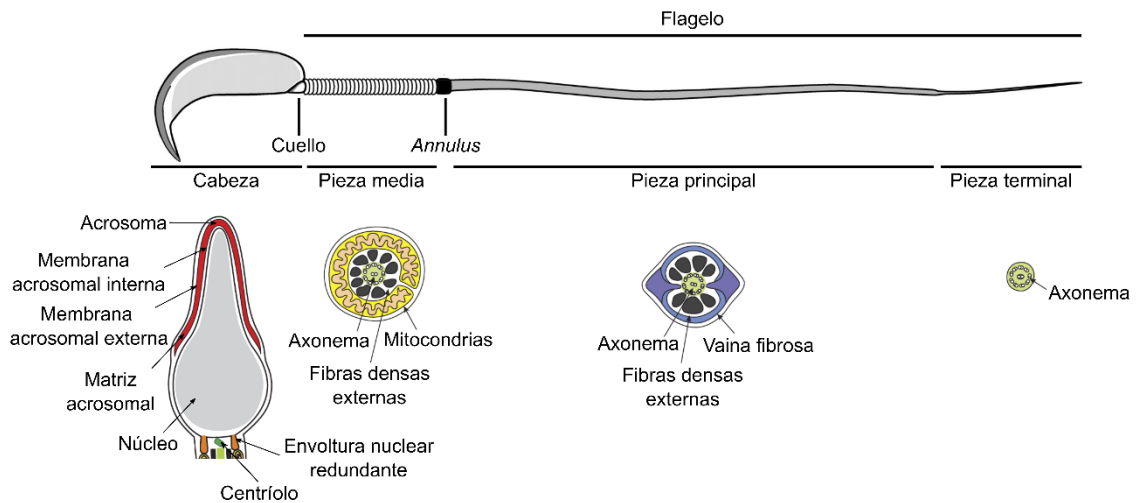


Figura 3. Estructura del espermatozoide. En la parte superior se observa una vista longitudinal del espermatozoide, mientras que en la parte inferior un corte sagital de la cabeza y cortes transversales a distintas alturas del flagelo. Adaptado de (Darszon et al., 2011; Kwitny et al., 2010).

Cabeza

La cabeza del espermatozoide contiene un núcleo altamente condensado. Durante la diferenciación de las espermatidas, las histonas que generalmente interaccionan con el material genético se reemplazan por protaminas, pequeñas proteínas nucleares ricas en arginina, dando como resultado una cromatina altamente condensada y por ende inactiva transcripcionalmente (Balhorn, 2007). En la parte anterior de núcleo se posiciona el acrosoma, una vesícula citoplasmática rodeada de membrana. Se define membrana acrosomal interna (MAI) a la membrana que está en contacto con parte anterior de la membrana nuclear y se continúa con la membrana acrosomal externa (MAE), que se encuentra cerca de la MP en la parte anterior de la cabeza (**Figura 3**). Esta vesícula se origina como derivado del aparato de Golgi y contiene enzimas hidrolasas ácidas que se encuentran comúnmente en los lisosomas (Eddy, 2006). Tanto el núcleo como el acrosoma se encuentran rodeados de cantidades moderadas de componentes del citoesqueleto y citoplasma (Eddy, 2006).

Flagelo

La movilidad resulta fundamental para que los espermatozoides sean capaces de fecundar, y sus flagelos son esenciales para esta función. Longitudinalmente el flagelo del espermatozoide de mamífero consta de cuatro segmentos distintos: el cuello, la pieza media, la pieza principal, y la pieza terminal (**Figura 3**). La

pieza media y la pieza principal están separadas por el anillo o *annulus*, una estructura anular rica en proteínas septinas. Los principales elementos estructurales que componen el flagelo del espermatozoide de mamífero son: el axonema (a lo largo de todo el flagelo), la vaina mitocondrial (en la pieza media), el citoesqueleto de actina (en la pieza media y principal), las fibras densas externas (en la pieza media y principal) y la vaina fibrosa (en la pieza principal) (Eddy, 2006; Gervasi et al., 2018). Los espermatozoides que presentan estructuras defectuosas ya sea en el vaina mitocondrial, las fibras densas externas o la vaina fibrosa tienen morfología anormal, así como alteraciones en la movilidad y la fertilidad (Gervasi et al., 2018).

En la región más basal de la cabeza se encuentra el cuello, definiendo la terminación de la misma y el comienzo del flagelo. En esta región se localizan dos centríolos, uno proximal cercano al núcleo y otro más distal, que da origen a los microtúbulos del axonema flagelar (**Figura 3**).

El axonema está compuesto por un complejo de microtúbulos del tipo “9+2” que se extiende por toda la longitud del flagelo. Los nueve dobletes externos rodean a un par de microtúbulos centrales únicos (**Figura 4**). Los microtúbulos están compuestos por α -tubulina y β -tubulina (Eddy, 2006). Cada uno de los dobletes de microtúbulos externos tiene dos filas de proyecciones llamadas fila interna y

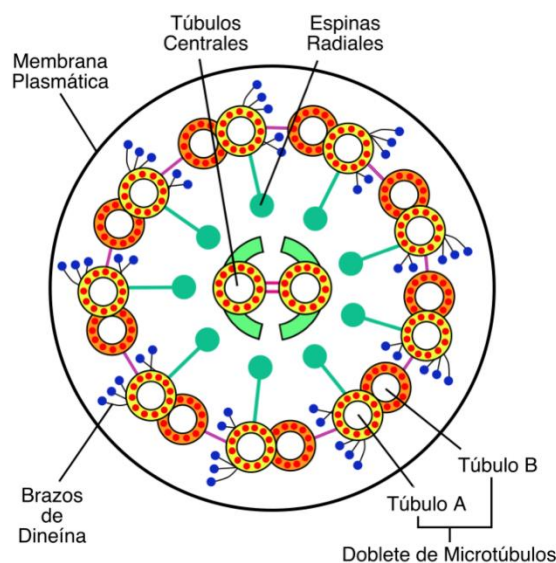


Figura 4. Estructura del axonema del flagelo espermático. Adaptado de <http://elmodernoprometeo.blogspot.com/2021/04/cilios-y-flagelos-morfologia-basica.html>.

fila externa de brazos de dineína (**Figura 4**). Las proteínas dineína son la fuente de la fuerza motriz que dobla el flagelo (Lindemann y Lesich, 2016). Su actividad ATPasa genera fuerzas de deslizamiento entre dobletes adyacentes de microtúbulos durante el movimiento flagelar (Eddy, 2006).

La vaina mitocondrial consta de mitocondrias envueltas helicoidalmente alrededor de las fibras densas externas en la pieza media. Por lo general, están dispuestas de extremo a extremo, pero el número de hélices paralelas, el número de giros y la longitud de la pieza media varía entre especies. En el ratón, las mitocondrias suelen estar dispuestas en dos hélices paralelas (**Figura 5**) (Eddy, 2006). Durante la espermiogénesis tardía, las mitocondrias esféricas se juntan alrededor de la cola de espermátidas en formación. La forma de estas mitocondrias cambia gradualmente de esferoide a largas. Como resultado, se alargan y se disponen en un patrón escalonado, se unen entre sí de un extremo a otro para formar una doble hélice alrededor del núcleo del axonema (Otani et al., 1988).

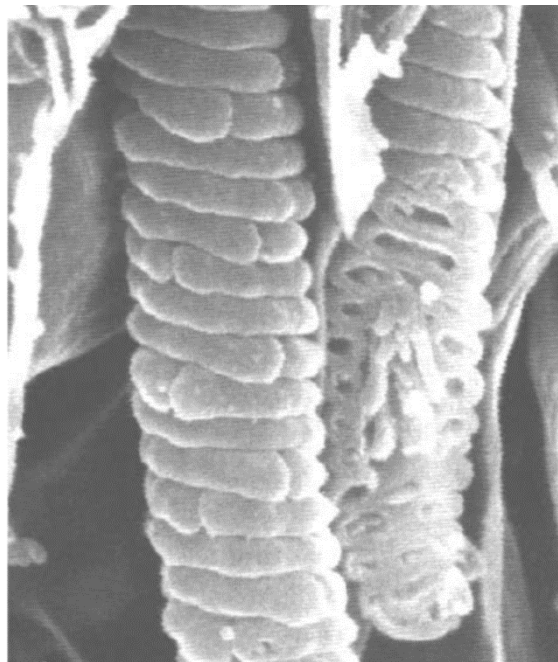


Figura 5. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la vaina mitocondrial de espermatozoides murinos. Adaptado de (Otani et al., 1988).

Recientemente, Gervasi y colaboradores describieron que la pieza media y la pieza principal del espermatozoide murino tienen estructuras de actina especializadas. Estos hallazgos fueron posibles gracias al empleo de técnicas

de súper-resolución como es la llamada Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*, STORM). En la pieza media, la actina polimerizada forma una doble hélice que sigue la vaina mitocondrial. Por el contrario, la actina en la pieza principal se distribuye radialmente desde el axonema hasta la MP (**Figura 6**). Esto sugiere un papel específico de la actina polimerizada en la organización molecular de las estructuras flagelares implicadas en la regulación de la movilidad y la función espermática (Gervasi et al., 2018).

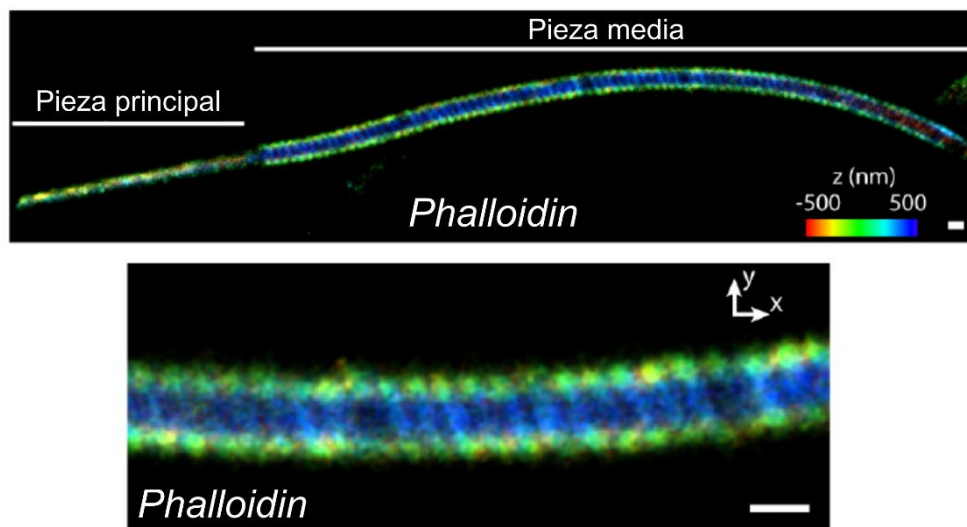


Figura 6. Imágenes de súper-resolución de la doble hélice de actina presente en la pieza media del flagelo murino. Panel superior: reconstrucción mediante STORM de 3 dimensiones de actina polimerizada marcada con la sonda *phalloidin* en el flagelo de espermatozoide murino. La reconstrucción está coloreada de acuerdo con la altura de localización en el eje *z* tal como se indica en el código de colores. Panel inferior: ampliación de una parte de la pieza media del espermatozoide que se muestra en el panel superior. En ambos paneles la escala de tamaño es 200 nm. Adaptado de (Gervasi et al., 2018).

En cuanto a las fibras densas externas, son nueve fibras que rodean al axonema, formando un complejo “9+(9+2)” en toda la longitud de la pieza media y la mayor parte de la pieza principal. Las fibras son más gruesas en la parte proximal de la pieza media y gradualmente van disminuyendo de tamaño hacia el extremo distal (Eddy, 2006). En la pieza media, las fibras densas externas están rodeadas de mitocondrias organizadas de extremo a extremo. Por el contrario, en la pieza principal están rodeadas por una vaina fibrosa (**Figura 3**) (Gervasi et al., 2018; Lindemann y Lesich, 2016). La formación de fibras densas externas comienza en las espermátidas. El primer gen identificado fue *Odf1* (fibra densa externa de espermatozoides 1), el cual se transcribe en las espermátidas, y codifica para

una proteína de 27 kDa, rica en cisteínas y prolinas, resultado la proteína principal en las fibras densas externas de rata. Otros genes identificados son los Odf2, Odf3 y Odf4 (Eddy, 2006).

La vaina fibrosa define la extensión de la pieza principal, que es en general el segmento más largo del flagelo. Es una estructura del citoesqueleto que es exclusiva del flagelo de los espermatozoides de mamíferos y algunas aves. Subyace estrechamente a la MP y es un cilindro cónico formado por dos columnas longitudinales. El grosor disminuye hacia el extremo distal de la pieza principal. La formación de la vaina fibrosa tiene lugar durante gran parte de la espermiogénesis. Una de las proteínas comúnmente encontrada en esta estructura es la proteína de anclaje a la proteína quinasa A (PKA) dependiente de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), también llamada AKAP. Asimismo, en la vaina fibrosa se encuentran enzimas necesarias para la vía glucolítica cuyo producto, el adenosín trifosfato (ATP), proporciona energía para la movilidad hiperactivada (Eddy et al., 2003). La visión clásica ha sido que la función de la vaina fibrosa es modular el plano del batido del flagelo imponiendo una restricción al deslizamiento de los dobletes del axonema y a la flexión flagelar (Eddy, 2006).

Capacitación

Como se mencionó anteriormente, los espermatozoides testiculares que resultan de la espermatogénesis se encuentran maduros desde un punto de vista morfológico, pero no presentan movilidad progresiva ni la capacidad de fecundar a la gameta femenina, el ovocito. Durante su tránsito por el epidídimo ocurre la maduración espermática donde adquieren el potencial de fecundar, pero no son efectivamente capaces de hacerlo. A principios de la década de 1950, dos investigadores de manera independiente, Austin y Chang, utilizando al conejo como modelo experimental, describieron que la capacidad espermática de fecundación *in vivo* sólo se gana con la residencia en el tracto reproductivo femenino por un período finito de tiempo donde ocurren eventos moleculares y fisiológicos conocidos colectivamente como capacitación (Austin, 1951; Chang, 1951). Estos eventos también se pueden emular *in vitro* en medios definidos en los cuales la composición se aproxima al entorno del tracto reproductor

femenino. Dichos medios en general contienen un suministro limitado de electrolitos (sodio $[Na^+]$, potasio $[K^+]$, cloro $[Cl^-]$, bicarbonato $[HCO_3^-]$, magnesio $[Mg^{2+}]$, calcio $[Ca^{2+}]$ y fosfato $[PO_4^{3-}]$), metabolitos energéticos (glucosa, piruvato y lactato), y un aceptor de colesterol, generalmente albúmina sérica bovina (BSA) (Toyoda et al., 1971).

Desde el punto de vista funcional, durante la capacitación, los espermatozoides experimentan un cambio en el patrón de movilidad llamado hiperactivación (Yanagimachi, 1970) y se vuelven competentes para experimentar la exocitosis acrosomal (EA), donde se secreta el contenido de una única vesícula, el acrosoma. Experimentos en ratones demostraron que la hiperactivación facilita la liberación de los espermatozoides desde el reservorio oviductal y la penetración a través del *cumulus oophorus* (CO, células de la granulosa junto a la matriz secretada) y la matriz glicoproteica extracelular que rodea al ovocito, la zona pellucida (ZP) (Demott & Suarez, 1992; Puga Molina et al., 2018). Por su parte, la EA permite la relocalización de proteínas esenciales para la fusión con el ovocito (Noda et al., 2020; Satouh et al., 2012). De esta manera, ambos eventos son indispensables para la fecundación y serán detallados más adelante.

En términos generales, las modificaciones bioquímicas asociadas a la capacitación ocurren a nivel de:

1) Membrana plasmática (MP):

- Aumento de la fluidez de la MP: debido principalmente a la remoción de colesterol (**Figura 7**) (Davis, 1981; Gadella et al., 2008; Jones et al., 2007). La albúmina es la más utilizada como aceptor de colesterol en experimentos *in vitro* (Gadella et al., 2015; Langlais et al., 1981; Suzuki & Yanagimachi, 1989) y se ha descrito que está en gran abundancia en el oviducto (Ehrenwald et al., 1990; Puga Molina et al., 2018b). Además, ocurren diversas modificaciones en la distribución de otros esteroides (de Jonge, 2005).
- Redistribución de proteínas integrales de membrana, difusión de lípidos y cambios en la proporción de proteínas de membrana (Gadella, 2008; Wolf et al., 1986)
- Remoción de factores decapacitantes: son moléculas que resultan de las secreciones testiculares, epididimarias, prostáticas y de la vesícula seminal. Entran en contacto con los espermatozoides a través del plasma seminal y se

cree que impiden la capacitación prematura (Cross, 1996; Kawano y Yoshida, 2007; Kawano et al., 2008). A modo de ejemplo, existen glicoproteínas unidas de manera no covalente a la MP con alto contenido de ácido siálico. Se ha reportado que si este ácido está presente en la superficie del espermatozoide correlaciona positivamente con la protección contra la fagocitosis en el tracto femenino, pero negativamente con la capacidad de los espermatozoides para unirse a la ZP del ovocito (Ma et al., 2012; Oliphant y Brackett, 1973). Otro ejemplo de factor decapacitante es SPINK3, el cual es secretado por las vesículas seminales; altera la hiperpolarización de la membrana espermática y la entrada de Ca^{2+} través de canal específico de espermatozoides, CatSper (Zalazar et al., 2020).

- Hiperpolarización de la MP: en el espermatozoide, como en la mayoría de las células, las concentraciones internas de iones son diferentes de las del medio extracelular. Estas diferencias resultan de la permeabilidad iónica relativa de la MP y, a su vez, la permeabilidad está dada por los canales iónicos y transportadores específicos presentes, los gradientes que establecen y el estado metabólico de la célula. En reposo, el equilibrio de estos flujos, gradientes y permeabilidades da como resultado un potencial eléctrico, conocido como potencial de membrana (E_m) de reposo. Antes de la capacitación, los espermatozoides de ratón están relativamente despolarizados (E_m : de -35 a -45 mV) y se hiperpolarizan (alrededor de -70 mV) durante la capacitación (Visconti et al., 2011). La hiperpolarización de la E_m ocurre cuando hay un aumento en la concentración de cargas negativas netas en el compartimiento intracelular. Esta hiperpolarización de membrana está asociada, en mayor medida, al efecto de un incremento en la permeabilidad del K^+ dependiente del pH intracelular (pH_i) (Navarro et al., 2007). En el espermatozoide, el movimiento de K^+ hacia el exterior celular es la única corriente hiperpolarizante detectada y es incrementada por la alcalinización intracelular independientemente de la concentración extracelular de K^+ (Lishko et al., 2012). El principal canal de K^+ responsable de este fenómeno en espermatozoides de ratón es Slo3 (**Figura 7**). Este canal es específico de espermatozoides de mamífero y los ratones que carecen de dicho gen son infértiles debido a la imposibilidad de hiperpolarizar la MP y presentar defectos en la movilidad progresiva, entre otros fenotipos (Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011). Además, existen otros canales y transportadores

de K^+ , como la bomba Na^+/K^+ ATPasa (**Figura 7**), pero estos no participan en la hiperpolarización de la MP, aunque regulan la concentración intracelular del ion de manera permanente (Lishko et al., 2012). La hiperpolarización de la membrana durante la capacitación se ha demostrado en espermatozoides murinos, bovinos, equinos y humanos (Escoffier et al., 2012; Hernández-González et al., 2007; López-González et al., 2014; Zeng et al., 1995). Experimentos en ratón demuestran que la hiperpolarización espermática es necesaria y suficiente para preparar a las células para la EA (de La Vega-Beltran et al., 2012).

2) Concentración intracelular de iones:

Después de la eyaculación, durante su tránsito por el tracto reproductor femenino, los espermatozoides se exponen a nuevas concentraciones de iones extracelulares y osmolaridades diferentes a las del 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 (**Figura 7**) (Darszon et al., 2007; Kirichok y Lishko, 2011; Lishko et al., 2012).

En lo que al Ca^{2+} respecta, el mantenimiento y regulación de la homeostasis de este ion es clave en varios aspectos de la fisiología espermática, tales como la hiperactivación y la EA. Esto involucra bombas y canales en la MP como también en los reservorios intracelulares de Ca^{2+} (el acrosoma, las mitocondrias y la envoltura nuclear redundante, ENR, en el cuello) los cuales importan, exportan o sequestran Ca^{2+} (Clapham, 2007; Correia et al., 2015; Darszon et al., 2011; Ferreira et al., 2021; Jimenez-Gonzalez et al., 2006). La modulación del Ca^{2+} 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).

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 Na^+/Ca^{2+} (NCX), los cuales sacan el Ca^{2+} de la célula o lo incorporan dentro de los reservorios de Ca^{2+} (**Figura 7**) (Michelangeli et al., 2005). PMCA está localizada en la pieza principal del flagelo de los espermatozoides murinos y es relevante para el funcionamiento de los mismos ya que su ausencia altera la movilidad (Okunade et al., 2004). Del mismo modo, la inhibición farmacológica de NCX provoca un aumento de Ca^{2+} y una

reducción significativa de la movilidad del espermatozoide humano (Krasznai et al., 2006).

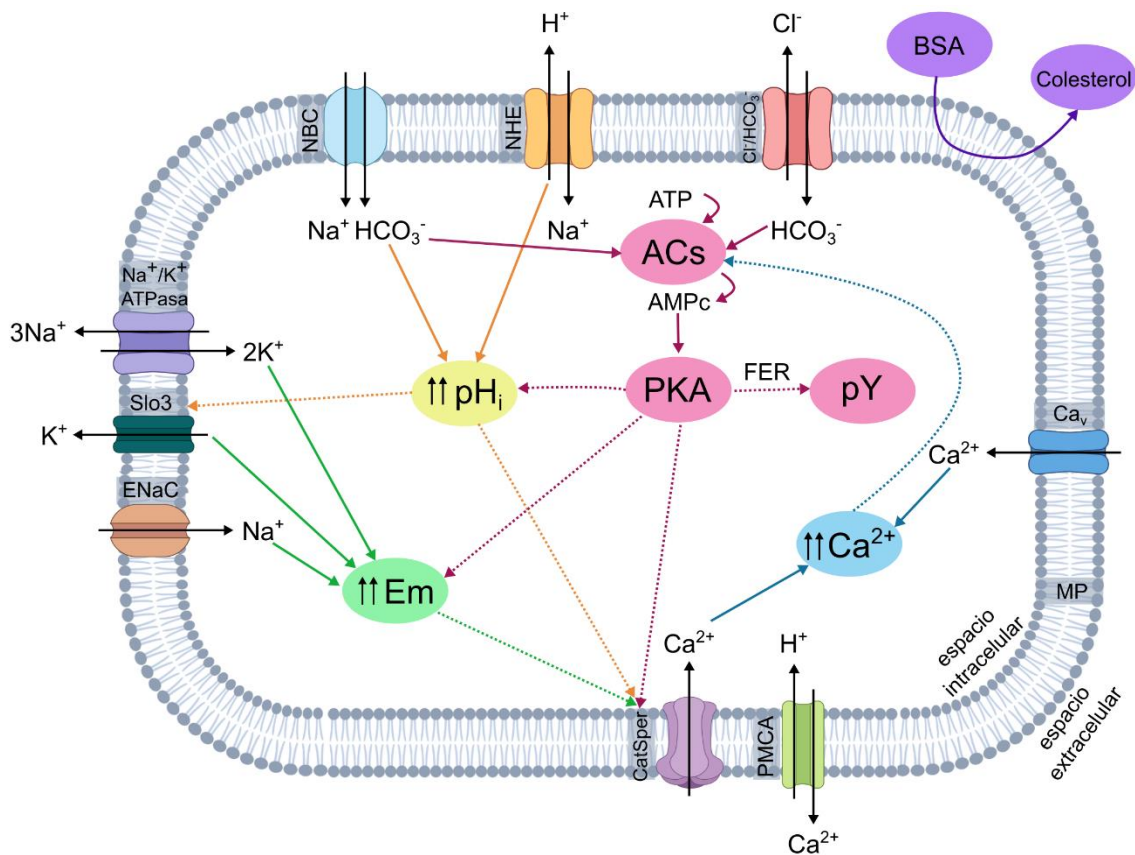


Figura 7. Modelo simplificado de vías de señalización y flujos de iones involucrados en la capacitación de espermatozoides murinos. Cuando los espermatozoides entran en contacto con el medio capacitante, la BSA remueve colesterol de la MP modificando sus propiedades. La ACs es activada rápidamente por la acción del HCO_3^- , presente en el medio capacitante. El HCO_3^- entra a la célula a través del cotransportador NBC y del anti-transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y su incremento intracelular junto con el eflujo de H^+ a través del transportador NHE, resulta en 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 ACs activa a la PKA, desencadenando una cascada de fosforilación. Todos estos acontecimientos, en conjunto, provocan la inducción de la hiperactivación y la EA. La contribución de los canales de Ca_v y de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} (no ilustrados en este diagrama) 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. Creado utilizando <https://biorender.com>.

Por otro lado, el influjo de Ca^{2+} esta dado principalmente por el canal de Ca^{2+} específico de espermatozoides, CatSper (**Figura 7**). Este canal es dependiente del pH_i , del voltaje y es 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 la apertura de este canal

está regulada por progesterona (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011). Ratones que carecen de CatSper y humanos con mutaciones de falla de función en este canal resultan infértiles debido a alteraciones en el desarrollo de la movilidad hiperactivada. Este canal se describe en más detalle en la sección “Hiperactivación”. Otros canales de Ca^{2+} voltajes dependientes (Cav) fueron descritos en espermatozoides, pero se cree que no son esenciales para su fisiología o cumplen funciones redundantes (Wennemuth et al., 2000).

Por último, la movilización de Ca^{2+} de los reservorios se encuentra mediada por receptores de tipo inositol trifosfato y receptores de rianodina (IP_3R y RyR , respectivamente) (Darszon et al., 2011; Visconti et al., 2011).

A los fines de esta tesis, se mencionarán brevemente las características principales de los cambios en las concentraciones de HCO_3^- , Na^+ , y Cl^- . Existen varios transportadores de HCO_3^- presentes en la MP de los espermatozoides, entre ellos el cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) (Demarco et al., 2003) y el anti-transportador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (**Figura 7**) (Lishko et al., 2012; Zeng et al., 1996). Además, se ha identificado un cotransportador de Na^+ , K^+ y Cl^- , denominado NKCC. Se cree que debido a este canal hay un aumento intracelular de Cl^- (Wertheimer et al., 2008), que llevaría a la activación del anti-transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ estimulando así el ingreso sostenido de HCO_3^- al espermatozoide (Chávez et al., 2012). Por otra parte, los niveles intracelulares de Na^+ son regulados a través del intercambiador Na^+/H^+ (NHE) (Garcia y Meizel, 1999; Wang et al., 2003), la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Lishko et al., 2012), y el canal de Na^+ epitelial (ENaC). Durante la capacitación, ENaC se cierra, contribuyendo a la hiperpolarización de la MP (**Figura 7**) (Escoffier et al., 2012; Puga Molina et al., 2018a; Ritagliati et al., 2018). En cuanto al Cl^- , se han descrito dos transportadores presentes en espermatozoides de mamíferos: el regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) (Puga Molina et al., 2017; Puga Molina et al., 2018), y el ya mencionado NKCC (Wertheimer et al., 2008).

3) pH citoplasmático:

La alcalinización intracelular es un evento muy importante en la capacitación espermática. Los cambios drásticos en la composición iónica a los que se enfrenta el espermatozoide durante su trayecto hacia el sitio de fecundación tienen también consecuencias en el pH. En el epidídimo, se encuentran con un

medio ácido con baja concentración de HCO_3^- que los mantiene inactivos. Contrariamente, en el útero y oviducto de la hembra, el fluido luminal contiene altas concentraciones de HCO_3^- convirtiéndose cada vez más alcalino, una condición requerida para la fecundación (Nishigaki et al., 2014). Como se mencionó anteriormente, durante la capacitación existe un ingreso de HCO_3^- a la célula y una salida de H^+ a través del NHE, estos factores serían esenciales para el aumento en el pH_i . Además, el canal CFTR en espermatozoides murinos y el canal de H^+ Hv1 en espermatozoides humanos también contribuirían a mantener el pH_i (Chávez et al., 2012; Lishko y Kirichok, 2010; Miller et al., 2018; 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 H^+ en espermatozoides humanos mientras que en ratones está ausente (Lishko y Kirichok, 2010). Finalmente, la alcalinización del pH_i está asociada a la apertura de los canales CatSper y Slo3 (**Figura 7**) (Kang et al., 2021).

4) Adenilato ciclasa soluble (ACs) y PKA:

Como consecuencia de la exposición a HCO_3^- , se observa un rápido incremento en los niveles intracelulares de AMPc (Harrison y Miller, 2000) lo cual estimula la actividad de PKA (**Figura 7**) (Harrison, 2004). En 1999, Levin y Buck reportaron la presencia de una adenilato ciclasa soluble (ACs) en espermatozoides, activada por HCO_3^- siendo entonces la proteína responsable del aumento de AMPc en respuesta a la capacitación (Buck et al., 1999; Chen et al., 2000). En el espermatozoide se expresan dos clases de adenilato ciclasas: la transmembrana (ACm o ADCY1-9) y la soluble (ACs o ADCY10). La primera se localiza en la cabeza del espermatozoide (Wertheimer et al., 2013), mientras que la segunda, en la pieza media del flagelo principalmente (Hess et al., 2005).

Por su parte, PKA está compuesta por dos tipos de subunidades: catalítica (PKA-C) y regulatoria (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. Participa de diferentes eventos moleculares como por ejemplo en la fosforilación de sustratos de PKA (pPKAs) y consecuente aumento en la fosforilación de residuos en tirosina (pY) (Buffone et al., 2006; Lefièvre et al., 2002; Liu et al., 2006). Esta última se encuentra mediada por la activación indirecta de tirosin quinasas, como la tirosin quinasa FER (**Figura 7**) (Alvau et al., 2016; Craig et al.,

2001). Tanto pPKAs como pY han sido parámetros extensamente correlacionados con la capacitación (Visconti et al., 2011). Sin embargo, un estudio reciente realizado *ex vivo* reportó que los espermatozoides que se encuentran en el sitio de fecundación, la *ampulla*, no presentan pY (Ded et al., 2020). Sumado a esto, ratones *knock-out* para FER son fértiles aún sin presentar pY durante la capacitación. De esta manera, ambos resultados cuestionarían la relevancia de la pY durante la capacitación *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, la participación de PKA se ha asociado a otros eventos como la alcalinización citoplasmática (Matamoros-Volante & Trevino, 2020; Puga Molina et al., 2017; Wang et al., 2007), la hiperpolarización del Em (Stival et al., 2015), y el ingreso de Ca^{2+} al interior celular mediante la activación de CatSper en espermatozoides murinos (**Figura 7**) (Orta et al., 2018). Asimismo, se ha descrito la importancia de PKA para la adquisición de la movilidad hiperactivada (Burton et al., 1999; Xu et al., 2018) y para la EA (de Jonge et al., 1991; Stival et al., 2018; Tsurulnikov et al., 2019).

5) Metabolismo celular:

La capacitación espermática depende tanto de las vías de señalización como del 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 ACs, como también necesario para la movilidad hiperactivada (Miki et al., 2004). Se ha reportado que el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa se encuentran activos en espermatozoides de mamíferos (Goodson et al., 2012; Sansegundo et al., 2022). El medio capacitante contiene nutrientes que son metabolizados por estas vías como la glucosa (glucólisis, ciclo Krebs y fosforilación oxidativa) y el piruvato (ciclo Krebs y fosforilación oxidativa) (Toyoda et al., 1971). Recientemente, se reportó que en espermatozoides murinos la privación de estos nutrientes inmoviliza a los espermatozoides. Sin embargo, tras el agregado de los nutrientes omitidos, se recupera la movilidad y mejora la fecundación *in vitro* en comparación con espermatozoides incubados constantemente en un medio completo. Además, se observó un desarrollo embrionario más eficiente y un mayor porcentaje de crías luego de transferencias embrionarias (Navarrete et al., 2019).

6) Citoesqueleto de actina:

La actina es una proteína ATPasa globular y es la subunidad que forma los microfilamentos del citoesqueleto. Puede existir como monómero (actina-G o globular) o como parte de un polímero denominado actina-F (filamentosa)

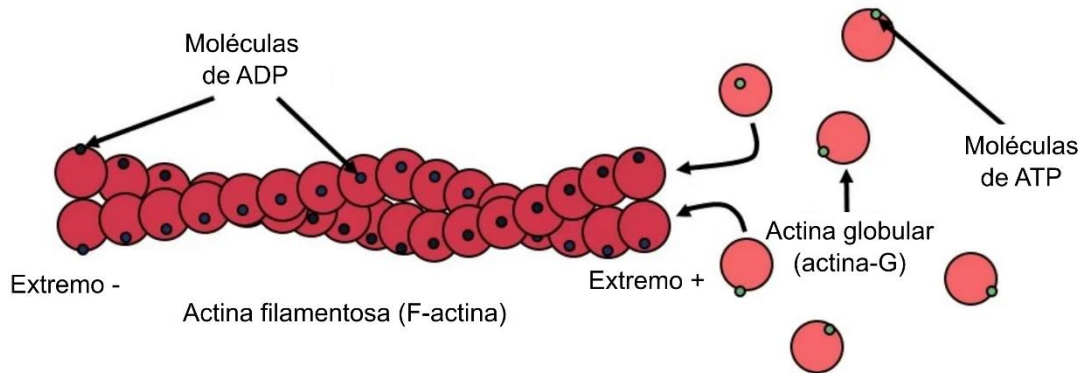


Figura 8. Esquema de la polimerización de actina. La actina se polimeriza pasando de su forma monomérica o globular a su forma filamentosa. Adaptado de <https://microbenotes.com/microfilaments-structure-and-functions/>.

(Figura 8). En las células somáticas, el citoesqueleto de actina participa en diversos eventos celulares tales como la movilidad celular, la contracción muscular, la división celular, la citocinesis, la señalización, el movimiento de organelas, el control y la forma de las uniones intercelulares, y la endo/exocitosis. Las células simultáneamente forman, mantienen y desarman distintas redes de actina-F para facilitar estos procesos (Blanchoin et al., 2014; Chhabra y Higgs, 2007). Las redes de actina-F poseen una organización y una dinámica específica que son controladas espacial y temporalmente mediante la acción de diferentes proteínas de unión a la actina. Dichas proteínas cumplen con una variedad de funciones que incluyen el montaje, el capping de los extremos, la unión de monómeros de actina, la agrupación y el corte/desensamblaje (Blanchoin et al., 2014).

En el espermatozoide de los mamíferos, la actina está presente tanto en su forma monomérica como filamentosa (de las Heras et al., 1997; Delgado-Buenrostro et al., 2005; Flaherty et al., 1988; Hernández-González et al., 2000; Moreno Fierros et al., 1992; Oikonomopoulou et al., 2009; Vogl et al., 1993). Las regiones del espermatozoide que contienen actina incluyen la matriz acrosomal (Zepeda-Bastida et al., 2011), las regiones ecuatorial y post-acrosomal, y el flagelo (Flaherty et al., 1988). Como se mencionó anteriormente, la presencia de actina

en el flagelo podría ser importante para la regulación de la movilidad, y su presencia en la cabeza sugiere una posible participación en la EA, así como en la fusión entre el espermatozoide y el ovocito. En particular, la presencia de actina en la matriz acrosomal podría estar asociada con la liberación diferencial de ciertos componentes acrosomales (Kim y Gerton, 2003) y con la progresión organizada de la exocitosis (Buffone et al., 2009).

En lo que a la capacitación respecta, existe un aumento en la polimerización de actina, la cual pasa de su forma globular a la forma filamentosa tanto en la cabeza como en el flagelo del espermatozoide (Brener et al., 2003; Finkelstein et al., 2010a; Romarowski et al., 2016a). Además, se reportaron cambios dinámicos en estructuras de actina bien definidas en diferentes regiones de la cabeza espermática. Estos resultados se lograron empleando *live imaging* de célula única (es decir, grabando a las células vivas con un microscopio de fluorescencia) combinado con técnicas de súper-resolución (Romarowski et al., 2018).

Hiperactivación

Como se mencionó previamente, el objetivo fundamental de los espermatozoides es entregar su material genético a la gameta femenina. Estas células altamente especializadas han desarrollado estrategias sofisticadas para regular su movilidad y lograr encontrar al ovocito. Por lo tanto, la movilidad es una de las funciones más importantes del espermatozoide. No es sorprendente, entonces, que fallas en la movilidad (aunque no presenten defectos morfológicos) lleven a la esterilidad en muchos modelos de ratones *knock-out* como lo son para los genes que codifican proteínas claves en la fisiología del espermatozoide como el de PKA, CatSper, ACs, enzimas de la vía de la glicolisis, PMCA, entre otros (Darszon et al., 2011; Esposito et al., 2004; Miki et al., 2004; Nolan et al., 2004; Okunade et al., 2004; Skálhegg et al., 2002) .

En mamíferos, los espermatozoides se vuelven móviles cuando son eyaculados en el tracto reproductor femenino. Estos presentan batidos flagelares simétricos con baja curvatura y nado progresivo con un recorrido casi recto, patrón denominado "movilidad activada" (**Figura 9A**, arriba). En 1970, Yanagimachi reportó que los espermatozoides de hámster se volvían extremadamente activos a medida que ganaban la capacidad de fecundar al ovocito *in vitro*. Además,

observó que los espermatozoides nadando de esta manera se podían ver a través de las paredes de la *ampulla* y propuso que este movimiento 'hiperactivo' proporciona a los espermatozoides una mayor propulsión para llegar al ovocito y/o para atravesar las células del *cumulus* y la ZP (**Figura 9B i**) (Suarez, 2008; Yanagimachi, 1970). De esta manera, se define a los espermatozoides hiperactivados con un batido flagelar vigoroso asimétrico con gran amplitud y alta curvatura en un medio de baja viscosidad (**Figura 9A**, abajo) (Darszon et al., 2011).

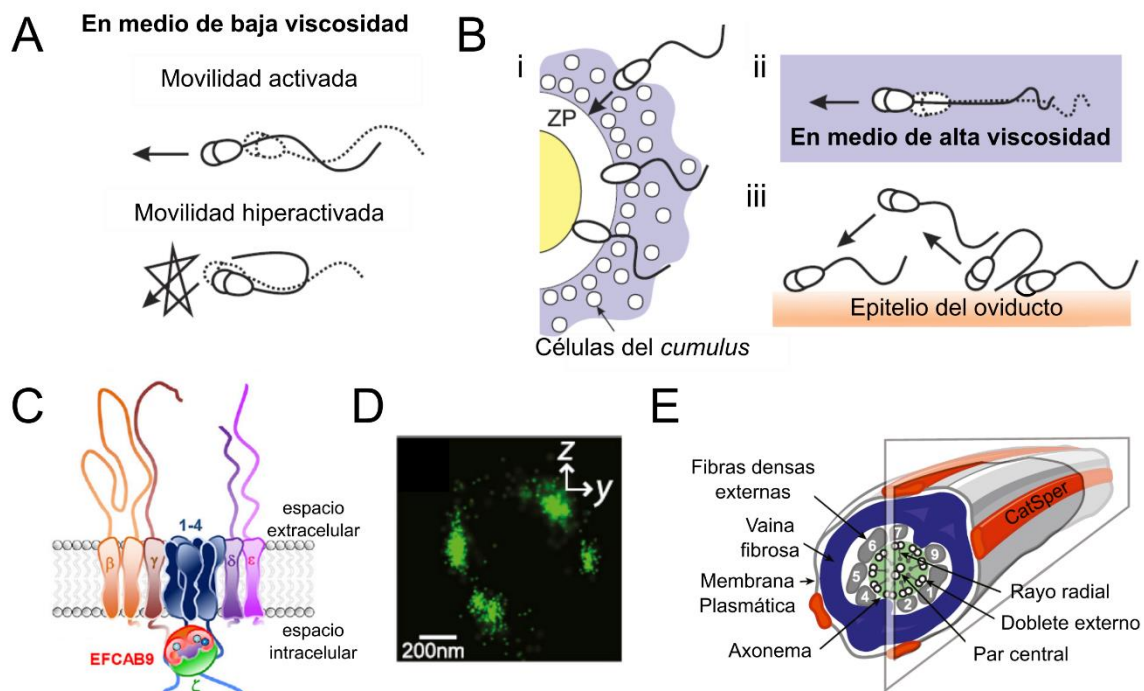


Figura 9. Propiedades y funciones fisiológicas de la hiperactivación. **A)** Forma del flagelo y dirección (flechas) de la movilidad activa (arriba) e hiperactivada en experimentos en medios de baja viscosidad. Adaptado de (Darszon et al., 2011). **B)** Importancia de la movilidad hiperactivada: **i)** para facilitar la penetración de los espermatozoides a través de la matriz del *cumulus* y la ZP, **ii)** para avanzar en fluidos altamente visco-elásticos en el tracto reproductor femenino con mayor eficacia que los espermatozoides activados, y **iii)** para separar a los espermatozoides desde el reservorio del *isthmus* y así puedan avanzar hacia la *ampulla*. Adaptado de (Darszon et al., 2011). **Estructura de CatSper. C)** Diagrama que ilustra la interacción y la topología predicha de las 10 subunidades del complejo de canales CatSper de mamíferos. Adaptado de (Hwang et al., 2019). **D)** Imágenes STORM 3D de CatSper1 en sección transversal y z al inicio de la pieza principal. Adaptado de (Chung et al., 2014). **E)** Esquema de la pieza principal del flagelo del espermatozoide donde se observa la localización de los canales CatSper (rojo) en su arreglo lineal, y la posición relativa respecto de los elementos del citoesqueleto. Adaptado de (Chung et al., 2014).

Sin embargo, *in vivo*, en el tracto reproductor femenino, los espermatozoides entran en contacto con fluidos viscosos que tienen propiedades elásticas (fluido visco-elástico). A diferencia de lo que se observa en medios de baja viscosidad

donde la trayectoria del nado es errática, los espermatozoides hiperactivados nadan de manera progresiva en medios de alta viscosidad en experimentos *in vitro* (**Figura 9B ii**) (Suarez y Dai, 1992; Suarez et al., 1991). Esta observación experimental indica que uno de los roles fisiológicos de la hiperactivación es asegurar un movimiento progresivo en fluidos de alta viscosidad como los que se encuentran en el tracto reproductor femenino. Además, durante el trayecto en el tracto reproductor femenino, las cabezas de los espermatozoides se pegan a las células epiteliales en el *isthmus* del oviducto, un sitio conocido como el reservorio. Para separarse de dicho reservorio deben adquirir movilidad hiperactivada y nadar hacia la *ampulla* (**Figura 9B iii**) (Darszon et al., 2011; Demott y Suarez, 1992).

La hiperactivación, de esta manera, es esencial para que los espermatozoides puedan fecundar con éxito a los ovocitos. Es desencadenado por un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) flagelar donde la fuente predominante es el Ca^{2+} extracelular que ingresa a través del canal CatSper (Suarez, 2008). Sin embargo, no se puede descartar la participación de la movilización de Ca^{2+} de los reservorios (el acrosoma, la ENR y las mitocondrias) ya que se ha reportado que la liberación de Ca^{2+} de los reservorios induce la movilidad hiperactivada (Achikanu et al., 2018; Alasmari et al., 2013; Mata-Martínez et al., 2021).

Las proteínas del canal CatSper solo se expresan en las células germinales masculinas y se localiza en la pieza principal del flagelo de espermatozoides maduros (Carlson et al., 2005; Jin et al., 2007). Este canal depende débilmente del voltaje pero fuertemente de la alcalinización del pH_i (Kirichok et al., 2006; Lishko y Kirichok, 2010) y en humanos, es dependiente de numerosos ligandos presentes en el fluido oviductal (Brenker et al., 2012; Tavares et al., 2013), como la progesterona (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011). CatSper es el canal más complejo de todos los canales iónicos conocidos y es codificado por, al menos, 10 genes en mamíferos. Consiste en 4 subunidades formadoras de poros (CatSper1-4) (Qi et al., 2007; Quill et al., 2003; Ren et al., 2001) y seis subunidades accesorias (cuatro transmembrana CatSper β , CatSper δ , CatSper ϵ , CatSper γ , y dos citosólicas CatSper ζ , y EFCAB9, **Figura 9C**) (Chung et al., 2011, 2017; Hwang et al., 2019; Liu et al., 2007; Wang et al., 2009). Sumadas a estas 10 subunidades, recientemente se han descripto cuatro nuevas subunidades

denominadas CatSper τ , CatSper η , SLCO6C1 y TMEM249 (no ilustradas en el diagrama de la **Figura 9C**) (Hwang et al., 2022; Yang et al., 2022; Zhao et al., 2022). Ratones *knock-out* para CatSper-1, -2, -3 o -4 son infértiles y dicha infertilidad se ha correlacionado con una falta de hiperactivación (Jin et al., 2007; Qi et al., 2007; Quill et al., 2003; Ren et al., 2001). Si bien pueden nadar progresivamente y realizar la EA, al no poder hiperactivar, fallan en penetrar la ZP de los ovocitos en experimentos *in vitro*. No obstante, si las ZP son removidas, los espermatozoides pueden fecundar normalmente (Ren et al., 2001). Gracias a la ya nombrada técnica de microscopia de súper-resolución STORM, se pudo evidenciar que CatSper tiene una disposición cuadrilateral a lo largo de la pieza principal (**Figura 9B-C**). De esta manera, se cree que el canal organiza la $[Ca^{2+}]_i$ en nanodominios de señalización, alineados de forma única a lo largo del flagelo del espermatozoide como "rayas" (Chung et al., 2014). Recientemente, se demostró que, durante la capacitación, la subunidad CatSper1 sufre una degradación dependiente de Ca^{2+} y asociada a cascadas de fosforilación de proteínas. Utilizando un modelo *ex vivo* del tracto reproductor femenino post apareo, mediante técnicas de aclarado de tejido e inmunohistoquímica, se encontró que aquellos espermatozoides que atravesaron la unión útero-tubárica (la unión del útero con el oviducto) y llegan a la *ampulla*, presentan CatSper1 intacto. Esto demostraría que la integridad del canal es indispensable para el tránsito de los espermatozoides hasta el sitio de fecundación (Ded et al., 2020).

Exocitosis acrosomal (EA)

El acrosoma, vesícula que se localiza por encima del núcleo en la cabeza del espermatozoide, contiene elementos solubles como enzimas hidrolíticas y una matriz (Buffone et al., 2008; Westbrook-Case et al., 1994). Ante la exposición a ciertos inductores, fisiológicos o farmacológicos, la MAE se fusiona con la MP de la región apical de la cabeza en el proceso denominado reacción acrosomal o EA (Buffone et al., 2014).

La EA fue reportada en 1952 por primera vez en espermatozoides de erizo de mar (Dan, 1952) y fue inmediatamente reconocida como un evento esencial para que ocurra la fecundación (Austin y Bishop, 1958). Es un tipo particular de secreción finamente regulada por múltiples vías de señalización

unidireccionales. Si bien comparte muchas de las características de los mecanismos básicos que se han descrito en otras células secretoras, como neuronas o células del sistema endócrino (Mayorga et al., 2007), la EA contiene ciertas diferencias que hacen que sea un tipo único de secreción. Las diferencias esenciales son: 1) el acrosoma es la única vesícula secretada; 2) existen múltiples sitios de fusión entre la MAE y la MP; 3) como resultado de la fusión entre la MAE y la MP, se forman vesículas híbridas que son liberadas durante la exocitosis; 4) no existe reciclado de membranas luego de la EA, siendo este un proceso irreversible (**Figura 10**). Una vez finalizada, la cabeza del espermatozoide expone un nuevo límite celular, la MAI que se continua con la MP (Yanagimachi, 1994a). Estos cambios en la topología y composición de la membrana limitante cumplen un rol fundamental en la interacción con la gameta femenina, ya que se expone el segmento ecuatorial por el cual el espermatozoide se fusiona con la MP del ovocito, el oolema (Ikawa et al., 2010; Inoue et al., 2011). Particularmente, está reportado que hay una movilización de proteínas esenciales para la fusión, como por ejemplo IZUMO1 y SPACA6, las cuales se localizan en la membrana acrosomal y luego de la EA se relocalizan al segmento ecuatorial donde cumplen su función como parte del complejo de fusión a la membrana del ovocito (Barboux et al., 2020; Brukman et al., 2023; Inoue et al., 2005; Noda et al., 2020; Sosnik et al., 2009).

La EA siempre fue considerada una reacción binaria donde el estado inicial es de espermatozoides intactos y se obtienen espermatozoides reaccionados, pero varios reportes comenzaron a describir a la EA como un continuo, el cual comienza con la capacitación espermática (Baibakov et al., 2007; Kim y Gerton, 2003).

Fusión de membranas durante la EA

La fusión de la vesícula secretoria, en este caso el acrosoma, con la MP en el proceso exocítico consta de varias etapas. Inicialmente, se recluta la vesícula secretoria a la MP (*tethering*, mediada por GTPasas monoméricas de la familia Rabs). Seguido de dicho reclutamiento, ocurre la asociación física entre la vesícula y la MP (*docking*, mediada por proteínas SNAREs). En esta etapa, la maquinaria proteica se encuentra lista para comenzar el proceso de fusión de las membranas, generando un estado transitorio de hemifusión. Por último, se

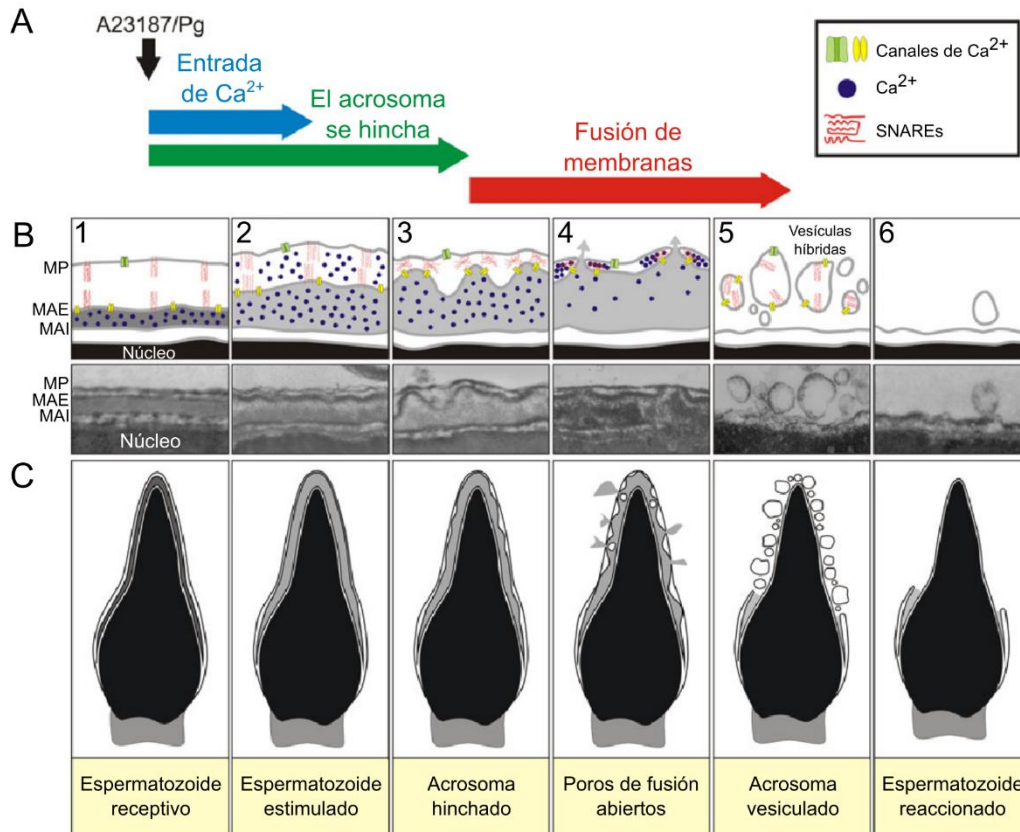


Figura 10. Modelo cinético de la EA. Los espermatozoides receptivos (1, capacitados) experimentan un rápido aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (2) que desencadena que el acrosoma se hinche (3). Eventualmente, la MAE se acopla a la MP. La apertura de canales de Ca^{2+} en la MAE provoca un aumento local de este ion en las proximidades de la maquinaria de fusión de membranas que desencadena la apertura de poros que conectan el compartimento extracelular con la luz acrosomal (4). La expansión de los poros conduce a la vesiculación del acrosoma (5). Finalmente, el espermatozoide que pierde el acrosoma presenta un nuevo límite celular, la MAI que se continúa con la MP (6). **A)** Cronología y tiempo medio relativo para cada uno de estos pasos. **B)** Superior: Los cambios especulativos en la topología de la membrana, incluidas algunas proteínas que participan en el proceso. Inferior: Imágenes de microscopía electrónica representativas de los pasos propuestos. **C)** Los cambios morfológicos correspondientes que ocurren en la cabeza del espermatozoide durante la exocitosis. Adaptado de (Sosa et al., 2015).

completa la fusión y se produce la apertura del poro a través del cual se libera el contenido del acrosoma, produciéndose la incorporación de la vesícula a la MP (**Figura 10**) (Sosa et al., 2015).

Al igual que todo proceso exocítico, la EA requiere de movilización de Ca^{2+} e involucra la activación de la maquinaria de fusión. Dicha maquinaria está conformada por proteínas tales como: Rab GTPasas, SNAREs, α -SNAP (α - NSF attachment protein), complexinas (proteína que interactúa selectivamente con los complejos SNAREs), sinaptotagminas (proteína sensora de Ca^{2+} que participa en procesos de exocitosis regulados por Ca^{2+}), NSF (N- ethylmaleimide-sensitive factor), calmodulin y dynamin (de Blas et al., 2005; Reid et al., 2012; Roggero et al., 2007; Yunes et al., 2002; Zhao et al., 2007).

El sitio y los inductores de la EA

Además de ser una secreción altamente regulada dependiente de Ca^{2+} , la EA puede ser desencadenada *in vitro* mediante moléculas inductoras tanto fisiológicas como farmacológicas (Buffone et al., 2014). En el primer grupo de inductores podemos encontrar a las proteínas de la ZP, progesterona, glicina, péptido natriurético, GABA y ATP (Bray et al., 2002; Gupta y Bhandari, 2011; Harper et al., 2008; Marín-Briggiler et al., 2008; O'Toole et al., 1996; Sánchez-Cárdenas et al., 2014a; Selvaraj et al., 2007; Shi et al., 1997; Torres-Fuentes et al., 2015; van Duin et al., 1994; Zamir et al., 1995). En lo que a los inductores farmacológicos respecta, los más utilizados son los ionóforos de Ca^{2+} (como ionomicina o A23187) o inhibidores de bombas de Ca^{2+} -ATPasa (como tapsigargina) que estimulan la salida de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Herrick et al., 2005; Rossato et al., 2001).

La **ZP** de los mamíferos, inductor fisiológico propuesto de la EA, es una matriz extracelular que rodea a los ovocitos y los embriones tempranos, que es fundamental para la fecundación normal y el desarrollo previo a la implantación (**Figura 11A**) (Familiari et al., 2006). En la especie murina, está formada por tres glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3) dispuestas en una delicada matriz filamentosa (Baibakov et al., 2007). Estas glicoproteínas son sintetizadas exclusivamente por

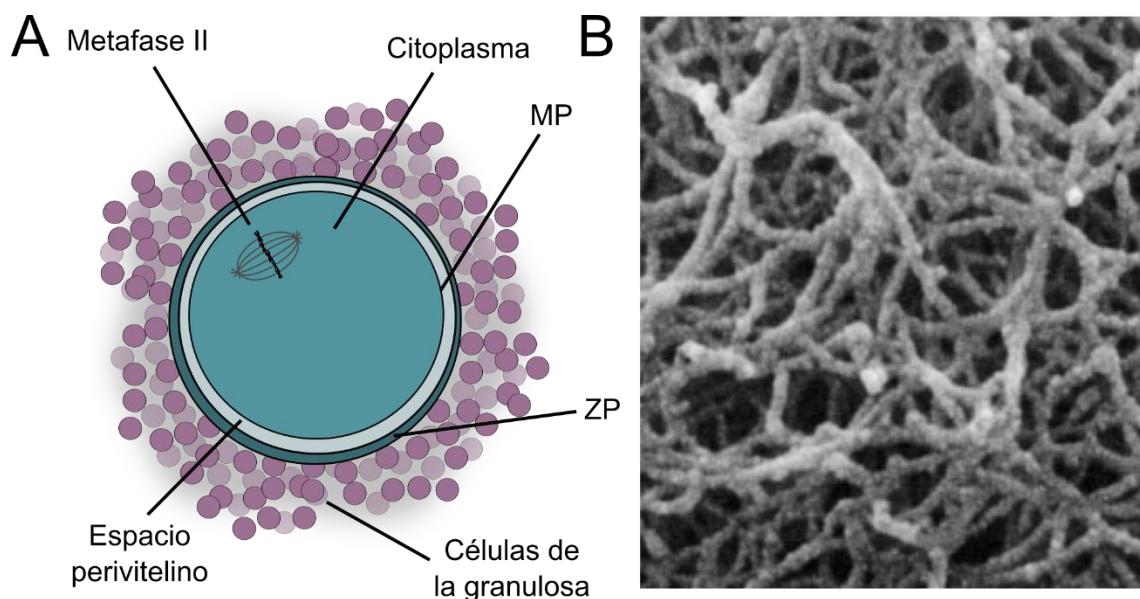


Figura 11. Diagrama ilustrativo del COC. A) Esquema de las estructuras principales del ovocito junto a las células de la granulosa. **B)** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la ZP, se observa una estructura similar a una red. Adaptado de (Familiari et al., 2006).

el ovocito (Bleil y Wassarman, 1980). En particular, ZP2 es escindida proteolíticamente después de la fusión de las gametas para evitar la polispermia. Esta escisión se asocia con la exocitosis de gránulos corticales que se encuentran en la periferia del ovocito y como resultado, modifican la matriz de la ZP para que espermatozoides adicionales no se unan o la penetren (Austin y Braden, 1956; Baibakov et al., 2007; Ducibella, 1996). Los estudios de microscopía electrónica de barrido han demostrado que la ZP tiene una estructura porosa similar a una red y/o un aspecto casi liso y compacto (**Figura 11B**) (Familiari et al., 2006).

Durante muchos años, se mantuvo el paradigma de que los espermatozoides intactos, al unirse a la ZP, llevan a cabo la EA. De esta manera, la liberación del contenido acrosomal (que contiene entre otros componentes, enzimas hidrolíticas) apenas contacta a la ZP, facilitaría el paso de los espermatozoides a través de dicha matriz glicoproteica para unirse al ovocito y fecundarlo (Saling, 1989; Saling et al., 1979). Este paradigma se construyó en base a numerosos estudios *in vitro* donde se utilizó a la ZP solubilizada para inducir la EA (Cherr et al., 1986; Florman y Storey, 1982; Storey et al., 1984). Estos 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, Baibakov y colaboradores encontraron que la unión a la ZP no era suficiente para inducir la EA cuando se utilizaban ZP intactas (no solubilizadas, es decir, en su forma nativa) (Baibakov et al., 2007). Sumado a esto, gracias a la utilización de espermatozoides de ratones transgénicos que expresan la proteína EGFP en el acrosoma (**Figura 12B**) (Hasuwa et al., 2010), Jin y colaboradores demostraron que los espermatozoides murinos fecundantes pierden el acrosoma antes de contactar con la ZP en experimentos *in vitro* (Jin et al., 2011). Estos resultados, además, trajeron controversia con respecto al lugar específico de la ocurrencia de la EA *in vivo*. Como se mencionó anteriormente, por muchos años se postuló que el inductor fisiológico de la EA era la ZP y, por ende, el sitio donde ocurriría dentro del tracto reproductor femenino sería la *ampulla* donde se encuentran los ovocitos con la ZP y células de la granulosa. En el año 2016, utilizando al ratón transgénico con EGFP en el

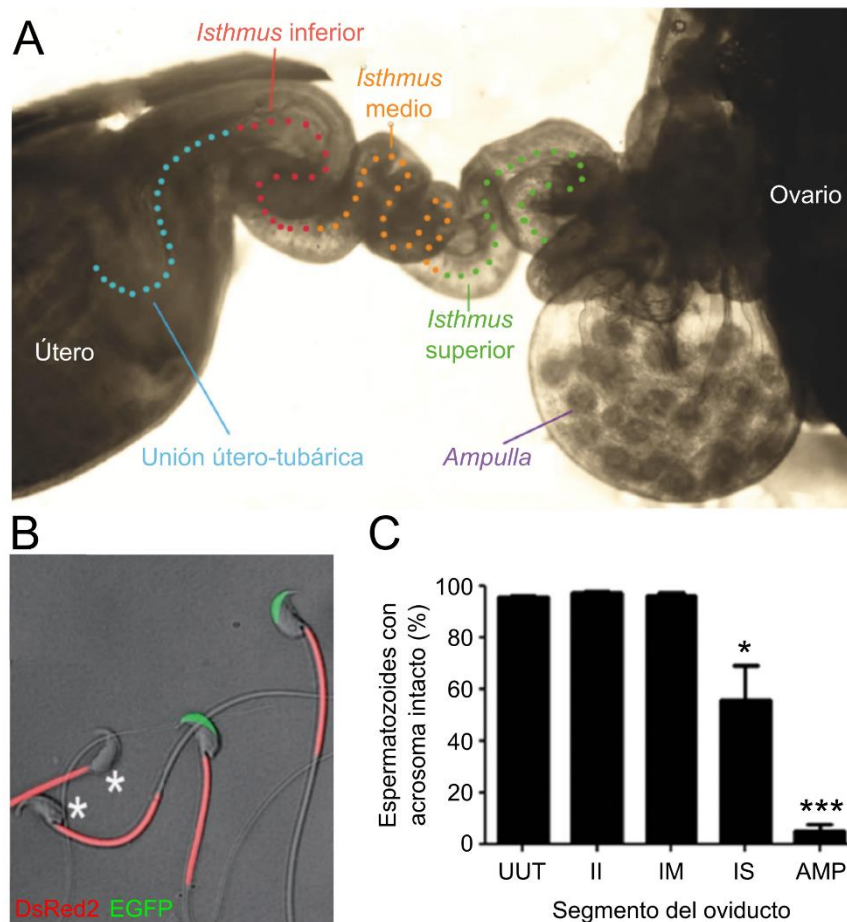


Figura 12. Los espermatozoides de ratón comienzan a experimentar la EA en el *isthmus* alto. A) Imagen representativa de un cuerno uterino y del oviducto en ratón. De izquierda a derecha se observa el útero, la unión útero-tubárica (UUT), el *isthmus* inferior (II), *isthmus* medio (IM), *isthmus* alto (IA), la *ampulla* (AMP) y el ovario. Adaptado de (la Spina et al., 2016). **B)** Imagen de microscopía de fluorescencia y campo claro para los espermatozoides de ratones transgénicos que expresan EGFP en el acrosoma y DsRed2 en la vaina mitocondrial de la pieza media. Los espermatozoides que perdieron el acrosoma se indican con un asterisco. Adaptado de (Hasuwa et al., 2010). **C)** Porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto dentro del tracto reproductor femenino después de pasadas 4 horas del apareo. Adaptado de (la Spina et al., 2016).

acrosoma y DsRed2 en las mitocondrias ubicadas en la pieza media del flagelo (**Figura 12B**), pudo observarse por primera vez la migración de los espermatozoides murinos y su estado acrosomal *in vivo*. Estos trabajos encontraron que la mayoría de los espermatozoides empiezan a perder el acrosoma en el *isthmus* superior del oviducto, previo al contacto con los ovocitos ubicados en la *ampulla* (**Figura 12A y 12C**) (Hino et al., 2016; la Spina et al., 2016; Muro et al., 2016)

En los últimos años, la **progesterona** empezó a emerger como potencial inductor fisiológico de la EA. Además de estimular este proceso (Osman et al., 1989; Roldan et al., 1994), la progesterona también ha sido relacionada con otros

aspectos de la fisiología del espermatozoide como es la capacitación, la quimiotaxis, la movilidad e hiperactivación (Gatica et al., 2013; Lishko et al., 2011; Oren-Benaroya et al., 2008; Publicover et al., 2007; Sagare-Patil et al., 2012; Servin-Vences et al., 2012; Strünker et al., 2011; Uhler et al., 1992).

Reportes recientes en espermatozoides humanos, demuestran que la progesterona, al unirse a una enzima hidrolasa ABHD2 activa la escisión del endocannabinoide 2AG y esto resultaría en la apertura de CatSper (Kirichok y Lishko, 2011; Miller et al., 2016). Por otro lado, en la especie murina, se llevaron a cabo ensayos de célula única utilizando las sondas fluorescentes FM4-64 y Fluo4 para ver el efecto de la progesterona sobre la EA. FM4-64 es una sonda que se une a la MP y ha sido ampliamente utilizada como marcador de la EA (Balestrini et al., 2020; Sánchez-Cárdenas et al., 2014a). Por su parte, Fluo4 es una sonda que ingresa al espacio intracelular y es un sensor de la $[Ca^{2+}]_i$. Gracias a la utilización de ambas sondas, se observó que la progesterona induce un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza del espermatozoide murino y esto promovería la EA. Por lo tanto, al observarse el aumento en la cabeza, la acción de la progesterona en ratones no estaría mediada por CatSper (**Figura 13**) (Romarowski et al., 2016b).

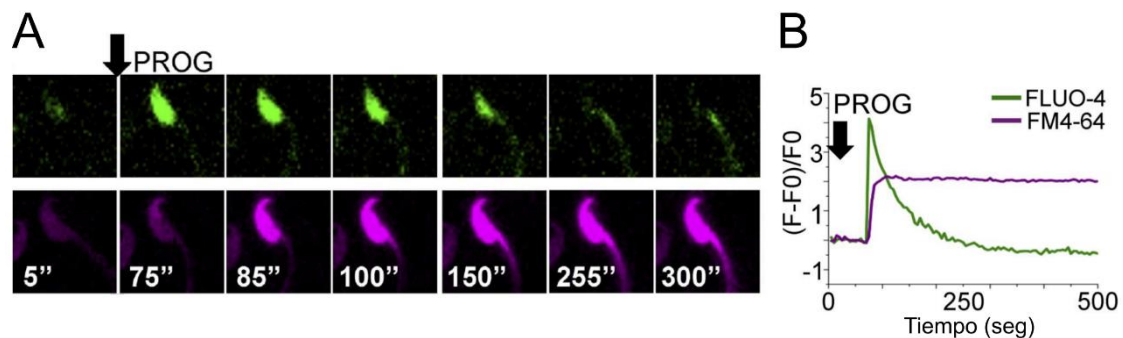


Figura 13. Un aumento transitorio específico en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la progesterona promueve la EA en el espermatozoide de ratón. A) Serie de tiempo representativa para la respuesta de un espermatozoide a la progesterona. En verde se observan los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ (sonda Fluo4) y mayor fluorescencia de Fluo4 indica que hay mayor $[Ca^{2+}]_i$. En magenta se observa la MP (sonda FM4-64 como marcador de la EA) y el aumento de dicha sonda indica la ocurrencia de la EA. **B)** Trazos de fluorescencia para las imágenes en **A)**. En el eje y se grafica la formula $(F-F_0)/F_0$, donde F_0 es el promedio de intensidad de fluorescencia previo a la inducción con progesterona y F es la medida de intensidad de fluorescencia para cada tiempo. De esta manera se muestra la magnitud de cambio de fluorescencia sobre la fluorescencia basal, F_0 . Adaptado de (Romarowski et al., 2016b).

En el sistema reproductor femenino hay tres fuentes de progesterona: el cuerpo lúteo en los ovarios, el epitelio oviductal y las células del *cumulus* que rodean al ovocito (Guidobaldi et al., 2008; Hunter et al., 1983; Pharazyn et al., 1991;

Richardson y Oliphant, 1981; Yamashita et al., 2003). Si bien la acción de la progesterona en la regulación génica a través de su receptor nuclear ha sido ampliamente caracterizada, se cree que en los espermatozoides murinos actuaría a través de un receptor de membrana no genómico (mPR α) ya que son células transcripcional y traduccionalmente inactivas (Thomas, 2008).

Fecundación

Durante la reproducción sexual, el ovocito y el espermatozoide se fusionan para generar un embrión nuevo y único. A pesar de su singularidad fisiológica, esta fusión implica la coordinación de procesos biológicos fundamentales como la polarización celular, la remodelación de la MP, interacciones proteicas, señalización mediada por receptores y fusión celular (Deneke y Pauli, 2021).

En mamíferos, los ovocitos maduros se ovulan siguiendo una señal hormonal y se detienen en la metafase II de la meiosis en espera de la fecundación (Deneke y Pauli, 2021). Por otro lado, el viaje del espermatozoide termina en la *ampulla* del oviducto femenino donde ambas gametas se encuentran. A partir de ahí, los espermatozoides deben superar una serie de barreras físicas y bioquímicas. Después de la EA, el espermatozoide debe penetrar en primer lugar al CO, compuesto por las células de la granulosa y la matriz secretada. Estas proveen nutrientes al ovocito en crecimiento y secretan progesterona la cual podría inducir la EA. Una vez que atravesaron al CO, los espermatozoides se encuentran con una segunda barrera, la ZP (**Figura 11A**). Como se mencionó anteriormente, la ZP es una matriz glicoproteica que aparte de contribuir a evitar la polispermia, mantiene la integridad del embrión, evitando que los blastómeros se adhieran al epitelio del *isthmus* y se degraden (Yanagimachi, 2022).

Luego de la penetración de la ZP, el espermatozoide ingresa al espacio perivitelino donde puede adherirse y fusionarse con la MP del ovocito. La interacción del espermatozoide y el ovocito conduce a la fusión de sus MP, un evento celular único que debe ser altamente eficiente para que el primer espermatozoide encuentre la superficie del ovocito, pero que al mismo tiempo debe ser estrechamente regulado para evitar la fusión inespecífica de otros espermatozoides (Deneke y Pauli, 2021).

Proteínas de reconocimiento

Gracias a la generación de modelos de ratones *knock-out*, se pudo determinar la relevancia de varias proteínas, tanto del espermatozoide como del ovocito, en la unión y fusión de ambas gametas (Siu et al., 2021).

En cuanto al espermatozoide, como se mencionó previamente, la relocalización de IZUMO1 y SPACA6 al segmento ecuatorial durante la EA es esencial para la adhesión y fusión al ovocito (**Figura 14A**). Ratones macho *knock-out* para estas proteínas resultan infértiles, dado que sus espermatozoides realizan la EA, penetran el CO y la ZP, pero son incapaces de fusionarse con la membrana del ovocito, acumulándose en el espacio perivitelino del mismo (Barboux et al., 2020; Inoue et al., 2005; Noda et al., 2020). Sumadas a las ya mencionadas, estos últimos años se identificaron diversas proteínas espermáticas involucradas en el proceso de adhesión y fusión de las gametas: TMEM95, SOF1, FIMP, y DCST1/DCST2 (**Figura 14A**) (Fujihara et al., 2020; Inoue et al., 2021; Noda et al., 2020).

En lo que a las proteínas del ovocito respecta, se reportó que tanto JUNO como CD9 son necesarias para la fusión de las gametas (**Figura 14B**). La primera fue reconocida como el receptor para IZUMO1 y su expresión en el ovocito disminuye rápidamente luego de la fecundación. Se observó que JUNO se desprende de la MP del ovocito en vesículas extracelulares y mediante este mecanismo, ayudaría a prevenir la polispermia (Bianchi et al., 2014). De igual manera que con las proteínas espermáticas mencionadas previamente, los modelos de hembras *knock-out* para JUNO y CD9 presentan fertilidad disminuida debido a fallas en la fusión de las gametas (Bianchi et al., 2014; Chen et al., 1999). Ya que JUNO se pierde rápidamente apenas entran en contacto las gametas y esto ocurre previamente a que se complete la fusión de las membranas, se considera probable que existan mecanismos de reconocimiento de membrana adicionales. Reportes recientes en la especie humana apuntan a un nuevo candidato, la proteína ovocitaria MAIA, la cual interaccionaría con el complejo IZUMO1-JUNO y mantendría el acercamiento de las membranas de las gametas incluso cuando JUNO se desprende de la membrana del ovocito (Vondrakova et al., 2022).

Fases de la fusión de las gametas

La interacción entre el ovocito y el espermatozoide se puede dividir en tres pasos principales: 1) acercamiento del espermatozoide, 2) penetración de la cubierta del ovocito y unión al oolema, y 3) fusión de las MP (Deneke y Pauli, 2021).

A nivel molecular, el primer paso en la unión del espermatozoide al ovocito implica la interacción de IZUMO1, que se localiza en el segmento ecuatorial de los espermatozoides reaccionados (Satouh et al., 2012), con su receptor homólogo JUNO presente en la membrana del ovocito (**Figura 14 B-1**). La unión de IZUMO1 a JUNO impulsaría la organización local y acumulación de CD9 en la membrana. El incremento de CD9 en la interfase espermatozoide-ovocito provocaría que la membrana de la gameta femenina se protruya hacia la membrana del espermatozoide (**Figura 14 B-2**). Posteriormente a la unión inicial de IZUMO1-JUNO, se reportó que el complejo IZUMO1-JUNO se oligomeriza y esto sería crítico para la fusión de las gametas. En este punto, JUNO no se detecta en la superficie celular ya que se desprende, como se mencionó anteriormente, de la membrana del ovocito en forma de vesículas (**Figura 14 B-3**). Se ha descrito que el disparador para la oligomerización de IZUMO1 sería una proteína disulfuro isomerasa (PDI). Las PDI son responsables del plegamiento adecuado de proteínas extracelulares o de membrana durante el proceso de maduración en el retículo endoplasmático en células somáticas. Después de la oligomerización de IZUMO1, el siguiente paso implica el reclutamiento del fusógeno espermático (**Figura 14 B-4**) (Siu et al., 2021). Si bien su identidad aún no se conoce, reportes recientes proponen que IZUMO no sólo participa en la adhesión de las células sino también en la fusión de las mismas (Brukman et al., 2023).

La fusión de las membranas del ovocito y el espermatozoide es un proceso energéticamente desfavorable que requiere de la modulación de la arquitectura de la membrana para formar el poro de fusión. Se cree que la fusión de espermatozoides y ovocitos se produce a través de un intermedio de hemifusión de membrana, similar a lo que ocurre en células virales y la EA. La fusión de las dos membranas se produce a través de la secuencia de fusiones de cada cara de la bicapa lipídica. Primero, las caras externas de la bicapa lipídica se ponen en contacto y se mezclan en un estadio de hemifusión. Luego, se mezclan las

caras internas para formar finalmente, el poro de fusión (**Figura 14C**) (Siu et al., 2021).

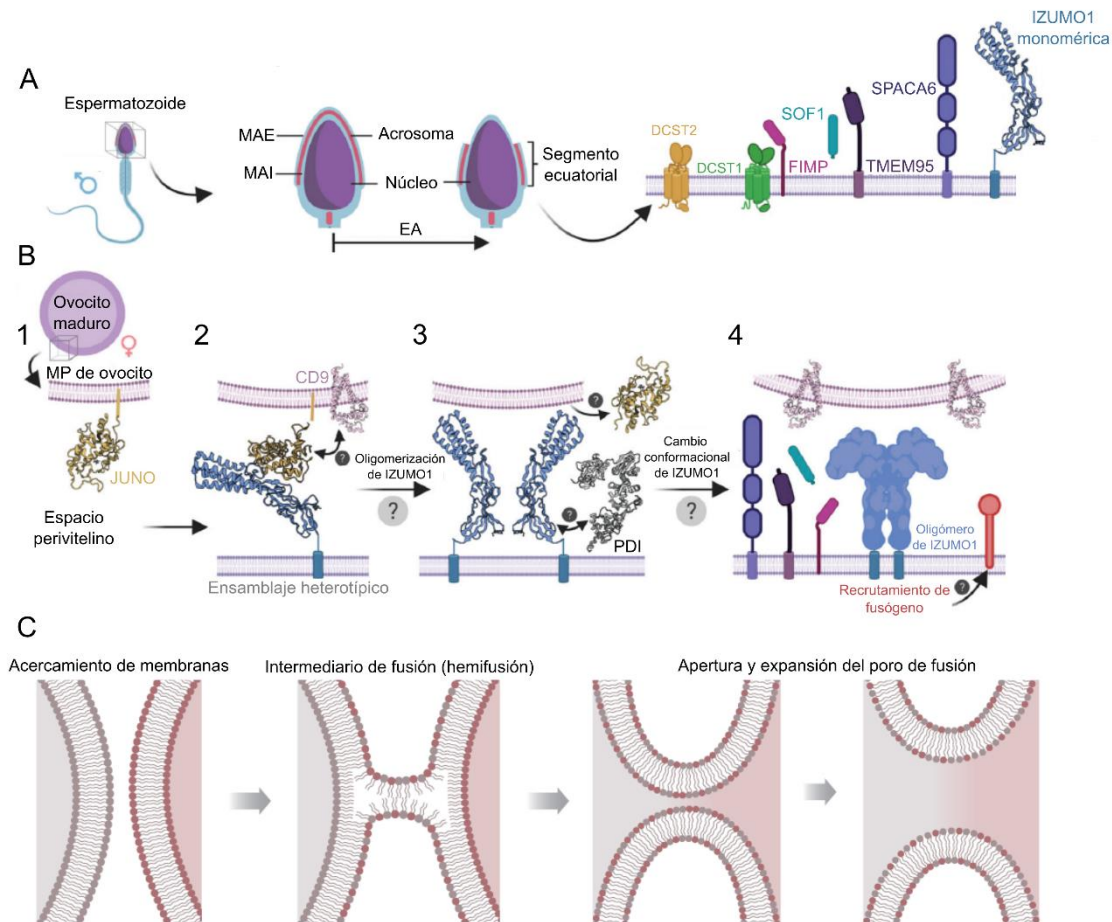


Figura 14. Modelo actual de unión y fusión espermatozoide-ovocito. **A)** Después de la EA, IZUMO1, SPACA6 y TMEM95 colocalizan en las regiones ecuatoriales de los espermatozoides. FIMP parece funcionar antes de la EA. Hay datos contradictorios sobre si TMEM95 interactúa o no con IZUMO1. SOF1 es una proteína espermática secretada. DCST1 y DCST2 son proteínas transmembrana implicadas en la regulación de la estabilidad de la proteína SPACA6. **B)** 1. El espermatozoide llega al espacio perivitelino y se adhiere al ovocito. IZUMO1 está localizada en el segmento ecuatorial del espermatozoide que perdió el acrosoma y su receptor homólogo, JUNO, en la membrana del ovocito. 2. JUNO reconoce y se une a IZUMO1 en una conformación monomérica. La unión de IZUMO1 y JUNO impulsa la acumulación de CD9 en la interfaz espermatozoide-ovocito formando un anclaje que mantiene a las membranas del espermatozoide y del ovocito en proximidad. 3. Oligomerización de IZUMO1. Luego de la unión inicial de IZUMO1-JUNO, el complejo se dimeriza. El desencadenante de la oligomerización de IZUMO1 no se comprende completamente; sin embargo, PDI sería el principal candidato para dicha función. Se cree que JUNO se desprende del oolema y se traslada al espacio perivitelino después de la fecundación. 4. Reclutamiento de fusógenos. El fusógeno espermatozoide-ovocito sigue siendo un misterio. Sin embargo, los datos sugieren que IZUMO1 forma un andamio para reclutar al complejo de fusión de las gametas. Adaptado de (Siu et al., 2021). **C)** Formación de poros de fusión. La fusión de las membranas del ovocito y el espermatozoide requiere la modulación de la arquitectura de la membrana. Se cree que el fusógeno cataliza la formación de un intermedio de hemifusión, que es la estructura donde se mezclan las caras externas de las bicapas de la membrana del espermatozoide y del ovocito. Posteriormente, las caras internas se mezclan para formar el poro de fusión. Adaptado de (Deneke & Pauli, 2021).

Fusión y movilidad espermática

Una característica interesante y poco estudiada es la movilidad del espermatozoide durante la fusión de las gametas. Varios reportes, especialmente de la década del 80 y 90, sostienen que poco después del contacto de la cabeza del espermatozoide con la membrana del ovocito, se produce una repentina disminución de la movilidad flagelar en ratones y ratas (Gaddum-Rosse et al., 1982; Gaddum-Rosse et al., 1984; Wolf y Armstrong, 1978). Al principio, el flagelo del espermatozoide presenta movilidad vigorosa mientras la cabeza pasa a través de la ZP y el espacio perivitelino. Posteriormente, se ralentiza de manera abrupta en el primer minuto de contacto entre las gametas y a partir de entonces, sólo muestra débiles movimientos vibratorios. Sumado a esto, algunos trabajos demuestran que el flagelo asume una postura curva o rota a partir del punto de fusión de la cabeza (Gaddum-Rosse et al., 1982; Gaddum-Rosse et al., 1984; Wolf y Armstrong, 1978). En 2016, un grupo de investigadores demostró que, para someterse a la fusión, los espermatozoides deben aplicar a la membrana del ovocito un movimiento oscilante de alta frecuencia. Luego de estas oscilaciones, el flagelo se detiene y se produce la fusión de membranas (Ravaux et al., 2016; Vondrakova et al., 2022).

En resumen, todos estos reportes coinciden con la observación del cese de movilidad del flagelo espermático durante la fusión. Sin embargo, hasta el día de la fecha, se desconocen las causas de este fenómeno.

Activación ovocitaria

La fusión de ambas gametas resulta finalmente en la activación del ovocito la cual 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). Durante muchos años, existieron tres hipótesis sobre los posibles mecanismos por los que los espermatozoides desencadenan la liberación de Ca^{2+} en el ovocito (Parrington et al., 2019). La primera se denominó “hipótesis del conducto” y se basa en la idea de que los canales presentes en la superficie de las membranas espermáticas actúan como un conducto para la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, y este Ca^{2+} activa entonces la

liberación de Ca^{2+} dentro del ovocito (Jaffe, 1991). La segunda, llamada “hipótesis de la interacción entre la superficie del ovocito y el espermatozoide”, propuso que la activación ovocitaria se desencadena por una interacción entre un ligando espermático y un receptor del ovocito (Evans y Kopf, 1998; Jaffe, 1990; Schultz y Kopf, 1995). Por último, la tercera y actualmente aceptada es la denominada “hipótesis del factor soluble espermático”. Esta hipótesis propone que el espermatozoide contiene un factor soluble que, tras la fusión de las gametas, entra en el ovocito, y desencadena la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. La primera evidencia de que una proteína espermática soluble desencadena las oscilaciones de Ca^{2+} que inducen el desarrollo embrionario en los mamíferos fue proporcionada por Swann en 1990. Dicho investigador inyectó extractos citosólicos de espermatozoides en ovocitos de mamíferos y demostró que los mismos desencadenaban oscilaciones de Ca^{2+} muy similares a las observadas en la fecundación (Stice y Robl, 1990; Swann, 1990). El análisis mostró que el factor era aparentemente algún tipo de proteína (Swann, 1990; Wu et al., 1997). A pesar de que a lo largo de los años se propusieron varios candidatos, hoy en día la evidencia más robusta apunta a la fosfolipasa $\text{C}\zeta$ 1 (PLC ζ) como el factor soluble espermático (Parrington et al., 2019). Además de presentar expresión específica en espermatozoides, se demostró que la inyección de su ARNm en ovocitos de ratón desencadena oscilaciones de Ca^{2+} similares a las inducidas por fecundación (Cox et al., 2002; Saunders et al., 2002). Sumado a esto, estudios de inmunofluorescencia revelaron que la proteína se encontraba principalmente en la región ecuatorial o postacrosomal de la cabeza del espermatozoide humano (Grasa et al., 2008; Yoon et al., 2008; Yoon et al., 2012; Young et al., 2009), que es el área que primero se fusiona con el ovocito (Parrington et al., 2019).

De esta manera, la fusión de las gametas resulta en la transferencia del ADN paterno, PLC ζ y el centrosoma. Por su parte, el centrosoma del espermatozoide está 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).

Objetivo e Hipótesis

Después de la EA, los espermatozoides deben migrar a la *ampulla*, ubicar y alcanzar los ovocitos no fecundados, penetrar la matriz del *cumulus* y la ZP y, finalmente, fusionarse con el ovocito (Yanagimachi, 1994a). Todos estos procesos comparten la necesidad de modular la movilidad de los espermatozoides. Sin embargo, poco se sabe sobre la regulación de la movilidad después de la aparición de la EA o antes de la fusión con el ovocito.

Objetivo

El objetivo principal del proyecto fue estudiar los cambios estructurales y dinámicos del flagelo murino en espermatozoides que han realizado la EA y, por ende, se encuentran fisiológicamente en condiciones de fecundar a un ovocito.

Hipótesis

La hipótesis detrás de este trabajo es que la EA produce cambios estructurales en el flagelo espermático que son esenciales para la fusión con el ovocito.

Materiales y Métodos

Reactivos

Los reactivos se obtuvieron de las siguientes fuentes: la progesterona, laminina y concanavalina A se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU); Fluo-4 AM, ácido plurónico, Alexa Fluor-647-*phalloidin*, FM4-64, FM1-43, Hoechst 33342 y Bodipy-GM1 de Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU); SiR-Actin y Memglow 700 de Cytoskeleton (Denver, CO, EEUU) e Ionomicina de Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, EE UU). Gonadotropina de yegua preñada (PMSG) y gonadotropina coriónica humana (hCG) fueron comprados en Syntex (Bs. As., Argentina).

Animales

Se utilizaron ratones maduros (8 a 12 semanas de edad) de las cepas CD1, Híbrido F1 (macho C57BL/6 × hembra BALB/c) y transgénico B6D2F1-Tg (CAG/mt-DsRed2, Acr-EGFP) RBGS002Osb (EGFP-DsRed2) (Hasuwa et al., 2010). En todos los casos, los ratones se mantuvieron en grupos de cuatro individuos por jaula, alojados en una habitación con temperatura controlada (23 °C), luces encendidas a las 07:00 h y apagadas a las 19:00 h, y libre acceso a agua filtrada y comida de laboratorio. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos de Cuidado Animal Institucional y fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y del Instituto de Biología y Medicina Experimental de Buenos Aires (Protocolo aprobado #12/2021). Los experimentos se realizaron en estricta conformidad con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio aprobada por los Institutos Nacionales de Salud (NIH).

Medio de cultivo y capacitación

El medio no capacitante (medio NC) utilizado fue el medio Toyoda-Yokoyama-Hosi (TYH modificado) (Toyoda et al., 1971) que contiene NaCl 119,3 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂·2H₂O 1,71 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄·7H₂O 1,2 mM, piruvato de sodio 0,51 mM, glucosa 5,56 mM, ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) 20 mM y 10 µg/mL de gentamicina. Para las

condiciones de capacitación, se añadieron NaHCO_3 15 mM y BSA 5 mg/mL (medio CAP). En todos los experimentos, el pH se ajustó a 7,4 con NaOH.

Los animales se sacrificaron y se recogieron espermatozoides de ratón del *cauda* epididimario. Ambos *caudas* se colocaron en 1 ml de medio NC. Luego de 15 min de incubación a 37°C (*swim-out*), se retiraron los *caudas* y los espermatozoides se resuspendieron hasta alcanzar una concentración máxima final de 1×10^7 células/mL en 100 μL del medio apropiado. Se añadió un volumen igual (100 μL) de medio NC o medio CAP doblemente concentrado (CAP 2X: NaHCO_3 30 mM y BSA 10 mg/mL), y los espermatozoides se incubaron durante 60 min a 37 °C.

***Live imaging* de espermatozoides transgénicos durante la EA**

Una vez capacitados, los espermatozoides de ratones transgénicos EGFP-DsRed2 se inmovilizaron en cubreobjetos recubiertos con concanavalina A (1 mg/mL, se adhiere tanto cabeza como cola al vidrio) para permitir las grabaciones. Los espermatozoides sueltos se eliminaron mediante un lavado suave y la cámara se llenó con el medio de registro (medio NC) que contenía FM4-64 10 μM o medio NC solo.

Para las adiciones, se agregó suavemente progesterona (concentración madre 50 mM disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO), concentración final 100 μM), ionomicina (concentración madre 2 mM disuelta en DMSO, concentración final 10 μM) o vehículo (DMSO) preparados en el medio de registro usando una micropipeta.

Para obtener los detalles de las muestras, microscopios, condiciones de *imaging* y sondas utilizadas de todos los experimentos de *live imaging* de la tesis, ver la **Tabla 1**.

Análisis de la movilidad espermática

Para obtener las imágenes, se inmovilizaron espermatozoides capacitados de ratones transgénicos EGFP-DsRed2 en cubreobjetos recubiertos con laminina (1 mg/mL, se adhiere solo la cabeza al vidrio y permite el movimiento flagelar).

Las grabaciones se realizaron como se describe anteriormente utilizando un medio de registro (medio NC) que contenía FM4-64 10 μ M.

La frecuencia del batido flagelar se calculó según lo propuesto por Corkidi y colaboradores (Corkidi et al., 2021). El flagelo de cada célula individual se rastreó a partir de videos grabados (2 min de duración a 100 *frames* por seg) para cada condición experimental mediante la detección de su orientación media para inferir su frecuencia del batido a través de la transformada de Fourier. Cada condición fue evaluada antes de agregar progesterona y posteriormente por un total de 20 min (videos de 2 min cada 5 min).

***Live imaging* de la MP de la pieza media durante la EA**

Los espermatozoides capacitados provenientes de ratones CD1 se registraron como se describe anteriormente utilizando un medio de registro (medio NC) que contenía FM4-64 0,5 μ M, Bodipy-GM1 0,1 mg/mL, FM1-43 1 μ M o Memglow-700 0,2 μ M.

El diámetro de la pieza media y la intensidad de la fluorescencia se cuantificaron utilizando el *software* ImageJ 1.47V (NIH, EEUU). Para la intensidad de la fluorescencia de FM4-64, las regiones de interés se localizaron en la cabeza y la pieza media del espermatozoide. Después de la sustracción del fondo, se usó la fórmula $F-F_0/F_0$, donde F_0 es la fluorescencia promedio de las imágenes previas a la aplicación del estímulo para inducir la EA.

Microscopía óptica y de súper-resolución

Con el fin de facilitar el entendimiento de los resultados, se desarrollarán, a continuación, conceptos básicos de microscopia óptica y de súper-resolución, junto con la explicación teórica de las tres técnicas utilizadas en esta tesis. Mas adelante, en el orden de aparición de las figuras de la sección **Resultados**, se explicarán los detalles experimentales de cada técnica.

La microscopía óptica de fluorescencia, en la que se emplean fluoróforos orgánicos, inorgánicos y sondas, es la técnica más popular para la observación de especímenes con especificidad molecular (Jacquemet et al., 2020). Este nivel de discriminación se logra ya sea marcando los componentes celulares con

sondas fluorescentes o uniendo una proteína fluorescente a una molécula de interés (Lichtman y Conchello, 2005).

El diagrama de Jablonski representa las transiciones electrónicas entre estados de energía durante la excitación de un fluoróforo (**Figura 15A**). La fluorescencia ocurre cuando un fluoróforo en un estado electrónico fundamental (S_0) absorbe energía fotónica en un rango de longitud de onda específico, que promueve que un electrón cambie a un estado excitado de mayor energía (S_n). Posteriormente, la energía se libera y el electrón vuelve al S_0 , ya sea por relajación no radiativa o por emisión de fluorescencia en un espectro característico de longitudes de onda de menor energía. Además de la relajación no radiativa y la emisión de fluorescencia, los electrones pueden cruzar al estado triplete (T_1). Desde T_1 , un

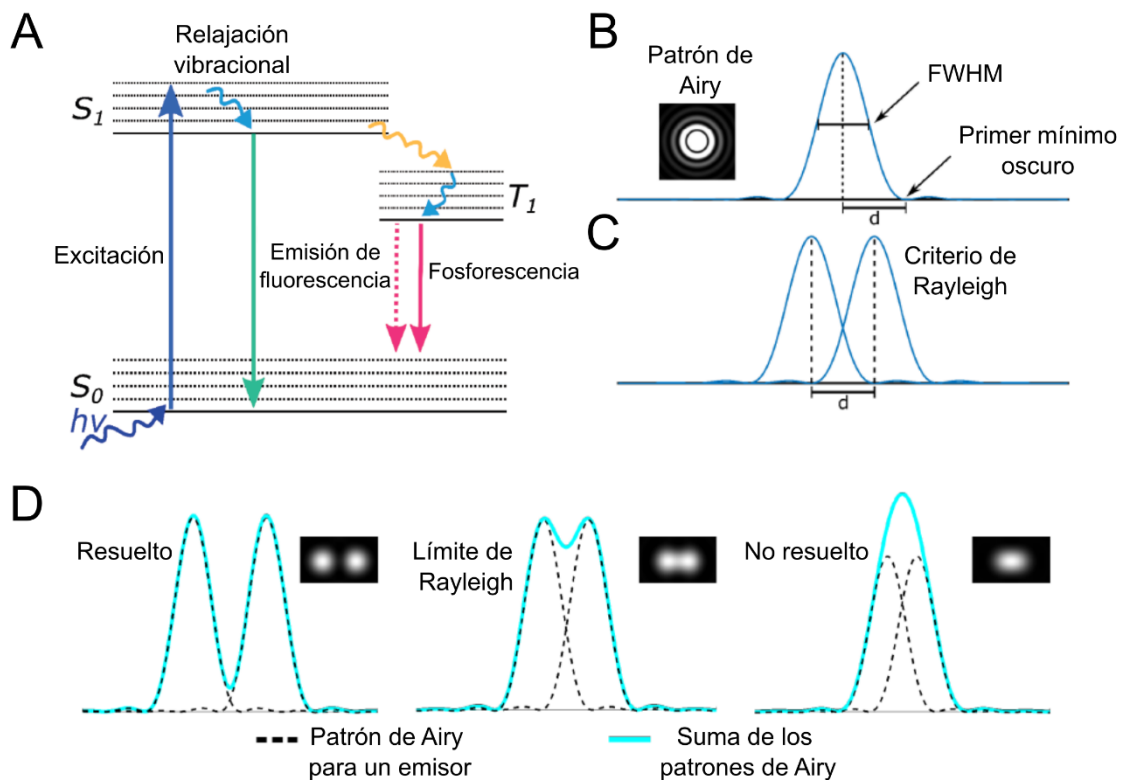


Figura 15. Proceso de fluorescencia descrito por el diagrama de Jablonski y el límite de resolución espacial según el criterio de Rayleigh. **A)** Diagrama de Jablonski simplificado que representa los estados de energía de una molécula fluorescente. El fotón de excitación le confiere una energía $h\nu$ al fluoróforo que provoca la transición de un electrón del estado fundamental S_0 al estado excitado S_1 . El electrón excitado puede regresar al S_0 a través de la emisión radiativa de un fotón (fluorescencia) o por una transición no radiativa. Con menos frecuencia, los electrones pueden alcanzar un estado de triplete (T_1). Desde T_1 , un electrón puede regresar al S_0 a través de la emisión radiativa de un fotón (fosforescencia) o por una transición no radiativa. **B)** Representación bidimensional de la función de punto extendido (PSF) formada por el patrón de Airy de un emisor y **C)** el correspondiente criterio de Rayleigh para la resolución óptica cuando dos de estos patrones están lo suficientemente cerca. **D)** Distribuciones de fluorescencia de dos emisores separados a tres distancias diferentes. A la izquierda los emisores se resuelven espacialmente, en el centro se ejemplifica el límite de resolución (según el criterio de Rayleigh) mientras que, a la derecha, los emisores se encuentran sin resolver. Adaptado de (Alva et al., 2022).

electrón puede volver al S_0 a través de emisión fosforescente radiativa (**Figura 15A**) (Alva et al., 2022).

En su descripción ondulatoria, la luz emitida por un solo fluoróforo sufre difracción a medida que viaja a través de la óptica del microscopio. Una vez que la luz llega al ojo o al detector del microscopio, se observa en forma de patrón de difracción también conocida como función de punto extendido (PSF). La PSF toma la forma de una serie de discos concéntricos (el patrón de discos de Airy) (**Figura 15B**) con una alta intensidad en su centro (disco de Airy de orden 0) (Vangindertael et al., 2018).

La forma de la PSF depende de la longitud de onda de la luz, la apertura numérica del microscopio y el índice de refracción de la muestra. Para comparar la potencia de resolución de un microscopio, se suele calcular la mitad del ancho completo (FWHM) del perfil de intensidad de PSF (**Figura 15B**); cuanto menor sea el FWHM, mayor será la resolución del microscopio (Schermelleh et al., 2019; Vangindertael et al., 2018).

De acuerdo con el criterio de Rayleigh, el límite de resolución en el que los emisores de dos puntos no pueden ser resueltos es cuando el pico del patrón de discos de Airy de un emisor se superpone con el primer mínimo del disco de Airy de orden 0 del otro emisor (Rayleigh, 1903) (**Figura 15C**). Debido a que el ancho del disco de orden 0 en la PSF es igual aproximadamente a la mitad de la longitud de onda de la luz emitida por el fluoróforo, el límite de resolución de un microscopio óptico es aproximadamente de 200 a 300 nm (**Figura 15D**) (Alva et al., 2022).

Como se mencionó previamente, la microscopía de fluorescencia permite la observación de fenómenos biológicos con especificidad. Sin embargo, muchos aspectos de estos procesos siguen siendo desconocidos debido al límite de resolución espacial del microscopio óptico. El desarrollo de la instrumentación óptica mejorada, sondas fluorescentes y algoritmos matemáticos para superar esta limitación se ha acelerado considerablemente en los últimos años. Estos esfuerzos han dado paso a una nueva era para el estudio de la naturaleza a través de la luz: microscopía de súper-resolución (Alva et al., 2022). La principal ventaja de estas técnicas es que proporcionan resoluciones cercanas a las que se obtienen con microscopía electrónica, manteniendo los beneficios de la microscopía óptica, como una amplia gama de sondas moleculares de alta

especificidad, preparación sencilla de muestras y compatibilidad con células vivas (Culley et al., 2018). A lo largo de esta tesis utilizaremos tres técnicas diferentes de microscopía de súper-resolución. Existen diferentes tipos de técnicas: dentro del conjunto de técnicas de súper-resolución basadas en la fluctuación de fluorescencia se utilizará **SRRF** (*Super-Resolution Radial Fluctuations* o Fluctuaciones Radiales de Súper-Resolución) y **MSSR** (*Mean Shift Super-Resolution* o Súper-Resolución de la Media Desplazada), y como técnica de localización de molécula única se utilizará **STORM**.

En particular, la microscopía de súper-resolución basada en la fluctuación de fluorescencia incluye una colección de técnicas de análisis de imágenes que se basan en el procesamiento estadístico de datos temporales de las variaciones de fluorescencia para reducir la incertidumbre acerca de las posiciones de los fluoróforos dentro de una muestra (Alva et al., 2022).

SRRF es un algoritmo de súper-resolución que consta de dos partes principales: un análisis espacial en el que el algoritmo genera un mapa de radialidad por cada imagen sin procesar (limitada por difracción), y un análisis temporal de cada mapa de radialidad por estadísticas temporales para generar una sola imagen de súper-resolución (**Figura 16A**) (Culley et al., 2018; Gustafsson et al., 2016). SRRF es capaz de reconstruir una imagen de súper-resolución con solo 100 *frames* limitados por difracción, logrando una resolución lateral de 80-50 nm (Alva et al., 2022).

SRRF amplía cada píxel en "subpíxeles", y a cada subpíxel se le asigna un valor no binario relacionado con la probabilidad de que contenga un fluoróforo (**Figura 16A**). Para calcular este valor, SRRF mide las simetrías radiales locales en la imagen (denominadas "radialidad" por los autores), que surgen de la simetría radial intrínseca de la PSF del microscopio. La radialidad es una medida de la convergencia del gradiente de intensidad: para cada subpíxel, los vectores de gradiente de intensidad se miden para un anillo de subpíxeles circundantes cercanos (**Figura 16A**). A continuación, se calcula el grado de convergencia de estos vectores en el subpíxel central original (Culley et al., 2018). Para un subpíxel ubicado cerca del verdadero centro de una molécula fluorescente individual, habrá un alto grado de convergencia y, por lo tanto, un alto valor de radialidad (**Figura 16A**, cuadro azul). Para un subpíxel desplazado de una molécula fluorescente, los gradientes de intensidad circundantes mostrarán una

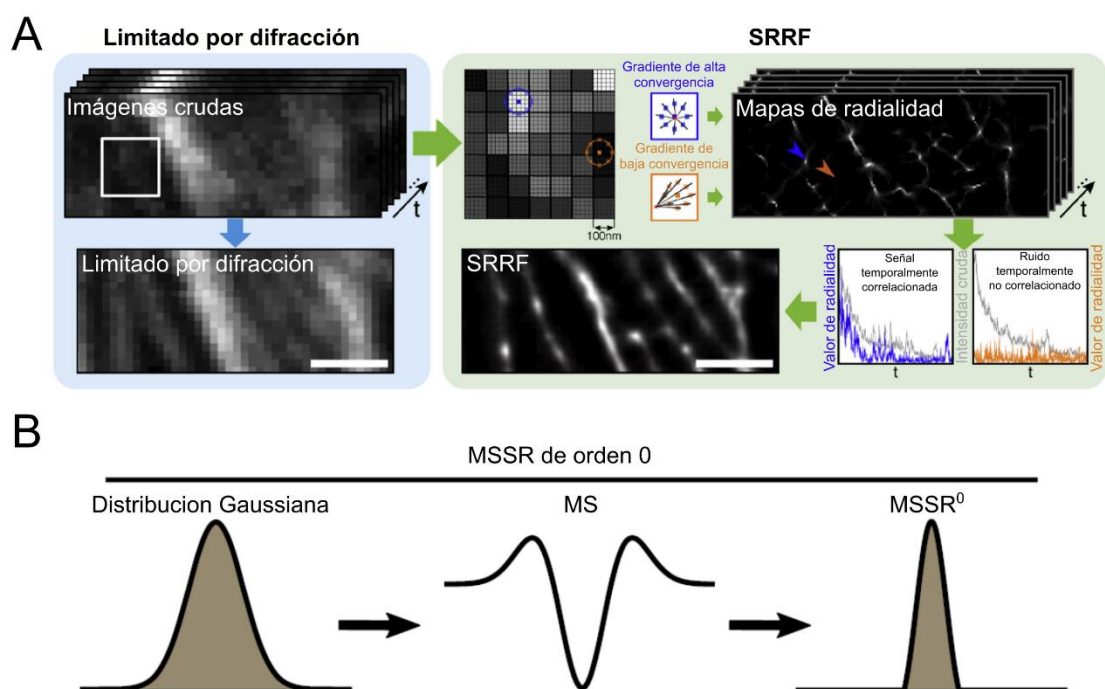


Figura 16. Descripción general del algoritmo SRRF y MSSR. A) Datos sin procesar y pasos de procesamiento en SRRF. El cuadro celeste contiene la serie de datos sin procesar limitados por difracción que se pueden sumar para crear una única imagen limitada por difracción. El cuadro gris contiene los pasos de procesamiento de imágenes SRRF. Los datos sin procesar se dividen en subpíxeles (en este caso, cada píxel de los datos sin procesar se divide en una matriz de 5 x 5 subpíxeles). Se muestran ejemplos de los gradientes de intensidad utilizados para la transformación de radialidad para los dos subpíxeles resaltados (azul y naranja). Las puntas de flechas azul y naranja en los mapas de radialidad indican la ubicación de estos subpíxeles, con sus correlaciones temporales trazadas debajo; las gráficas coloreadas indican la variación de la radialidad a lo largo del tiempo y las gráficas grises indican la variación de la intensidad de la fluorescencia a lo largo del tiempo en estas ubicaciones en los datos sin procesar. Adaptado de (Culley et al., 2018). **B)** La MS se aplica a la distribución gaussiana inicial de fotones emitidos por una fuente puntual (izquierda) que da como resultado un gráfico de MS (centro). La aplicación de transformaciones algebraicas adicionales proporciona la distribución MSSR de orden cero (MSSR⁰) (derecha). Adaptado de (Torres-García et al., 2022).

baja convergencia, ya que estarán orientados hacia la dirección de la ubicación real de la molécula o, en el caso del ruido, al azar (**Figura 16A**, cuadro naranja). Por lo tanto, la radialidad actúa como un representante de las posiciones de las moléculas. Al realizar esta medición de radialidad para cada subpíxel en las 100 imágenes limitadas por difracción, se generan 100 mapas de radialidad. Como resultado, las fluctuaciones en la radialidad a lo largo del tiempo se pueden analizar para extraer más información sobre las posiciones subyacentes de los fluoróforos. Por ejemplo, trazar el valor de la radialidad a lo largo del tiempo muestra fluctuaciones temporales marcadamente diferentes dependiendo de si el subpíxel está centrado en un fluoróforo (**Figura 16A**, gráfico azul) o no (**Figura 16A**, gráfico naranja). El grado de correlaciones temporales a través de los

mapas de radialidad se puede representar como la imagen SRRF final (Culley et al., 2018).

La técnica de **MSSR** puede obtener una imagen de súper-resolución partiendo de una sola imagen limitada por difracción (Torres-García et al., 2022). El algoritmo se basa en una idea similar a los mapas de radialidad en SRRF e incorpora un análisis temporal, permitiendo así la discriminación fiable de emisores vecinos separados por 40 nm (Alva et al., 2022). MSSR se adapta a la suposición de que las imágenes de fluorescencia están formadas por señales discretas recopiladas (fotones) de fuentes puntuales (fluoróforos) convolucionadas con la PSF del microscopio. Este algoritmo se basa en la teoría de la media desplazada (Mean Shift, MS), que estima las propiedades de similitud locales entre un punto central y sus vecinos (Holtzer et al., 2007).

El procesamiento comienza con el cálculo de la MS, lo que garantiza que los valores de intensidad altos en la imagen limitada por difracción coincidan con valores positivos grandes en la imagen MSSR. La MS se aplica a la distribución gaussiana inicial de fotones emitidos por una fuente puntual (**Figura 16B**, izquierda) que da como resultado un gráfico de MS (**Figura 16B**, centro). La aplicación de transformaciones algebraicas adicionales proporciona la distribución MSSR de orden cero ($MSSR^0$) (**Figura 16B**, derecha). Esta es la primera etapa que reduce la distribución de emisores y, como resultado, la distribución espacial se vuelve "refinada" (es decir, para una distribución gaussiana de fluorescencia, su ancho se reduce) (Torres-García et al., 2022).

Además, MSSR ofrece la posibilidad de seleccionar un enfoque iterativo que proporciona una mayor resolución espacial. Se lo denomina MSSR de órdenes superiores (entero $n > 0$) y aplica funciones algebraicas básicas, como resta, multiplicación, complemento y normalización, sobre imágenes resultantes consecutivas. MSSR proporciona una mejora adicional en la resolución a medida que el orden aumenta, conservando la mayor intensidad de la imagen original, pero disminuyendo progresivamente las intensidades más bajas (Torres-García et al., 2022).

STORM es un tipo de técnica de microscopía óptica de súper-resolución basada en el cambio estocástico de la señal de fluorescencia de una molécula única. En la microscopía de fluorescencia convencional, donde todos los fluoróforos de la muestra son fluorescentes, sus imágenes limitadas por difracción se

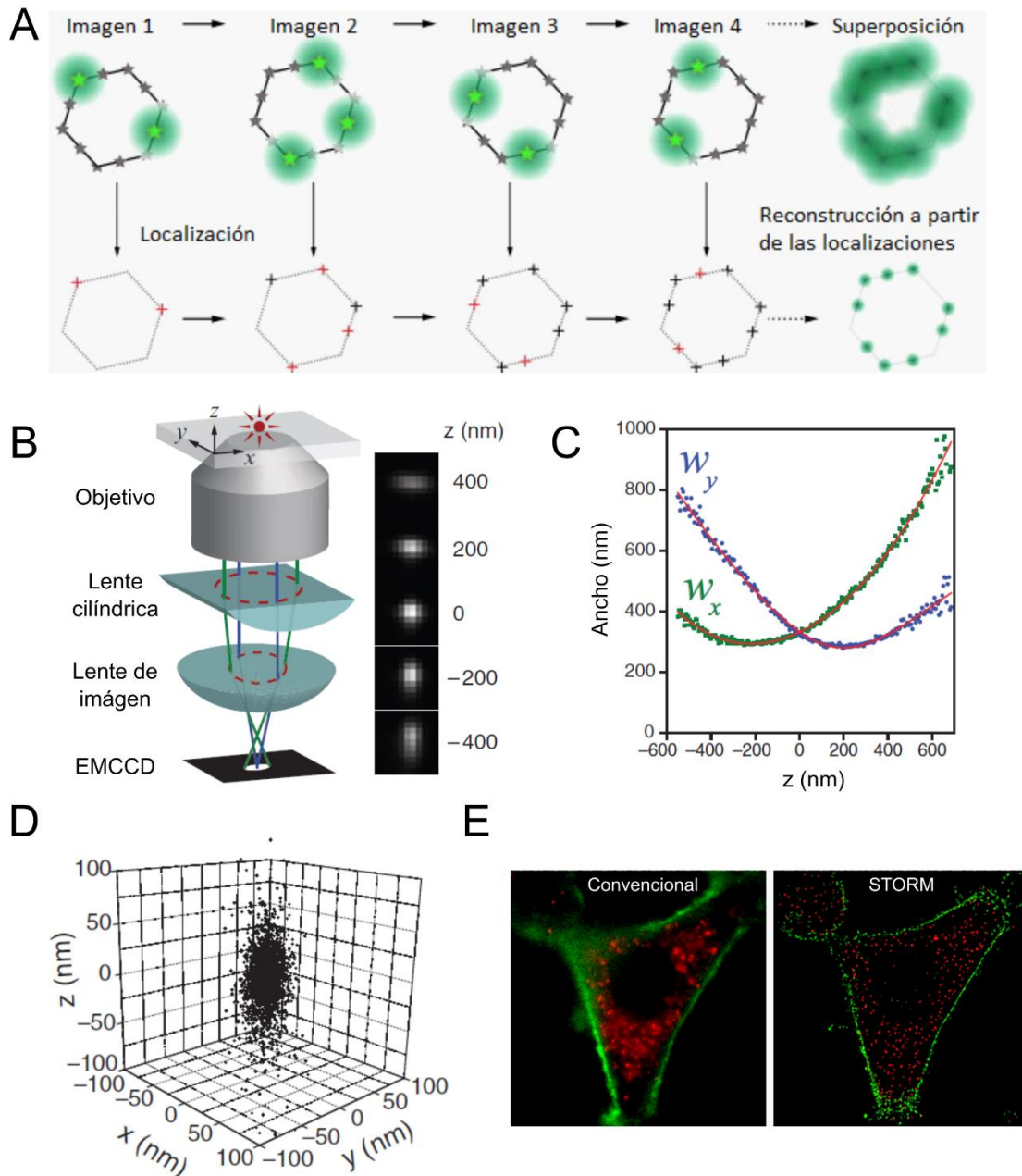


Figura 17. Descripción general de STORM y STORM 3D. **A)** STORM utiliza sondas fluorescentes que pueden cambiar entre estados fluorescentes y oscuros para que, en cada imagen, solo se detecte una pequeña fracción de los fluoróforos pudiendo entonces resolverlas ópticamente. Esto permite determinar sus posiciones con alta precisión a partir de las posiciones centrales de los puntos fluorescentes. Posteriormente, se realiza la reconstrucción a través de un análisis computacional y se identifican los centros geométricos de las moléculas emisoras con alta precisión y, como tal, se puede generar un "mapa" de súper-resolución de la estructura de la imagen. **B)** El esquema de STORM 3D. El diagrama óptico simplificado ilustra el principio para determinar la coordenada z de un objeto fluorescente a partir de la elipticidad de su imagen introduciendo una lente cilíndrica en el camino óptico. El panel derecho muestra imágenes de un fluoróforo, en varias posiciones z . EMCCD, es un detector multiplicador de electrones de carga acoplada. **C)** Curva de calibración de anchos de imagen w_x y w_y en función de z obtenido a partir de moléculas individuales o *beads*. Cada punto de datos representa el valor medio obtenido de seis moléculas. **D)** Distribución de localización tridimensional de moléculas individuales. Adaptado de (Huang et al., 2008b). **E)** Comparación de una imagen obtenida por microscopía convencional con una procesada por STORM. Adaptado de (Daan et al., 2016).

superponen, creando una imagen suave pero borrosa (**Figura 17E**). STORM/PALM utiliza sondas fluorescentes que pueden cambiar entre estados fluorescentes y oscuros para que, en cada imagen, solo se detecte una pequeña fracción de los fluoróforos que se puede resolver ópticamente (**Figura 17A**) (Huang et al., 2008a). Esto permite determinar sus posiciones con alta precisión a partir de las posiciones centrales de los puntos fluorescentes. STORM se basa en la suposición de que los fluoróforos que emiten en forma simultánea en cada imagen están separados por distancias mayores al límite de difracción. De esta forma, gracias al análisis computacional se identifican los centros geométricos de las moléculas emisoras con alta precisión y, como tal, se puede generar un "mapa" de súper-resolución de la estructura de la imagen (**Figura 17A**) (Huang et al., 2008b). Con múltiples imágenes de la muestra (alrededor de 50.000 imágenes), cada una capturando un subconjunto aleatorio de los fluoróforos, se puede reconstruir una imagen final de súper-resolución a partir de las posiciones acumuladas. Con esta técnica, se pueden lograr precisiones en la localización de hasta 1 nm en las dimensiones laterales para una sola sonda fluorescente (Huang et al., 2008b).

Para lograr imágenes de STORM en tres dimensiones (STORM 3D) se introduce a la técnica astigmatismo en la imagen sin comprometer la capacidad de posicionamiento lateral. Básicamente, en el camino óptico de la luz, se introduce una lente cilíndrica para crear dos planos focales ligeramente diferentes para las direcciones x e y (**Figura 17B**) (Holtzer et al., 2007; Kao y Verkman, 1994). Como resultado, la elipticidad y la orientación del fluoróforo (por ejemplo, *beads* o esferitas fluorescentes) en la imagen varía a medida que su posición cambia en el eje z (**Figura 17B**). Cuando el fluoróforo está en el plano focal promedio (aproximadamente a la mitad entre los planos focales x e y), donde la función de la PSF tiene anchos iguales en las direcciones x e y), la imagen aparece redonda; cuando el fluoróforo está por encima del plano focal promedio, su imagen está más enfocada en la dirección y que en la dirección x , y por lo tanto, parece elipsoidal con su eje largo a lo largo de x ; por el contrario, cuando el fluoróforo está por debajo del plano focal promedio, la imagen parece elipsoidal con su eje largo a lo largo de y (**Figura 17B**). De esta manera se genera una curva de

calibración donde se mide el ancho de deformación del fluoróforo en x e y (w_x y w_y , respectivamente) en función del eje z (**Figura 17C-D**) (Huang et al., 2008b). Cuando se analiza una imagen experimental mediante STORM 3D, la coordenada z de cada fluoróforo fotoactivado se determina comparando los valores w_x y w_y medidos de su imagen con las curvas de calibración de las *beads* (Huang et al., 2008b).

SRRF y MSSR

Las imágenes limitadas por difracción de FM4-64 se procesaron mediante el algoritmo de SRRF (Culley et al., 2018; Gustafsson et al., 2016) en el *software* ImageJ 1.47V (NIH, EEUU). Cada imagen estaba compuesta por 100 *frames* temporales y se procesaron para tener una sola imagen de súper-resolución por tiempo. Para el análisis se utilizaron los siguientes parámetros: Radio del anillo: 0,5, Ampliación de la radialidad: 5, Ejes en el anillo: 8, hacer *batch*: *true*. Los demás parámetros se establecieron como predeterminados.

Las imágenes limitadas por difracción de Memglow 700, Bodipy-GM1 y FM1-43 se procesaron mediante el algoritmo de MSSR (Torres-García et al., 2022). Cada imagen estaba compuesta por 100 *frames* temporales y se procesaron para tener una sola imagen de súper-resolución por tiempo. Para el análisis se utilizaron los siguientes parámetros: Amplificación (AMP)=5, PSF=10, Orden=0, Tipo de interpolación = bicúbico.

Estudio de diámetro e intensidad de fluorescencia FM4-64 mediante kimogramas

Los kimogramas se crearon con el *plugin* de ImageJ. Para los kimogramas de súper-resolución, se trazó una línea transversal cada 2,5 μm cruzando la pieza media en las imágenes SRRF (**Figura 18A**, panel izquierdo). Para obtener los valores de diámetro se utilizó el entorno de lenguaje R [R 3.3.3 GUI 1.69 Mavericks build (7328)]. Brevemente, los kimogramas de súper-resolución se procesaron con la función *acf* (autocorrelación) para obtener la posición del máximo de fluorescencia, que son ambos lados de la membrana de la pieza media. La distancia entre el máximo es entonces, el valor del diámetro (**Figura 18B**). Estos valores se normalizaron a los obtenidos previamente a la aplicación

del estímulo para inducir la EA. Para los kimogramas de fluorescencia, se trazó una línea a lo largo de toda la pieza media en las imágenes limitadas por difracción o crudas (sin procesamiento SRRF, **Figura 18A**, panel derecho). Los valores de fluorescencia también se obtuvieron con el entorno de lenguaje R. Después de la sustracción del fondo, se usó la fórmula $F - F_0 / F_0$, donde F_0 es la fluorescencia promedio de las imágenes previas a la aplicación del estímulo para inducir la EA. En estos kimogramas, se utilizó una escala de color para indicar el valor de la intensidad de la fluorescencia.

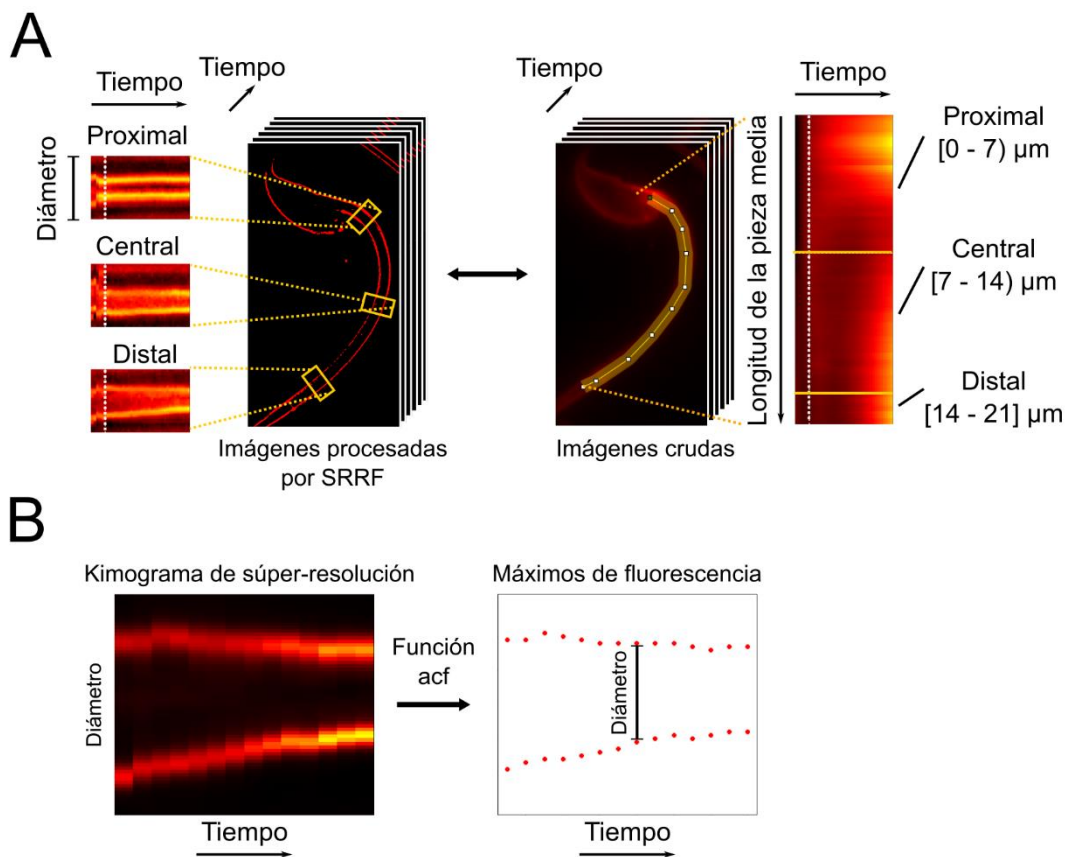


Figura 18. Diagrama esquemático que muestra la lógica detrás de los kimogramas. A) Panel izquierdo: Al dibujar líneas cruzadas cada 2,5 μm a través de la pieza media del espermatozoide en imágenes procesadas por SRRF, se crearon kimogramas de súper-resolución con el complemento Image-J Kymograph builder. El eje x es el tiempo, y el eje y muestra cómo cambia el diámetro. Panel derecho: En las imágenes limitadas por difracción, se dibujó una línea a lo largo de la pieza media para crear el kimograma de fluorescencia. El eje x es, una vez más, el tiempo, pero en este caso, el eje y representa la longitud de la pieza media. Se definieron tres secciones de la pieza media: proximal (0-7 μm , siendo 0 la unión cabeza-pieza media), central (7-14 μm) y distal (14-21 μm , junto al anulus). **B)** Kimograma de súper-resolución resultante de **A)**. Dicho kimograma se procesó a través de la función acf en el *software* R para obtener las posiciones de los máximos de fluorescencia, que son ambos lados de la membrana de la pieza media. La distancia entre el máximo es entonces, el valor del diámetro.

Curva de relación de los datos de contracción y fluorescencia de FM4-64. Transformación de datos de fluorescencia a contracción

Del análisis de kimogramas de la sección anterior obtuvimos dos valores principales para cada tiempo analizado: por un lado, de los kimogramas de súper-resolución obtuvimos los valores de diámetro normalizados cada $2,5 \mu\text{m}$ y por el otro, de los kimogramas de fluorescencia obtuvimos los valores de fluorescencia normalizados para cada píxel analizado, es decir un valor cada $0,117 \mu\text{m}$.

Para observar cómo se relacionan ambos valores se realizó un gráfico en el entorno de lenguaje R con todos los datos, es decir, de todas las células analizadas, todas las medidas de diámetro (cada $2,5 \mu\text{m}$) con sus respectivos valores de fluorescencia para todos los tiempos analizados. En dicho gráfico, el eje x corresponde al diámetro normalizado y el eje y corresponde a la fluorescencia normalizada. Además, se realizó una regresión lineal donde la fórmula general es $mx + b$, siendo m la pendiente con el valor $8,90 \pm 0,15$, b la ordenada al origen con el valor $-8,05 \pm 0,17$ y el R^2 es 0,32 (**Figura 19**).

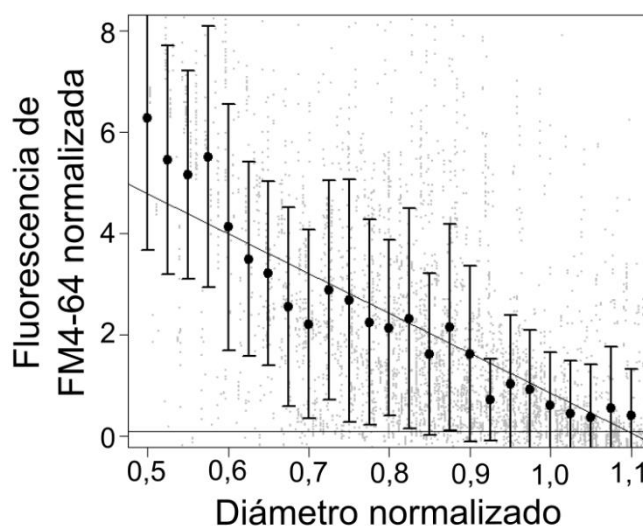


Figura 19. Correlación entre la fluorescencia de FM4-64 en la pieza media (eje y) y el diámetro normalizado (eje x). Los datos se presentan normalizados a la media de los *frames* antes de la inducción de la EA. Se muestran datos representativos de al menos 5 experimentos independientes y se analizaron un total de 36 células.

De este modo, teniendo los parámetros de la recta y dado un valor de fluorescencia de FM4-64, pudimos obtener un valor aproximado del diámetro de la pieza media. Dada la dispersión de los datos, solo pudimos obtener un valor

aproximado, probablemente no será el valor exacto y real del diámetro, pero podría darnos una idea de si la pieza media se está contrayendo o no. Además, la principal ganancia con esta transformación de los datos es la resolución espacial. Antes de esta transformación solo podíamos obtener valores de diámetro cada 2,5 μm y ahora obtendríamos un valor de diámetro aproximado para cada píxel analizado (es decir, cada 0,117 μm). En resumen, a partir de los kimogramas de fluorescencia normalizada obtenidos pudimos obtener kimogramas de diámetro normalizado aproximados.

***Live imaging* de los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y EA**

Se utilizaron espermatozoides de ratones CD1 e Híbridos F1. Después de la capacitación, las células se centrifugaron a 300 g durante 4 min y se incubaron en medio NC durante 20 min con Fluo-4 AM 1 μM y ácido plurónico al 0,05 %. Una vez cargadas, las células se centrifugaron a 300 g durante 4 min y se resuspendieron en 200 μl de medio CAP. Las grabaciones se realizaron como se describe anteriormente utilizando un medio de registro (medio NC) que contenía FM4-64 de 0,5 a 10 μM .

Para el análisis de célula única de 20 espermatozoides, las regiones de interés se realizaron en la pieza media (es decir, obteniendo un único valor de fluorescencia para toda la pieza media) en experimentos con un aumento de lente de 10X. Dichos datos de fluorescencia se graficaron utilizando el entorno de lenguaje R. Después de la sustracción del fondo, se usó la fórmula $F - F_0 / F_0$, donde F_0 es la fluorescencia promedio de las imágenes previas a la aplicación del estímulo para inducir la EA.

Kimograma 3D

El kimograma de tres dimensiones se construyó a partir del kimograma de fluorescencia de Fluo4 (construido de igual forma que el de FM4-64 previamente detallado) y el kimograma de diámetro normalizado. Básicamente, ambos kimogramas tienen tres dimensiones: el tiempo (eje x), la longitud a lo largo de la pieza media (eje y) y el código de color para diferenciar la intensidad de fluorescencia/diámetro. Usando la función `plot_ly` del entorno de lenguaje R, se

graficó el kimograma 3D donde: el tiempo sigue siendo el eje x, la longitud a lo largo de la pieza media el eje y y el eje z ahora es la intensidad de fluorescencia/diámetro. Si bien no es necesario, el código de color para esta última dimensión sigue estando presente para facilitar la interpretación visual de los datos.

***Live imaging* de la MP de la pieza media y la actina-F durante la EA**

Luego del *swim-out*, los espermatozoides provenientes de ratones CD1 se incubaron con la sonda SiR-actin durante 10 min en medio NC. La concentración de SiR-Actin fue de 100 nM durante todo el experimento para obtener una señal constante y evitar que la sonda interfiriera con la dinámica de la actina. Las grabaciones se realizaron como se describió anteriormente utilizando un medio de registro (medio NC) que contenía FM4-64 de 0,5 μ M. Las imágenes limitadas por difracción obtenidas fueron procesadas por SRRF como se detalló anteriormente.

Análisis de colocalización

Se utilizó el entorno de lenguaje R para calcular los coeficientes de colocalización de Manders mediante el uso de la fórmula presentada en el trabajo de Dunn (Dunn et al., 2011). Brevemente, los coeficientes son dos: M1 y M2, asignados arbitrariamente a las dos sondas en estudio (FM4-64 y SiR-actin). Sus fórmulas son:

$$M1 = \frac{\sum_i R_{i, colocal}}{\sum_i R_i} \quad M2 = \frac{\sum_i G_{i, colocal}}{\sum_i G_i}$$

En ambos casos, el numerador de la fórmula corresponde a los pixeles que tienen señal colocalizada, es decir que tienen señal tanto de FM4-64 como de SiR-actin ($R_{i, colocal}$). M1 fue asignado a la sonda FM4-64 y su denominador hace referencia a los pixeles que tienen señal solo de FM4-64 (R_i). Por otro lado, M2 fue asignado a SiR-actin y el denominador contempla a los pixeles que tienen señal solo de SiR-actin (G_i).

Para este análisis, las imágenes utilizadas fueron las imágenes de súper-resolución procesadas por SRRF del foco de contracción de FM4-64 y SiR-actin.

Análisis del cambio de posición de los máximos de fluorescencia

Para estudiar los picos de fluorescencia se utilizó el entorno de lenguaje R. Brevemente, a partir de los kimogramas de súper-resolución de FM4-64 y SiR-

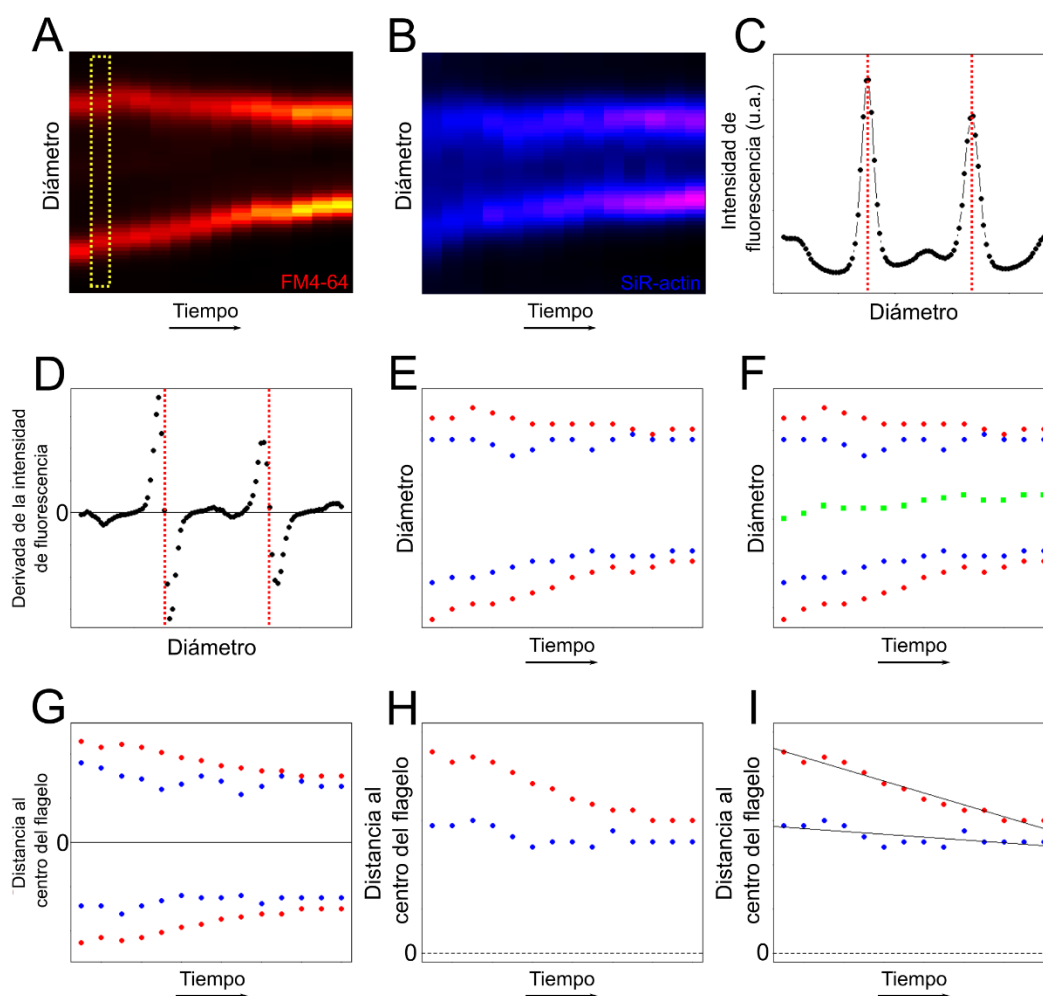


Figura 20. Análisis del cambio de posición de los máximos de fluorescencia. **A-B)** Kimograma de súper-resolución para FM4-64 y SiR-actin, respectivamente. **C)** Gráfico de intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias, u.a.) en función del diámetro para un tiempo dado, recuadrado en amarillo en **A)**. Las líneas rojas delimitan la posición del máximo de fluorescencia. **D)** Derivada de la intensidad de fluorescencia a partir del gráfico obtenido en **C)**. Las líneas rojas delimitan la posición del máximo de fluorescencia que coincide donde la derivada cambia de signo. **E)** Máximos de fluorescencia para FM4-64 (rojo) y SiR-actin (azul) en función del tiempo. **F)** Además de los máximos de fluorescencia, se grafica el centro del flagelo (verde) que se consideró promediando ambos lados de la membrana, es decir, ambos máximos de FM4-64 para cada tiempo. **G)** Normalización de los máximos de fluorescencia al centro del flagelo (0). **H)** Dado que, a ambos lados del centro, las gráficas son similares, el análisis se continuó solamente con el lado superior del gráfico en **G)**. **I)** La posición de los máximos de fluorescencia resultantes se ajustaron a una recta.

actin (**Figura 20A-B**), se siguió la posición de los máximos calculando la derivada de los kimogramas (**Figura 20C-D**). La posición del máximo de fluorescencia reside, entonces, donde la derivada cambia de signo. El centro de la célula se definió promediando ambos lados de la MP, es decir, ambos máximos de fluorescencia para FM4-64 (**Figura 20E-F**) y luego se normalizó a 0 (**Figura 20G**). Posteriormente, como ambos lados de los máximos de fluorescencia son similares alrededor del centro, se continuó el análisis con el lado superior del gráfico, que son los máximos superiores para FM4-64 y SiR-actin (**Figura 20H**). Finalmente, se ajustó una línea y se analizaron las pendientes (**Figura 20I**).

Para calcular la distancia entre la MP y la doble hélice de actina, a partir del gráfico obtenido en la **Figura 20I**, se restó la posición del máximo de FM4-64 a la posición del máximo de SiR-actin.

STORM 3D

Luego de la incubación en las condiciones apropiadas (NC con DMSO o CAP con Progesterona 100 μ M), las células se lavaron con medio NC por centrifugación (4 min a 400 g) y se resuspendieron en medio NC. Los espermatozoides se sembraron en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Corning n.º 1.5), se secaron al aire durante 10 min, se fijaron y permeabilizaron con glutaraldehído fresco al 0,3% y Triton-X100 al 0,25% en buffer de citoesqueleto (CB, que contenía MES 10 mM, 150 NaCl mM, EGTA 5 mM, glucosa 5 mM y $MgCl_2$ 5 mM, pH = 6,1) durante 1 min a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con CB (5 min a temperatura ambiente). A continuación, las células se incubaron con glutaraldehído al 2% en CB durante 15 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con CB (10 min a temperatura ambiente). Las muestras se trataron con $NaBH_4$ al 0,1% (recién preparado en PBS) durante 7 min a temperatura ambiente para reducir la fluorescencia de fondo, se lavaron dos veces con PBS (5 min a temperatura ambiente) y luego se incubaron 1 h a temperatura ambiente con Alexa 568-*Peanut agglutinin* (PNA, 0,01 mg/mL) y Alexa 647-*phalloidin* (1:13) diluido en PBS. A continuación, los espermatozoides se lavaron con PBS durante 5 min e inmediatamente se montaron en buffer de imágenes STORM (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 10 mM, glucosa oxidasa 0,56 mg/mL, catalasa 34 μ g/mL, glucosa 10% y β -

mercaptoetanol 1%). La tinción inespecífica se determinó incubando los espermatozoides en ausencia de anticuerpos contra la *phalloidin* (Gervasi et al., 2018). Las imágenes se adquirieron con el *software* Andor IQ 2.3 en un microscopio personalizado equipado con un objetivo Olympus PlanApo 100x NA 1.45 y un sistema de enfoque automático CRISP ASI (Campagnola et al., 2015; Weigel et al., 2011). Alexa Fluor 647 se excitó con un láser de 642 nm (DL640-150-O, CrystaLaser, Reno, NV) bajo iluminación continua. Inicialmente, la tasa de *photo-switching* fue suficiente para proporcionar una densidad de fluoróforo sustancial. Sin embargo, como los fluoróforos se fotoblanqueaban irreversiblemente, se introdujo un láser de 405 nm para mejorar el *photo-switching*. La intensidad del láser de 405 nm se ajustó en el rango de 0,01 a 0,5 mW para mantener una densidad adecuada de fluoróforos activos. La localización axial se logró a través del astigmatismo utilizando un sistema de óptica adaptativa MicAO 3DSR (Imagine Optic, Orsay, Francia) que permite tanto la corrección de las aberraciones esféricas como la introducción del astigmatismo (Izeddin et al., 2012). La localización axial con óptica adaptativa permitió la reconstrucción 3D sobre un espesor de 1 μm (Gervasi et al., 2018). Se generó una curva de calibración para la localización axial con microesferas TetraSpeck de 100 nm (Invitrogen) inmovilizadas en un cubreobjetos (Huang et al., 2008b). Las imágenes se adquirieron en una cámara EMCCD retroiluminada y enfriada por agua (Andor iXon DU-888) operada a -85°C a una velocidad de 23 *frames/seg*. Se recopilaron 50.000 imágenes para generar cada imagen de súper-resolución. La localización de una molécula única, la corrección de la deriva mediante correlación cruzada de imágenes y la reconstrucción se realizaron con ThunderSTORM (Ovesný et al., 2014).

Para encontrar las distribuciones radiales moleculares, seleccionamos regiones de interés del flagelo que se encontraron en línea recta. El centro de la sección transversal flagelar se encontró primero mediante el ajuste gaussiano de los histogramas de localización a lo largo de los ejes x e y . Luego, las coordenadas de las moléculas localizadas se transformaron en coordenadas cilíndricas para obtener la posición radial r y el ángulo azimutal Θ (Gervasi et al., 2018; Luque et al., 2021; Stival et al., 2018).

Ensayo de fecundación *in vitro* (FIV)

Ratones hembra Híbridos F1 de 8 a 12 semanas de edad fueron superovuladas usando gonadotropina coriónica equina (5 UI, PMSG; Syntex) a las 18:30, seguida de la inyección intraperitoneal de gonadotropina coriónica humana (5 UI, hCG; OVUSYN, Syntex) 48 h más tarde. Los COC se recolectaron de los oviductos 12–13 h después de la administración de hCG, se colocaron en medio TYH FIV (que contenía NaHCO_3 25 mM y BSA 4 mg/mL, sin adición de HEPES) y se inseminaron *in vitro* con espermatozoides capacitados a una concentración final entre 1×10^6 y 2×10^6 espermatozoides/mL (alta concentración de espermatozoides para permitir la polispermia). Después de la co-incubación durante 4 h a 37 °C con CO_2 al 5 %, los ovocitos se tiñeron con Hoechst 33342 10 $\mu\text{g/mL}$ durante 15 min y luego se lavaron tres veces antes de montarlos en un vidrio. Los ovocitos fueron colocados en 5 μL de medio TYH modificado CAP 0,5X (NaHCO_3 7,5 mM y BSA 2,5 mg/mL, HEPES 10 mM) que contenía FM4-64 10 μM , ligeramente comprimido bajo un cubreobjetos de 18 x 18 mm sostenido por cuatro puntos de vaselina sólida y sellado con esmalte de uñas.

Ensayo de fusión de espermatozoides y ovocitos

La fusión espermatozoide-ovocito se evaluó mediante el ensayo de penetración de ovocitos sin ZP en combinación con la técnica de transferencia de colorante nuclear Hoechst 33342 (Andrews y Bavister, 1989; Conover y Gwatkin, 1988; Hinkley et al., 1986; Stewart-Savage y Bavister, 1988). Se superovularon ratones hembra Híbrido F1 de 8 a 12 semanas de edad como se detalló anteriormente. Los COC se recolectaron de los oviductos 12 a 13 h después de la administración de hCG. Después de liberarse de las células del *cumulus* con hialuronidasa 0,2 mg/mL, se eliminó la ZP tratando a los ovocitos durante 10-20 seg con medio Tyrode ácido, pH 2,5 (Nicolson et al., 1975). Se pre-cargaron ovocitos sin ZP con Hoechst 33342 1 $\mu\text{g/mL}$ en medio TYH FIV durante 5 min a 37°C. Después de la incubación, los ovocitos se lavaron tres veces durante 20 min cada una en medio fresco TYH FIV y se montaron en una placa de Petri (Jin et al., 2011) (placas con fondo de vidrio MatTek, placa de Petri de 35 mm). Los ovocitos libres de ZP se colocaron en 5 μL de medio TYH FIV que contenía FM4-64 10 μM y se comprimieron ligeramente bajo un cubreobjetos de 9 x 9 mm sostenido por cuatro

puntos sólidos de vaselina. Se añadió medio TYH FIV que contenía FM4-64 10 μ M hasta alcanzar un volumen final de 200 μ L. A continuación, el medio se cubrió con aceite mineral precalentado a 37°C (Sigma, M8410). La placa con los ovocitos se colocó en una cámara de incubación a 37°C con 5% de CO₂ presente en el microscopio. Se inseminó con espermatozoides capacitados (a una concentración final de 1 x 10⁵ células/mL). Para la **Figura 37 y Figura 38**, se utilizaron espermatozoides EGFP-DsRed2, mientras que para la **Figura 39** espermatozoides Híbrido F1 cargados con Fluo4 (como se describió anteriormente).

Análisis estadístico

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos independientes para todas las determinaciones. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism v4.0 (San Diego, CA, EEUU) o utilizando el entorno de lenguaje R [R 3.3.3 GUI 1.69 Mavericks build (7328)]. El análisis estadístico realizado se indica en la leyenda de cada figura correspondiente. P<0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Tabla 1. Resumen de las muestras, microscopios utilizados, las condiciones de *imaging* y sondas. La notación DsRed2* hace referencia a la excitación conjunta de DsRed2 (de las mitocondrias del modelo transgenico EGFP-DsRed2) con FM4-64, ver **Figura 23A**.

Figura	Muestra	Microscopio	Condiciones de <i>imaging</i>	Sondas
21A	Espermatozoides EGFP-DsRed2	Microscopio de fluorescencia confocal de disco giratorio (Olympus IX83-DSU) con un objetivo 10X (UPLSAPO, NA 0,4) y una cámara sCMOS (Andor, Zyla).	Tiempo de exposición: 120 mseg para EGFP y DsRed2. Frecuencia de adquisición: 1 imagen cada 1 min por 15 min. Filtros: para EGFP, se utilizó el filtro U-FBWA excitación 460-495 nm / emisión 510-550 nm y para DsRed2 se utilizó el filtro U-FGWA excitación 530-550 nm / emisión 575-625 nm.	-
21B	Espermatozoides EGFP-DsRed2	Microscopio Eclipse TE 300 Nikon con un objetivo 40X de aceite de inmersión (PlanApo N, NA 1,42) y una cámara EMCCD (Andor)	Tiempo de exposición: 500 mseg para DsRed2 y EGFP. Frecuencia de adquisición: 2 imágenes cada 1 seg por 5 min.	-

		Technology, Belfast, Irlanda del Norte).	Filtros: Led cyan (3,15 A, Luminus Devices, Woburn, MA, EEUU). Paso de banda, filtro de excitación (HQ 480 nm /40X), espejo dicróico (Q505lp), y filtro de emisión (HQ 535 nm /50M, Chroma Technology, Bellows Falls, VT).	
22A	Espermatozoides EGFP-DsRed2	Microscopio de fluorescencia confocal de disco giratorio (Olympus IX83-DSU) con un objetivo 10X (UPLSAPO, NA 0,4) y una cámara sCMOS (Andor, Zyla).	Tiempo de exposición: 500 mseg para EGFP y FM4-64. Frecuencia de adquisición: 1 imagen cada 1 min por 15 min. Filtros: para EGFP, se utilizó el filtro U-FBWA excitación 460-495 nm / emisión 510-550 nm y para FM4-64 se utilizó el filtro ETCY5 excitación 590-650 nm / emisión 665-735 nm.	FM4-64 10 μ M
22B, 22C, 22D, panel izquierdo	Espermatozoides EGFP-DsRed2	Microscopio invertido Nikon (Melville, NY, EEUU, Eclipse Ti-U) con un objetivo 60X de aceite de inmersión (plan Apo TIRF DIC H/N2, Nikon, NA 1,45) con una cámara Andor Ixon 3 EMCCD modelo DU-8970-C00#B (Andor Technology, Belfast, Irlanda del Norte) o modelo Hammamatsu Orca-100 CCD C4742-95 (Hammamatsu Photonics, Bridgewater, NJ, EEUU).	Tiempo de exposición: 350 mseg para EGFP, 100 mseg para FM4-64. Frecuencia de adquisición: 1 imagen cada 2 seg por 5 min. Filtros: para EGFP, se utilizó el filtro GFP 96343, Espejo dicróico (D): 495 nm, excitación 470 nm /40, barrido 525/50 (Nikon); para FM4-64, se utilizó el filtro Wide Green 11007v2, D: 565 nm dcxt, excitación 535 nm 50, emisión 590 nm lvp2 (Chroma Technology Corporation).	FM4-64 10 μ M
22B, 22C, 22D, panel derecho	Espermatozoides EGFP-DsRed2	Microscopio de fluorescencia confocal de disco giratorio (Olympus IX83-DSU) con un objetivo 60X de aceite de inmersión (Plan Apo, NA 1,4) y una cámara sCMOS (Andor, Zyla).	Tiempo de exposición: 500 mseg para EGFP y FM4-64. Filtros: para EGFP, se utilizó el filtro U-FBWA excitación 460-495 nm / emisión 510-550 nm y para FM4-64 se utilizó el filtro ETCY5 excitación 590-650 nm / emisión 665-735 nm.	FM4-64 10 μ M
23	Espermatozoides EGFP-DsRed2	Microscopio de fluorescencia confocal de disco giratorio (Olympus IX83-DSU) con un objetivo 10X (UPLSAPO, NA 0,4) o 20X (UPLSAPO, NA	Tiempo de exposición: 10 mseg para el contraste de interferencia diferencial (DIC), 120 mseg para EGFP y DsRed2* y 500 mseg para FM4-64. Frecuencia de adquisición: 1 imagen cada 10 mseg	FM4-64 10 μ M

		0,75) y una cámara sCMOS (Andor, Zyla).	para DIC, 1 imagen cada 120 mseg para EGFP y DsRed2* y 1 imagen cada 500 mseg para FM4-64 por 3 min cada 5 min. Filtros: para EGFP, se utilizó el filtro U-FBWA excitación 460-495 nm / emisión 510-550 nm; para DsRed2* se utilizó el filtro U-FGWA excitación 530-550 nm / emisión 575-625 nm y para FM4-64 se utilizó el filtro ETCY5 excitación 590-650 nm / emisión 665-735 nm.	
24A, B	Espermatozoides de ratón CD1	Microscopio NanoImager S (Oxford Nanoimaging Ltd), equipado con un objetivo 100X de aceite de inmersión (Olympus, NA 1,4) y una cámara sCMOS (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3 Digital CMOS camera).	Tiempo de exposición: 10 mseg. Frecuencia de adquisición: 100 imágenes cada 30 seg por 20 min. Filtros: para la excitación de FM4-64 se utilizó un láser de 561 nm, la emisión fue colectada en el canal 1 (665-705 nm).	FM4-64 0,5 μ M
24F	Espermatozoides EGFP-DsRed2	Microscopio NanoImager S (Oxford Nanoimaging Ltd), equipado con un objetivo 100X de aceite de inmersión (Olympus, NA 1,4) y una cámara sCMOS (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3 Digital CMOS camera).	Tiempo de exposición: 10 mseg para EGFP y Memglow-700. Frecuencia de adquisición: 100 imágenes cada 30 seg por 20 min. Filtros: para la excitación de EGFP se utilizó un láser de 473 nm, la emisión se colectó en el canal 0 (498-551 nm); para la excitación de Memglow-700 se utilizó un láser de 640 nm, la emisión se colectó en el canal 1 (665-705 nm).	Memglow-700 0,2 μ M
24G	Espermatozoides EGFP-DsRed2	Microscopio NanoImager S (Oxford Nanoimaging Ltd), equipado con un objetivo 100X de aceite de inmersión (Olympus, NA 1,4) y una cámara sCMOS (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3 Digital CMOS camera).	Tiempo de exposición: 10 mseg para EGFP y Bodipy-GM1. Frecuencia de adquisición: 100 imágenes cada 30 seg por 20 min. Filtros: para la excitación de EGFP y Bodipy-GM1 se utilizó un láser de 473 nm, la emisión se colectó en el canal 0 (498-551 nm).	Bodipy-GM1 0,1 mg/mL
24H	Espermatozoides EGFP-DsRed2	Microscopio NanoImager S (Oxford Nanoimaging Ltd), equipado con un objetivo 100X de aceite de inmersión (Olympus,	Tiempo de exposición: 10 mseg para EGFP y FM1-43. Frecuencia de adquisición: 100 imágenes cada 30 seg por 20 min.	FM1-43 1 μ M

		NA 1,4) y una cámara sCMOS (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3 Digital CMOS camera).	Filtros: para la excitación de EGFP y FM1-43 se utilizó un láser de 473 nm, la emisión se colectó en el canal 0 (498-551 nm).	
26, 27	Espermatozoides de ratón CD1	Microscopio Nanolmager S (Oxford Nanoimaging Ltd), equipado con un objetivo 100X de aceite de inmersión (Olympus, NA 1,4) y una cámara sCMOS (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3 Digital CMOS camera).	Tiempo de exposición: 10 mseg. Frecuencia de adquisición: 100 imágenes cada 30 seg por 20 min. Filtros: para la excitación de FM4-64 se utilizó un láser de 561 nm, la emisión fue colectada en el canal 1 (665-705 nm).	FM4-64 0,5 μ M
28	Espermatozoides de ratón Híbrido F1	Microscopio de fluorescencia confocal de disco giratorio (Olympus IX83-DSU) con un objetivo 60X de aceite de inmersión (Plan Apo, NA 1.4) y una cámara sCMOS (Andor, Zyla).	Tiempo de exposición: 500 mseg para FM4-64. Frecuencia de adquisición: 1 imagen cada 1 min por 15 min. Filtros: para FM4-64 se utilizó el filtro ETCY5 excitación 590-650 nm/emisión 665-735 nm.	FM4-64 10 μ M
29	Espermatozoides de ratón CD1	Microscopio Nanolmager S (Oxford Nanoimaging Ltd), equipado con un objetivo 100X de aceite de inmersión (Olympus, NA 1,4) y una cámara sCMOS (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3 Digital CMOS camera).	Tiempo de exposición: 10 mseg para FM1-43. Frecuencia de adquisición: 100 imágenes cada 30 seg por 20 min. Filtros: para la excitación de FM1-43 se utilizó un láser de 473 nm, la emisión se colectó en el canal 0 (498-551 nm).	FM1-43 1 μ M
30	Espermatozoides de ratón Híbrido F1	Microscopio de fluorescencia confocal de disco giratorio (Olympus IX83-DSU) con un objetivo 10X (UPLSAPO, NA 0,4) y una cámara sCMOS (Andor, Zyla).	Tiempo de exposición: 500-200 mseg para Fluo4 y FM4-64. Frecuencia de adquisición: 1 imagen cada 10 seg por 9 min. Filtros: para Fluo4, se utilizó el filtro U-FBWA excitación 460-495 nm / emisión 510-550 nm; para FM4-64 se utilizó el filtro ETCY5 excitación 590-650 nm / emisión 665-735 nm.	FM4-64 10 μ M, Fluo4 1 μ M
31	Espermatozoides de ratón CD1	Microscopio Nanolmager S (Oxford Nanoimaging Ltd), equipado con un objetivo 100X de aceite de inmersión (Olympus, NA 1,4) y una cámara sCMOS (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3 Digital CMOS camera).	Tiempo de exposición: 10 mseg para EGFP y Memglow-700. Frecuencia de adquisición: 100 imágenes cada 30 seg por 20 min. Filtros: para la excitación de Fluo4 se utilizó un láser de 473 nm, la emisión se colectó en el canal 0 (498-551 nm); para la excitación	FM4-64 0,5 μ M, Fluo4 1 μ M

			de FM4-64 se utilizó un láser de 561 nm, la emisión se colectó en el canal 1 (665-705 nm).	
32, 33	Espermatozoides de ratón CD1	Microscopio Nanomager S (Oxford Nanomaging Ltd), equipado con un objetivo 100X de aceite de inmersión (Olympus, NA 1,4) y una cámara sCMOS (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3 Digital CMOS camera).	Tiempo de exposición: 10 mseg para FM4-64 y SiR-actin. Frecuencia de adquisición: 100 imágenes cada 30 seg por 20 min. Filtros: para la excitación de FM4-64 se utilizó un láser de 561 nm, la emisión se colectó en el canal 1 (665-705 nm); para la excitación de SiR-actin se utilizó un láser de 640 nm, la emisión se colectó en el canal 1 (665-705 nm).	FM4-64 0,5 μ M, SiR-actin 0,1 μ M
35	Espermatozoides EGFP-DsRed2	Microscopio de fluorescencia confocal de disco giratorio (Olympus IX83-DSU) con un objetivo 20X (UPLSAPO, NA 0,75) o 40X (UPLSAPO, NA 0,95) y una cámara sCMOS (Andor, Zyla).	Tiempo de exposición: 10 mseg para DIC, 50 mseg para Hoechst 33342, 120 mseg para EGFP y DsRed2* y 500 mseg para FM4-64. Frecuencia de adquisición: 1 imagen cada 5 μ m con un total de 10-15 planos. Filtros: para Hoechst 33342, se utilizó el filtro LF405-B excitación 368-415 nm / emisión 426-477 nm; para EGFP se utilizó el filtro U-FBWA excitación 460-495 nm / emisión 510-550 nm; para DsRed2* se utilizó el filtro U-FGWA excitación 530-550 nm / emisión 575-625 nm y para FM4-64 se utilizó el filtro ETCY5 excitación 590-650 nm / emisión 665-735 nm.	FM4-64 10 μ M, Hoechst 33342 10 μ g/ml
37, 38	Espermatozoides EGFP-DsRed2	Microscopio de fluorescencia confocal de disco giratorio (Olympus IX83-DSU) con un objetivo 10X (UPLSAPO, NA 0,4) o 20X (UPLSAPO, NA 0,75) y una cámara sCMOS (Andor, Zyla).	Tiempo de exposición: 10 mseg para DIC, 50 mseg para Hoechst 33342, 120 mseg para EGFP y DsRed2* y 500 mseg para FM4-64. Frecuencia de adquisición: 1 imagen cada 1 min por 60-120 min y 1 imagen cada 7 μ m con un total de 10-15 planos. Filtros: para Hoechst 33342, se utilizó el filtro LF405-B excitación 368-415 nm / emisión 426-477	FM4-64 10 μ M, Hoechst 33342 1 μ g/ml

			nm; para EGFP se utilizó el filtro U-FBWA excitación 460-495 nm / emisión 510-550 nm; para DsRed2* se utilizó el filtro U-FGWA excitación 530-550 nm / emisión 575-625 nm y para FM4-64 se utilizó el filtro ETCY5 excitación 590-650 nm / emisión 665-735 nm.	
39	Espermatozoides de ratón Híbrido F1	Microscopio de fluorescencia confocal de disco giratorio (Olympus IX83-DSU) con un objetivo 20X (UPLSAPO, NA 0,75) con una cámara sCMOS (Andor, Zyla).	Tiempo de exposición: 10 mseg para DIC, 40 mseg para Hoechst 33342, 300 mseg para Fluo4 y 100 mseg para FM4-64. Frecuencia de adquisición: 1 imagen cada 1 min por 60-120 min y 1 imagen cada 7 μ m con un total de 10-15 planos. Filtros: para Hoechst 33342, se utilizó el filtro LF405-B excitación 368-415 nm / emisión 426-477 nm; para Fluo4 se utilizó el filtro U-FBWA excitación 460-495 nm / emisión 510-550 nm y para FM4-64 se utilizó el filtro U-FGWA excitación 530-550 nm / emisión 575-625 nm.	FM4-64 10 μ M, Hoechst 33342 1 μ g/ml, Fluo4 1 μ M

Resultados

La EA promueve el cese de la movilidad en un subconjunto de espermatozoides

Para monitorear simultáneamente el estado acrosomal y la movilidad de los espermatozoides mediante *live imaging*, se usaron ratones transgénicos cuyos espermatozoides expresan EGFP (mostrado en verde) en su acrosoma y DsRed2 (mostrado en naranja) en las mitocondrias de la pieza media (EGFP-DsRed2) (**Figura 21A**). En dicha figura se muestran con recuadros células representativas que experimentaron la EA, visualizado por la pérdida de EGFP, de forma espontánea (cuadro blanco) e inducida por progesterona 100 μ M (cuadro rosa). Utilizando este modelo transgénico, se inmovilizaron espermatozoides a través de su cabeza en cubreobjetos recubiertos con laminina de forma tal que permitan el movimiento flagelar (**Figura 21B**). Mientras que la presencia del acrosoma se monitoreo mediante la señal de fluorescencia para EGFP, la movilidad se evaluó a través del movimiento de la pieza media (fluorescencia de DsRed2), que bate dentro y fuera del plano de imagen (**Figura 21B**).

La **Figura 21B-C** muestra la coexistencia de dos poblaciones de espermatozoides que experimentaron la EA inducida por progesterona. Algunos de los espermatozoides que no tienen señal de EGFP se movieron normalmente ($34,1 \pm 3,7$ %), mientras que la mayoría de ellos permanecieron inmóviles ($65,9 \pm 6,2$) (**Figura 21B-C**, panel superior e inferior, respectivamente).

El ciclo del batido flagelar engloba un mecanismo de autorregulación que recibe retroalimentación de señales moleculares y mecánicas (Inaba y Shiba, 2018; Sánchez-Cárdenas et al., 2018). El cese completo del ciclo del batido flagelar observado en la **Figura 21 B-C** podría ser un indicativo de un estímulo proporcionado por el proceso de EA o que ocurre de forma concomitante a él.

Para comprender la conexión entre la EA y la movilidad, planteamos la hipótesis de la existencia de un cambio mecánico en el flagelo como resultado de la EA. Por esta razón, se estudió la EA en presencia de la sonda fluorescente FM4-64 (Sánchez-Cárdenas et al., 2014b) para visualizar cambios estructurales a nivel de la MP o alteraciones en la forma del flagelo monitoreadas por cambios locales en la fluorescencia de FM4-64 que ocurren en la vecindad o dentro de la MP (**Figura 22**). Los espermatozoides EGFP-DsRed2 se estimularon con

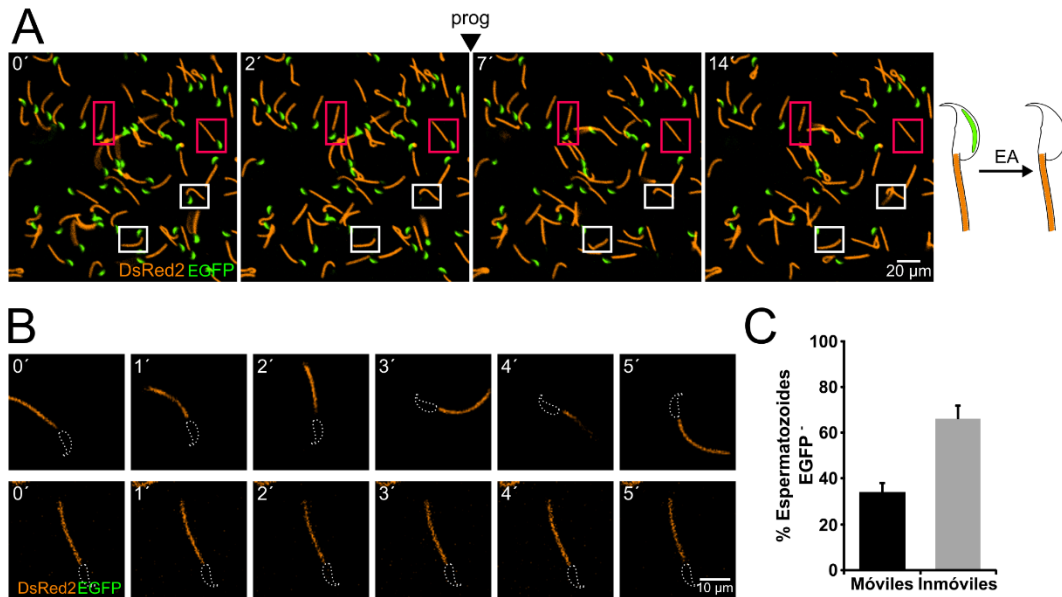


Figura 21. Dentro de la población de espermatozoides que perdieron el acrosoma, coexisten células con y sin movilidad. A) Una serie de tiempo representativa de espermatozoides EGFP-DsRed2 adheridos a un cubreobjetos con concanavalina A donde se indujo la EA con progesterona 100 μ M. Los cuadros blancos muestran ejemplos de células con EA espontánea (antes de la inducción) y los cuadros rosas muestran ejemplos de células con EA inducida por progesterona. En el lado derecho del panel hay una representación esquemática de la EA como se ve en este modelo transgénico. **B)** Una serie de tiempo representativa de espermatozoides EGFP-DsRed2 adheridos a cubreobjetos recubiertos con laminina que se sometieron a EA. El panel superior muestra un ejemplo de una célula con movilidad después de la EA, mientras que el panel inferior muestra una inmóvil. DsRed2 se muestra en naranja mientras que EGFP se muestra en verde. **C)** Cuantificación de células móviles o inmóviles entre los espermatozoides que perdieron el acrosoma (EGFP-). Se muestran imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes, en **C)** Se contaron 235 células.

progesterona y se registró su movilidad durante 5 min en presencia de FM4-64. Como muestra la **Figura 22A**, a medida que progresa la EA existen tres patrones de fluorescencia de FM4-64 en la cabeza y en la pieza media.

Un análisis más detallado de células individuales demostró que los cambios en la fluorescencia de FM4-64 en la pieza media están relacionados con su movilidad. La **Figura 22B** muestra un espermatozoide móvil con acrosoma intacto (control), donde los niveles de fluorescencia de EGFP y FM4-64 permanecieron constantes durante todo el experimento (Patrón I). Los espermatozoides que perdieron su acrosoma (sin EGFP y alta fluorescencia de FM4-64 en la cabeza del espermatozoide) y continuaron moviéndose, presentaron bajos niveles de fluorescencia de FM4-64 en la pieza media (**Figura 22C**, Patrón II). Por otro lado, los espermatozoides que perdieron el acrosoma y que permanecieron inmóviles mostraron un aumento en la fluorescencia de FM4-64 en la pieza media (**Figura 22D**, Patrón III). Los tres patrones se encuentran

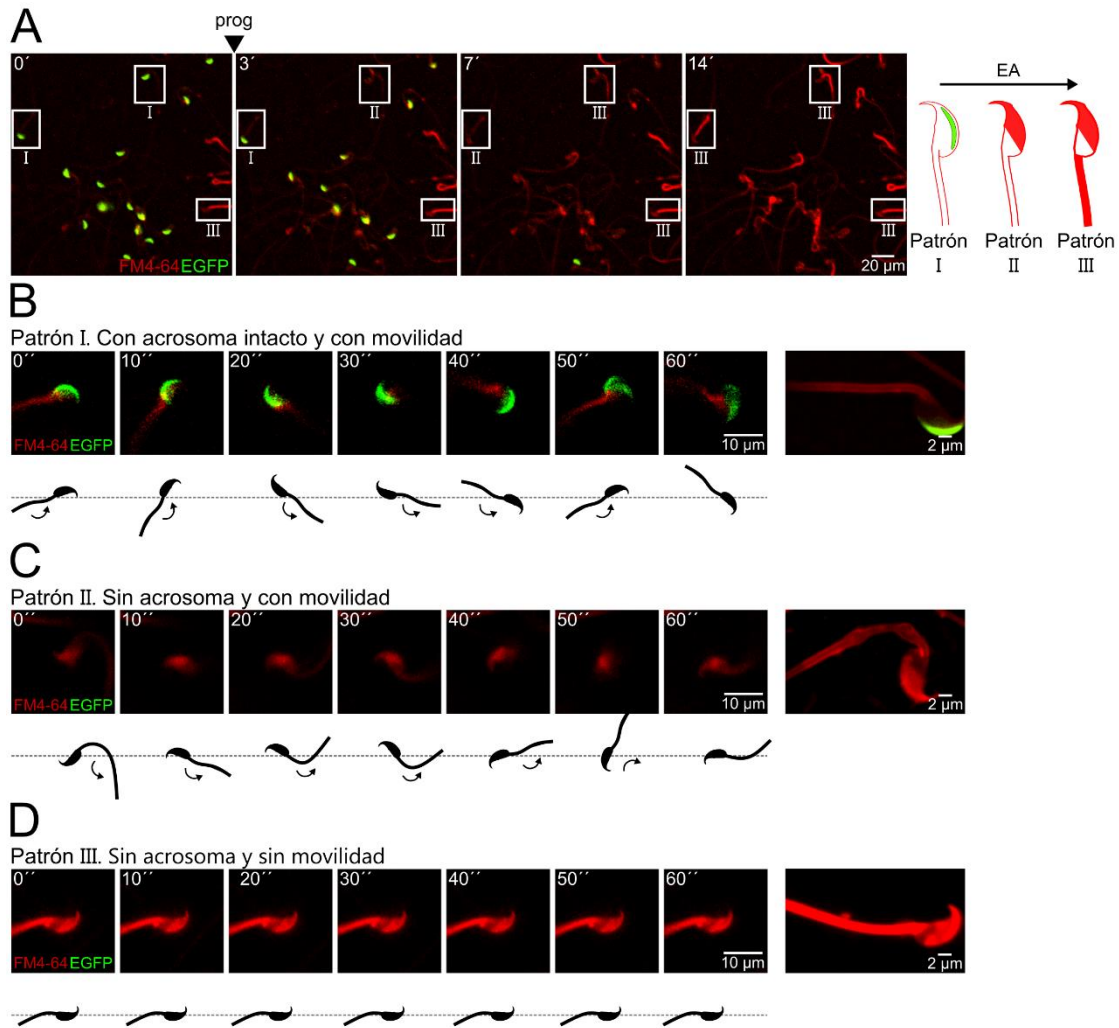


Figura 22. El aumento de la fluorescencia de FM4-64 en la pieza media en los espermatozoides que pierden el acrosoma se asocia con una pérdida de la movilidad. A) Una serie de tiempo representativa de espermatozoides EGFP-DsRed2 teñidos con FM4-64 10 μ M y unidos a cubreobjetos recubiertos con concanavalina A donde se indujo EA con progesterona 100 μ M. Los cuadrados blancos muestran ejemplos de células con patrón I, II o III inducidas por progesterona. En el lado derecho del panel hay una representación esquemática de EA como se ve en este modelo transgénico teñido con FM4-64. **B-D)** Imágenes representativas de espermatozoides EGFP-DsRed2 capacitados teñidos con FM4-64 10 μ M. El panel **B)** muestra un espermatozoide con acrosoma intacto y con movilidad (Patrón I), **C)** muestra un espermatozoide que perdió el acrosoma, con movilidad y baja fluorescencia de FM4-64 en la pieza media (Patrón II), **D)** muestra un espermatozoide que perdió el acrosoma, sin movilidad y alta fluorescencia de FM4-64 en la pieza media (Patrón III). En los tres casos, las células se indujeron con progesterona 100 μ M. En el panel izquierdo se muestra una imagen de cada patrón en mayor resolución. Se muestran imágenes representativas de al menos 5 experimentos independientes.

esquemáticos en el panel derecho de la **Figura 22A**. Cabe destacar que los últimos patrones de células que no contienen EGFP (con y sin movilidad) mostraron el aumento esperado en la fluorescencia de FM4-64 en la cabeza del espermatozoide (Romarowski et al., 2016b; Sánchez-Cárdenas et al., 2014a).

Para profundizar nuestra comprensión sobre cómo los espermatozoides pierden movilidad durante la EA, diseñamos un sistema de seguimiento que puede monitorear los cambios en la fluorescencia de las células en movimiento (**Figura 23**). Se evaluaron tres parámetros en tiempo real, a saber, la frecuencia del batido del flagelo (mediante su seguimiento en DIC, o el canal DsRed2*), el estado del acrosoma (señal EGFP) y los cambios que ocurren en la membrana de la pieza media (señal FM4-64). Una aclaración importante es que, debido a las características espectrales de DsRed2 (en el modelo transgénico), la sonda FM4-64 y la conformación del microscopio utilizado, mediante el uso del filtro U-FGWA excitación 530-550 nm / emisión 575-625 nm (en amarillo) se observó la emisión tanto de DsRed2 como de FM4-64 (en ausencia de FM4-64 se detectó solo DsRed2, visualizado en naranja). En cambio, cuando utilizamos el filtro ETCY5 excitación 590-650 nm / emisión 665-735 nm, solo se pudo visualizar la emisión de FM4-64 (en rojo). De esta manera, en las imágenes lo que se observa en color naranja serán solo mitocondrias (como ya se mostró en la **Figura 21**), en color amarillo (con notación DsRed2*) MP y mitocondrias, mientras que en color rojo se mostrará solo MP (**Figura 23A**).

La **Figura 23B** muestra que los espermatozoides que no realizaron la EA permanecieron móviles con una frecuencia del batido estable y una baja fluorescencia de FM4-64 durante el tiempo de registro. Contrariamente, luego de la EA, las células inducidas con progesterona disminuyeron gradualmente la frecuencia del batido y aumentaron la fluorescencia de FM4-64 en la pieza media (**Figura 23C**).

En conjunto, estos experimentos demuestran que la EA promovió el cese de la movilidad en un subconjunto de espermatozoides, lo que coincidió con un aumento en la fluorescencia de FM4-64 en la pieza media.

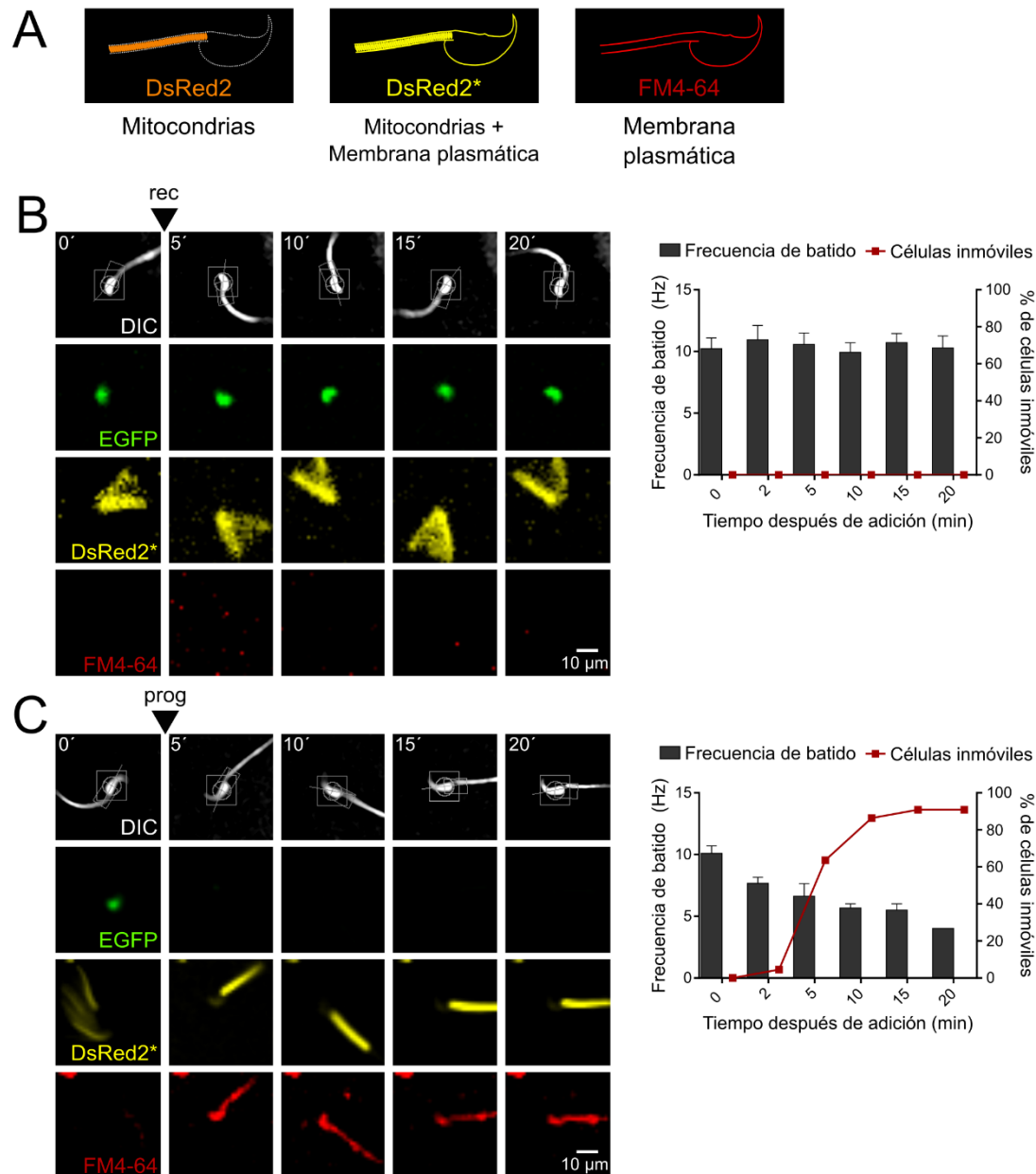


Figura 23. Luego del aumento de la fluorescencia de FM4-64 en la pieza media, se produce una **disminución gradual de la frecuencia del batido flagelar**. Análisis de movilidad para espermatozoides EGFP-DsRed2 teñidos con FM4-64 10 μ M, las células se inmovilizaron en cubreobjetos con laminina. **A)** Esquema para representar notaciones de las sondas. Mediante el filtro U-FGWA excitación 530-550 nm / emisión 575-625 nm (en amarillo) se pudo observar la emisión tanto de DsRed2 como de FM4-64. En cambio, cuando se utilizó el filtro ETCY5 excitación 590-650 nm / emisión 665-735 nm, solo se pudo visualizar la emisión de FM4-64 (en rojo). De esta manera, en las imágenes lo que se observa en color naranja será solo mitocondrias, en color amarillo (con notación DsRed2*) será MP y mitocondrias mientras que en color rojo se mostrará solo MP. **B-C)** Serie de tiempo representativa de espermatozoides EGFP-DsRed2 control sin realizar la EA (**B**, adición de medio de registro, rec) y aquellos en los que la EA fue inducida por progesterona (**C**, prog, 100 μ M). La punta de flecha muestra cuando se realizó la adición. El panel superior muestra imágenes DIC procesadas por un sistema de seguimiento celular para medir la frecuencia del batido flagelar. Además, se muestran las imágenes EGFP, DsRed2* y FM4-64. El gráfico de la izquierda muestra el análisis de frecuencia del batido (eje y derecho, gráfico de barras) para los espermatozoides control (**B**) y cuya EA fue inducida por progesterona (**C**). El porcentaje de células inmóviles se observa en el eje y izquierdo (línea continua). Se muestran imágenes representativas de al menos 5 experimentos independientes, para el grupo control se analizaron 11 células y para el grupo inducido con progesterona se analizaron 22 células.

La EA ocurre concomitantemente con una disminución en el diámetro de la pieza media

Para entender los cambios estructurales que ocurren en la pieza media durante la EA se emplearon técnicas de microscopía de súper-resolución en células vivas. La **Figura 24A** muestra una imagen limitada por difracción de una pieza media teñida con FM4-64 a la izquierda y a la derecha su respectiva reconstrucción de súper-resolución utilizando SRRF (Gustafsson et al., 2016). La dinámica de la EA se controló mediante la fluorescencia de FM4-64 en la cabeza espermática (**Figura 24B**, recuadros superiores derecho) (Romarowski et al., 2016b; Sánchez-Cárdenas et al., 2014a). Tal como evidencia la serie de tiempo representativa en la **Figura 24B** y su posterior cuantificación en la **Figura 24C**, se observó una disminución en el diámetro de la pieza media a lo largo del tiempo luego de la EA espontánea, inducida por progesterona o ionomicina (ionóforo de Ca^{2+}). En el control negativo (sin EA) el diámetro permaneció sin cambios. Este fenómeno también se observó utilizando otra técnica de súper-resolución, MSSR (Torres-García et al., 2022) junto con otras sondas de MP de diferente estructura molecular como Memglow 700 (**Figura 24F**), Bodipy-GM1 (**Figura 24G**) y FM1-43 (**Figura 24H**).

También se evaluó la intensidad de fluorescencia de FM4-64 en la cabeza y en la pieza media (**Figura 24D-E**). Como era de esperar, el aumento de la fluorescencia de FM4-64 en la cabeza se produce con la EA (Romarowski et al., 2016b; Sánchez-Cárdenas et al., 2014a). Además, de acuerdo con lo observado en la **Figura 22**, la intensidad de la fluorescencia en la pieza media también aumentó con el tiempo en los espermatozoides que tuvieron EA mientras que el grupo control sin EA permaneció constante durante todo el experimento (**Figura 24E**).

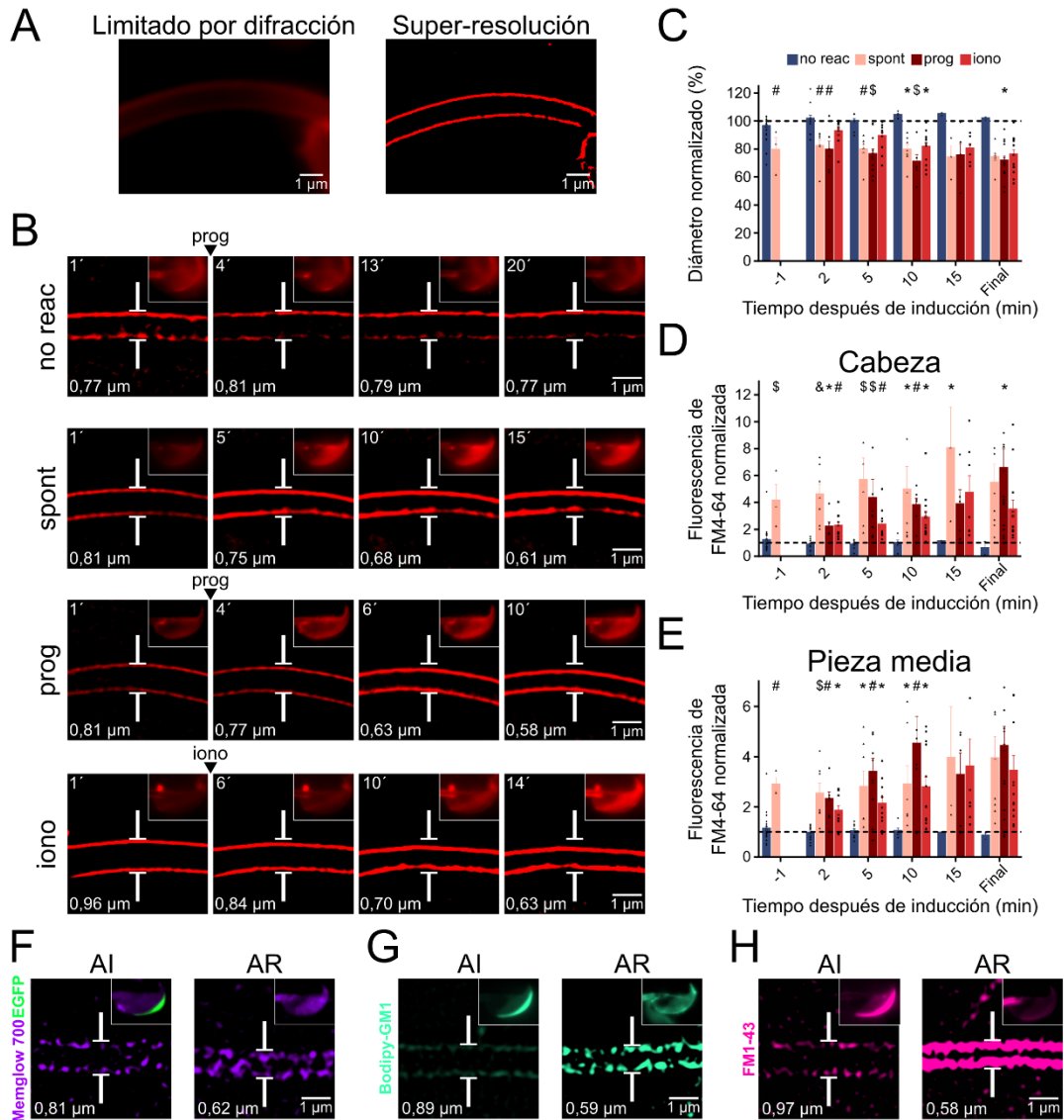


Figura 24. La contracción de la pieza media ocurre durante la EA. Imágenes representativas de espermatozoides CD1 capacitados teñidos con FM4-64 0,5 μ M. **A)** El panel izquierdo muestra una imagen limitada por difracción de la membrana espermática teñida con FM4-64 y el panel derecho muestra su reconstrucción SRRF de súper-resolución. **B)** Serie de tiempo representativa de la pieza media teñida con FM4-64 de un espermatozoide sin EA (no reac), con EA espontánea (spont), o inducida por progesterona (prog, 100 μ M) y por ionomicina (iono, 10 μ M), respectivamente. Después de la adquisición, las imágenes se procesaron utilizando SRRF. La EA se muestra en los recuadros superiores derechos de la cabeza del espermatozoide (imágenes limitadas por difracción). El valor del diámetro de la pieza media se muestra en la esquina inferior izquierda para cada tiempo. **C)** Cuantificación del diámetro de la pieza media para cada grupo experimental a lo largo del tiempo. Los datos se presentan como un porcentaje del valor del diámetro inicial antes de la inducción. **D-E)** Cuantificación de la fluorescencia de FM4-64 en la cabeza y pieza media, respectivamente, para cada grupo experimental a lo largo del tiempo. Los datos se presentan como veces de aumento en comparación con la fluorescencia inicial antes de la inducción de la EA. Para **C-E)**, * $p < 0,05$; # $p < 0,01$; \$ $p < 0,001$ y & $p < 0,0001$ en comparación con el grupo que no reaccionó. Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en combinación con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. **F-H)** Imágenes representativas procesadas por MSSR de espermatozoides EGFP-DsRed2 con acrosoma intacto (AI) y sin acrosoma (AR) teñidos con las sondas de membrana Memglow 700 (**F**, violeta), Bodipy-GM1 (**G**) y FM1-43 (**H**). La EA se muestra en recuadros de la cabeza del espermatozoide (imágenes limitadas por difracción), para **F)** se muestra con EGFP en verde mientras que la membrana se muestra en violeta, para **G)** y **H)**, el acrosoma se ve en el mismo color que la membrana. Se muestran imágenes representativas de al menos 5 experimentos independientes, se analizaron un total de 36 células.

La contracción de la pieza media se inicia preferentemente en la parte proximal del flagelo

Para investigar si la contracción de la pieza media se desencadena en un lugar aleatorio o en una región particular del flagelo, se utilizaron kimogramas. Un kimograma permite la visualización de aspectos dinámicos de un fenómeno dado en una sola imagen, donde la dimensión temporal se expresa como un eje de la imagen, a través de una transformación espacio-temporal del conjunto de datos. Como se mencionó anteriormente en la sección de **Materiales y Métodos**, se utilizaron dos tipos de kimogramas (**Figura 18**). Primero, se construyeron kimogramas de microscopía de súper-resolución para monitorear los cambios dinámicos en el diámetro en determinados lugares de la pieza media (cada 2,5 μm). En segundo lugar, se realizaron kimogramas de fluorescencia a partir de imágenes limitadas por difracción para observar los cambios en la fluorescencia de FM4-64 a lo largo del tiempo y en toda la pieza media. Como ya se mencionó, existe una correlación negativa entre el diámetro de la pieza media y la fluorescencia de FM4-64, lo que revela una herramienta para obtener un valor aproximado del diámetro de la pieza media sin necesidad de recurrir a la microscopía de súper-resolución (**Figura 19**).

Una vez obtenidos los kimogramas de fluorescencia de FM4-64 y su posterior transformación a kimogramas de diámetro aproximado, se pudieron observar diferentes patrones: hubo células que presentaron un foco de aumento de fluorescencia de FM4-64, es decir, un único foco de contracción de la pieza media mientras que otras presentaron más de uno. A su vez, el foco puede suceder tanto en la porción proximal, central o distal de la pieza media tal como fue definido en la **Figura 18 (Figura 25A)**. De esta manera, se evaluaron tres subgrupos experimentales que se sometieron a la EA: espontáneo, inducido con progesterona e inducido con ionomicina. Para examinar la aleatoriedad de la contracción impulsada por el foco, se cuantificó si las células presentaban uno o más focos de contracción y en qué parte de la pieza media se encontraba/n dicho/s foco/s.

La **Figura 25B** muestra un estudio acumulativo, que indica que la contracción se inició preferentemente en la parte proximal de la pieza media, independientemente de que sea EA inducida por progesterona o EA espontánea.

Sin embargo, cuando se utilizó ionomicina como agonista de la EA, la contracción comenzó aleatoriamente en cualquier segmento de la pieza media.

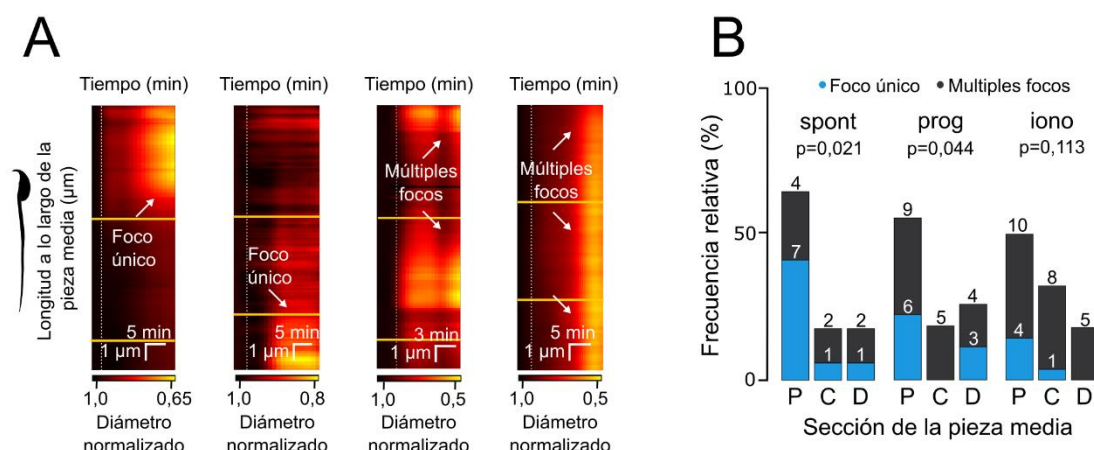


Figura 25. La contracción comienza preferentemente cerca de la unión entre la cabeza y la pieza media. **A)** Ejemplos representativos de kimogramas de contracción para células que presentan un solo foco o más de un foco de contracción. El eje y del kimograma representa la longitud a lo largo de la pieza media con el 0 en la parte superior del kimograma como indica el esquema del espermatozoide (unión de pieza media con cabeza). El eje x del kimograma representa el tiempo con el 0 en la parte izquierda del kimograma. **B)** Gráfico de frecuencia relativa (expresada en porcentaje) que muestra la distribución del inicio del foco de contracción. El eje x muestra la sección de la pieza media donde ocurrió el foco: proximal (P), central (C) y distal (D) y el código de colores representa si la célula presenta uno o más de un foco de contracción. Las células reaccionaron espontáneamente (spont), o fueron estimuladas con progesterona 100 μm (prog) o ionomicina 10 μm (iono). Se realizó una prueba de χ^2 utilizando el entorno de lenguaje R. Se muestran los datos de al menos 5 experimentos independientes y se analizaron un total de 36 células.

La **Figura 26A-B** ilustra ejemplos representativos de espermatozoides inducidos con ionomicina que presentan uno o más focos de contracción de la pieza media, respectivamente. En ambos casos, el diámetro disminuyó a lo largo de la pieza media, lo que se ve como una transición de colores rojo oscuro a amarillo brillante (escala en la parte inferior del kimograma). Esto se puede observar tanto en el kimograma de diámetro normalizado (**Figura 26A-B**, panel izquierdo) como en las medidas reales del diámetro obtenidas por los kimogramas de súper-resolución (**Figura 26A-B**, panel derecho).

En el caso del foco único, se puede observar en el kimograma de diámetro normalizado que ronda entre las medidas de 7,5 y 10 μm. Esto se ve reflejado en el panel derecho en los puntos celestes y naranjas, que son las medidas de diámetro reales que se contrajeron primero y en mayor medida (**Figura 26A**). Un comportamiento representativo dentro de este grupo experimental es el representado en la **Figura 26B**, en donde se observa que toda la pieza media

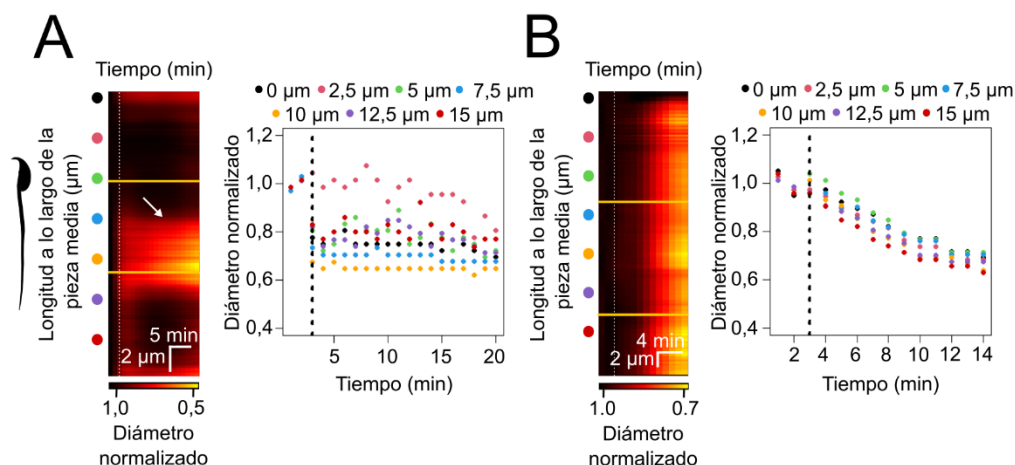


Figura 26. Ejemplos representativos de la relación entre el kimograma de diámetro normalizado y las medidas reales del diámetro para células inducidas con ionomicina. A-B) Kimograma de diámetro normalizado (panel izquierdo, ver **Materiales y Métodos**) y medidas de contracción (panel derecho, obtenidos por el entorno de lenguaje R utilizando kimogramas de súper-resolución) para la EA inducida por ionomicina (10 μM) con uno (A) o múltiples focos (B) de contracción de la pieza media. En los kimogramas de diámetro normalizado, las líneas amarillas horizontales indican la separación entre las secciones de la pieza media (proximal, central y distal) y los círculos de color indican dónde se realizaron los kimogramas de súper-resolución. El eje y del kimograma representa la longitud a lo largo de la pieza media con el 0 en la parte superior del kimograma como indica el esquema del espermatozoide (unión de pieza media con cabeza). El eje x del kimograma representa el tiempo con el 0 en la parte izquierda del kimograma. En ambos gráficos, la línea vertical punteada indica dónde se realizó la inducción. Se muestran datos representativos de al menos 5 experimentos independientes y se analizaron un total de 10 células.

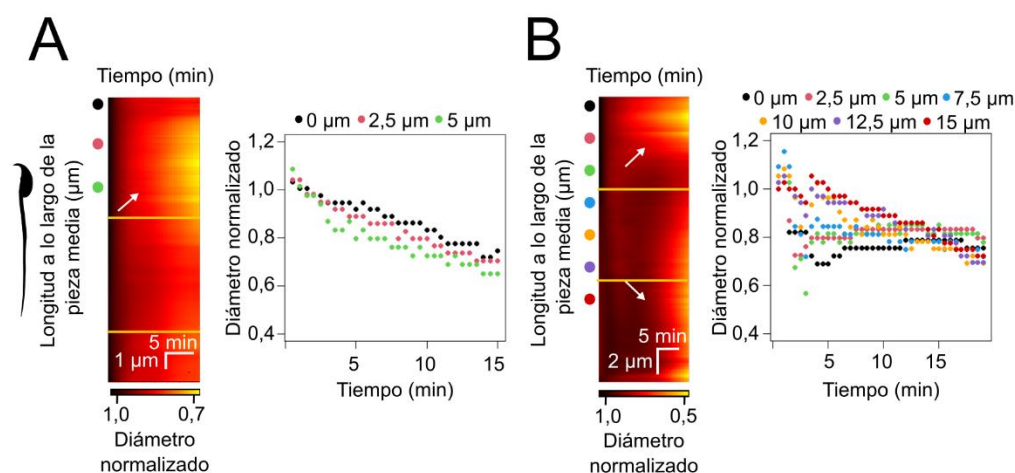


Figura 27. Ejemplos representativos de la relación entre el kimograma de diámetro normalizado y las medidas reales del diámetro para células que experimentaron la EA espontáneamente. A-B) Kimograma de diámetro normalizado (panel izquierdo, ver **Materiales y Métodos**) y medidas de contracción (panel derecho, obtenidos por el entorno de lenguaje R utilizando kimogramas de súper-resolución) para células con EA espontánea con uno (A) o múltiples focos (B) de contracción de la pieza media. En los kimogramas de diámetro normalizado, las líneas amarillas horizontales indican la separación entre las secciones de la pieza media (proximal, central y distal) y los círculos de color indican dónde se realizaron los kimogramas de súper-resolución. El eje y del kimograma representa la longitud a lo largo de la pieza media con el 0 en la parte superior del kimograma como indica el esquema del espermatozoide (unión de pieza media con cabeza). El eje x del kimograma representa el tiempo con el 0 en la parte izquierda del kimograma. Se muestran datos representativos de al menos 5 experimentos independientes y se analizaron un total de 10 células.

aumentó la contracción (todas sus secciones en simultáneo). Esto se observa en la escala de colores del kimograma de diámetro normalizado y coincide con las medidas reales del diámetro del panel derecho, las cuales, todas juntas (de 0 μm a 15 μm) disminuyeron su valor.

Por último, la Figura **27A-B** evidencia ejemplos de EA espontánea con uno o dos focos de contracción, respectivamente. En particular, en la **Figura 27B**, se puede destacar que hay un primer foco de contracción de 0 μm a 5 μm aproximadamente que coincidió con las medidas del diámetro reales del panel derecho que disminuyeron su valor primero y en mayor medida (puntos negros, rosas y verdes). Si bien toda la pieza media se contrajo a medida que pasa el tiempo, aparece un segundo foco de contracción alrededor de las medidas de 10 μm a 15 μm y coincidentemente son los puntos que disminuyeron el diámetro en mayor medida (puntos naranjas, violetas y rojos).

Una pregunta lógica que emerge después de reportar la contracción de la pieza media es ¿cómo la célula regula el volumen citoplasmático luego o durante la contracción inducida por la EA? Si bien hace falta llevar a cabo más

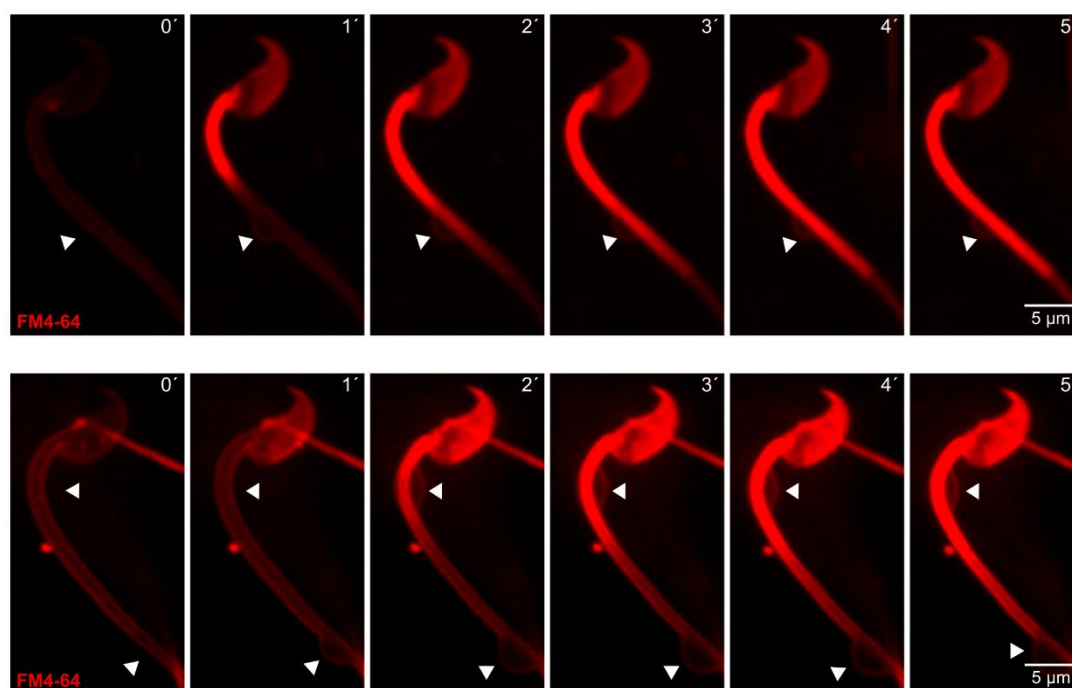


Figura 28. La contracción fue acompañada de una dinámica gotas citoplasmáticas. Series de tiempo representativas de células con EA espontánea que muestran como a medida que aumenta la fluorescencia de FM4-64 y se contrae la pieza media, aparecen gotas citoplasmáticas (puntas de flecha). Se muestran imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes.

experimentos, por ejemplo utilizando sondas como calceína que permiten evaluar el volumen celular (Davidson y Higgins, 2013), una posible explicación se ilustra en la **Figura 28**. En esta figura se exponen dos ejemplos de células con EA espontánea teñidas con FM4-64. En ambos casos se observa que a medida que ocurrió la contracción de la pieza media (evidente por el aumento de la fluorescencia de FM4-64), aparecieron gotas citoplasmáticas. Como se mencionó anteriormente, si bien hacen falta más experimentos, el hecho de que se generen gotas citoplasmáticas mientras la pieza media se contrae podría sugerir un posible mecanismo de regulación de volumen sin alterar el volumen total de la célula.

Por otro lado, si bien excede el objetivo de esta tesis, otra pregunta válida es ¿qué sucede con el resto del flagelo? La **Figura 29** muestra un resultado

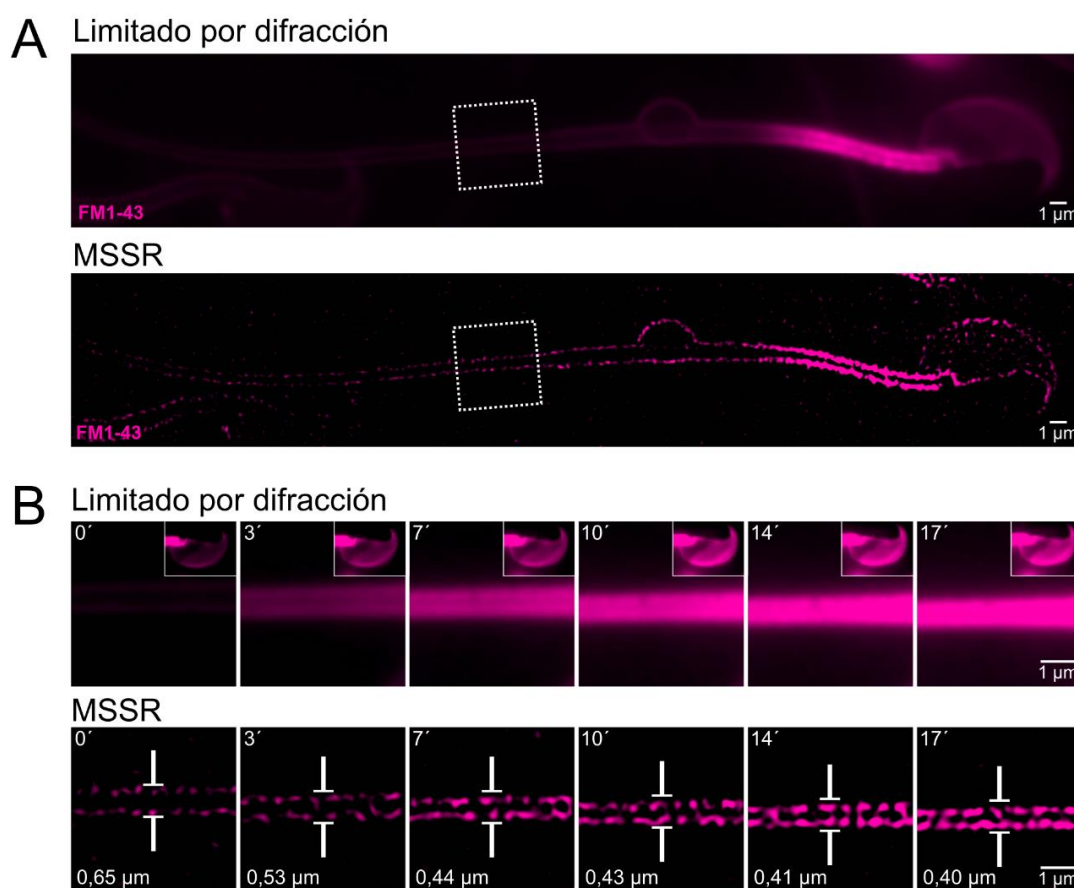


Figura 29. La contracción del flagelo también se observa en la pieza principal. A) Imagen de un espermatozoide CD1 capacitado teñido con FM1-43 1 μM en proceso de EA. Se muestra la imagen limitada por difracción (arriba) y su respectiva reconstrucción de súper-resolución por MSSR (abajo). **B)** Serie de tiempo de la pieza principal ampliada delimitada en líneas punteadas en **A)**. El panel superior muestra cómo fue aumentando la fluorescencia de FM1-43, la EA se muestra en los recuadros superiores derechos de la cabeza del espermatozoide. El panel inferior muestra como aumentó lo contracción de dicho segmento a medida que progresó la EA. Se muestran imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes.

preliminar de los cambios que experimenta la pieza principal durante la EA. En este caso, se trata de una célula teñida con FM1-43 y en proceso de EA espontánea (evidenciado por el patrón de FM1-43 en la cabeza y el inicio de contracción de la pieza media). Se muestran tanto las imágenes limitadas por difracción como la reconstrucción de súper-resolución utilizando MSSR. Tal como detalla la **Figura 29B**, a medida que avanza la EA se observó un aumento de fluorescencia de FM1-43 coincidente con una contracción de la pieza principal. Este comportamiento es similar al observado en la pieza media, sin embargo, quedan pendientes experimentos adicionales para determinar si existe relación o no entre el aumento de la fluorescencia de FM1-43 y la disminución del diámetro en la pieza principal.

La reducción del diámetro de la pieza media se produce concomitantemente con un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el flagelo

Es ampliamente aceptado que un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza espermática precede a la EA. Se ha demostrado que el inicio de la EA se produce tras un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza del espermatozoide que luego se propaga hacia la pieza media (Romarowski et al., 2016b). Para comprender la conexión entre la EA y la contracción concomitante de la pieza media, planteamos la hipótesis de la existencia de una señal de Ca^{2+} que se propaga desde la cabeza hasta el flagelo o viceversa y que impulsa cambios en la arquitectura del flagelo espermático.

Para investigar si el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la pieza media se correlaciona con la contracción de la pieza media, se incubaron espermatozoides con FM4-64 y Fluo4, un sensor fluorescente de Ca^{2+} . La **Figura 30** muestra series de tiempo representativas de espermatozoides que: no realizaron EA (**Figura 30A-B**, caso de control, adición de medio de registro), y que experimentaron EA inducida por progesterona (**Figura 30C-D**) o por ionomicina (**Figura 30E-F**). En la **Figura 30A** se observa que cuando las células no experimentaron la EA, no presentaron un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, tras la inducción de la EA con progesterona o ionomicina (**Figura 30C y 30E**), hubo un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la pieza media seguido de un aumento en la fluorescencia de FM4-64, lo que indica una contracción del flagelo (**Figura 19**).

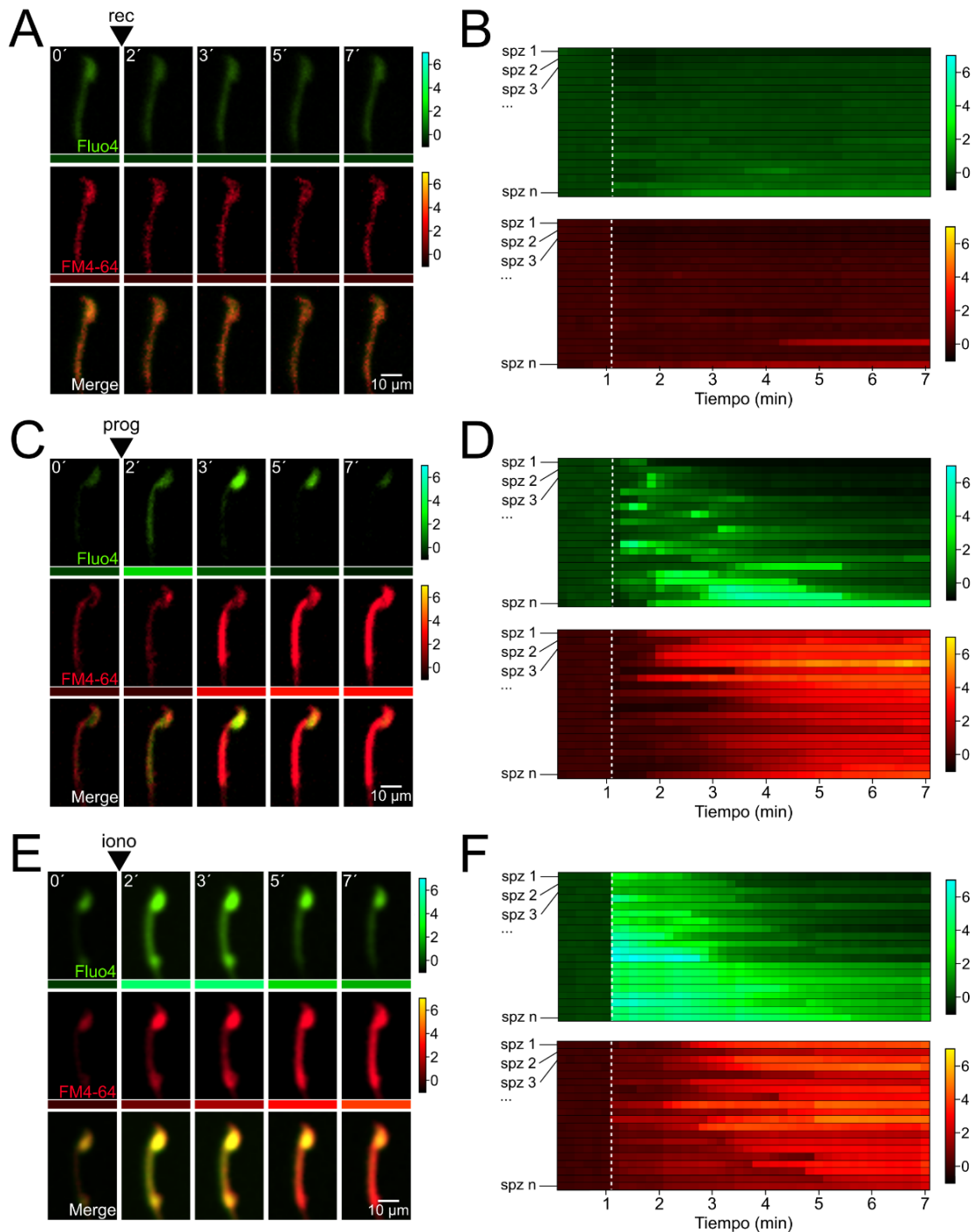


Figura 30. La contracción de la pieza media es impulsada por cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. A, C, E) Se muestran series de tiempo representativas de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ y la EA. Los espermatozoides F1 capacitados se cargaron con la sonda Fluo4, se inmovilizaron en cubreobjetos recubiertos con concanavalina A y se incubaron en un medio de registro (rec) que contenía FM4-64 10 μ M. Se adicionó rec (A), progesterona 100 μ M (prog, C) e ionomicina 10 μ M (iono, E) donde indica la punta de flecha. Debajo de cada *frame* de Fluo4 (se muestra en verde) y FM4-64 (se muestra en rojo) hay un rectángulo con un código de color que indica la intensidad normalizada de la señal de fluorescencia (obtenida por la formula $(F-F_0)/F_0$, barra de escala a la derecha del panel). B, D, F) Análisis para la adición de rec (B), prog (D) e iono (F). Cada fila muestra la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ (superior, en verde) y de la MP (inferior, en rojo) de un solo espermatozoide (spz) a lo largo del tiempo (eje x). Se muestran los datos de la fluorescencia de toda la pieza media normalizada a los *frames* previos a la inducción. La línea punteada blanca indica cuándo se realizó la adición. Se muestran imágenes representativas de al menos 5 experimentos independientes. Se analizaron 20 células por grupo experimental para el análisis de B), D), F).

A continuación, se analizó un número mayor de espermatozoides utilizando una menor magnificación (10X). Las **Figuras 30B, 30D y 30F** detallan un análisis donde cada fila representa los cambios de una sola célula a lo largo del tiempo. Específicamente, se evaluó en la pieza media la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción a juzgar por la fluorescencia de Fluo4 (verde) y FM4-64 (rojo), respectivamente. Los casos no estimulados se muestran en la **Figura 30B**, los espermatozoides que estuvieron expuestos a la progesterona se muestran en la **Figura 30D** y los inducidos con ionomicina en la **Figura 30F**. En el caso de la inducción con progesterona, la mayoría de las células mostraron un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ seguido de un aumento en la fluorescencia de FM4-64. Este patrón también se observó en las células inducidas por ionomicina (**Figura 30F**) con la excepción de que, como era esperable, el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ fue más rápido y sostenido. Estos hallazgos confirman que un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en la pieza media precede a la contracción del flagelo.

A continuación, se evaluó la relación entre el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ observado y la contracción del flagelo utilizando imágenes de súper-resolución de células vivas. La **Figura 31A** muestra que un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la pieza media coincidió en espacio y tiempo con una contracción de la pieza media. Para proporcionar información sobre la relación espacio-temporal del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción de la pieza media, estos mismos resultados se visualizaron utilizando un kimograma 3D que abarca la dinámica que ocurre a lo largo de toda la pieza media (**Figura 31B**). En particular, se observó un aumento focal transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en la base del flagelo, que se correlaciona en el espacio y el tiempo con una reducción focal del diámetro del flagelo (**Figura 31B**).

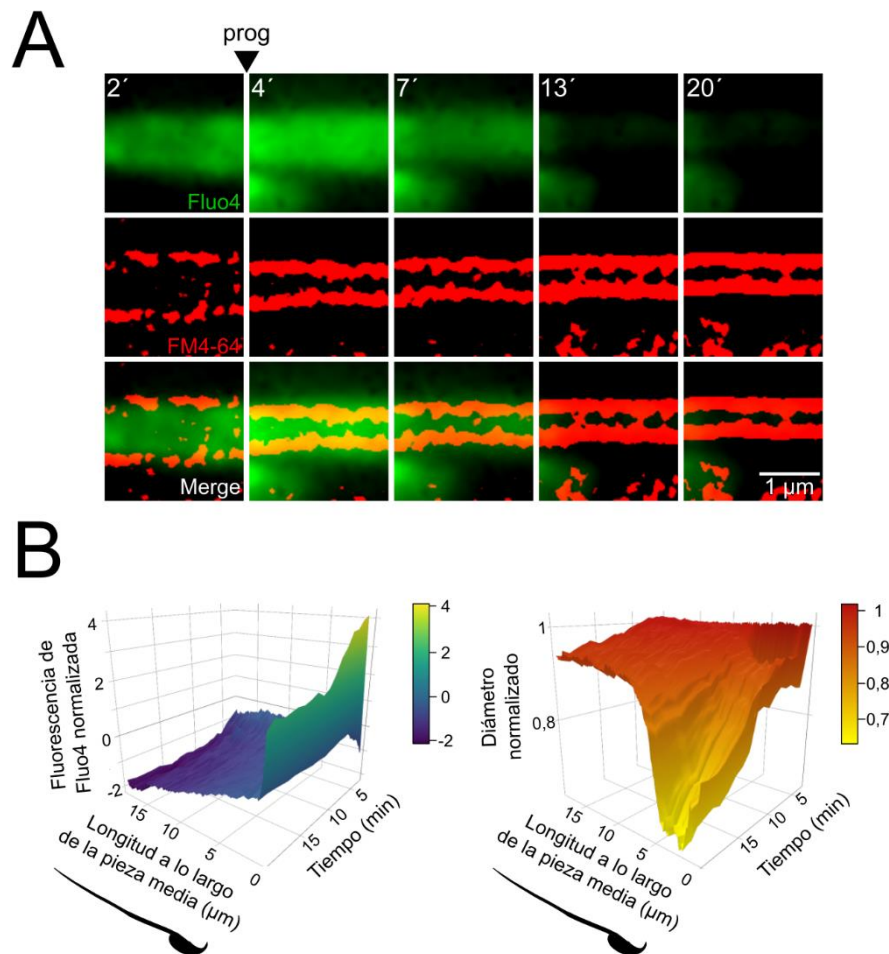


Figura 31. La contracción de la pieza media es impulsada por cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. **A)** Se muestra una serie de tiempo representativas de la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y contracción de la pieza media. Los espermatozoides CD1 capacitados se cargaron con Fluo4, se inmovilizaron en cubreobjetos recubiertos con concanavalina A y se incubaron en un medio de registro que contenía FM4-64 0,5 μM . La EA se indujo con progesterona 100 μM (prog, punta de flecha). Las imágenes de FM4-64 se procesaron con SRRF, mientras que Fluo4 se muestra mediante imágenes limitadas por difracción. **B)** Kimogramas 3D de la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (izquierda) y la contracción de la pieza media (derecha). Los datos se presentan normalizados a la media de los frames antes de la inducción de la EA. Se muestran imágenes representativas de al menos 5 experimentos independientes.

El citoesqueleto de actina se aproxima a la MP durante la contracción de la pieza media

La pieza media está conformada por dos grandes elementos estructurales: el axonema, constituido por tubulina con sus componentes accesorios y una red recientemente descrita de actina-F dispuesta en una conformación helicoidal (**Figura 6**) (Gervasi et al., 2018). Se examinó si la red de actina tiene un papel en la regulación de la contracción de la pieza media asociada a la EA.

El papel del citoesqueleto de actina se investigó a través de imágenes de súper-resolución de células vivas utilizando la sonda SiR-actin, que emite fluorescencia cuando se une a la actina-F (Lukinavičius et al., 2014; Magliocca et al., 2017; Yamazaki et al., 2018). La **Figura 32A-B** muestra dos espermatozoides estimulados que experimentaron la EA (**Figura 32B**) o no (**Figura 32A**). En ambos casos, se observó la red de actina-F debajo de la MP de la pieza media (actina cortical). Como era de esperar, en ausencia de la EA, el diámetro de la pieza media (observado a través de FM4-64) se mantuvo inalterado (**Figura 32A**). En cambio, el espermatozoide que realizó la EA (**Figura 32B**), además de presentar la contracción previamente descrita, experimentó una reorganización estructural que se caracterizó por una reducción en la distancia entre la MP y la red de actina-F en la pieza media. La última observación sugiere que la remodelación de la estructura de la pieza media podría ser impulsada por una interacción mecánica (o molecular) que ocurre en los límites de la MP.

Para evaluar si la red de actina-F podría interactuar potencialmente con la MP (o sus componentes asociados), se evaluó la colocalización entre la MP y la doble hélice de actina-F utilizando imágenes de súper-resolución de células vivas. La **Figura 32C** muestra dos coeficientes de colocalización de Manders (Dunn et al., 2011). M1 es una medida de la proporción de actina-F (en píxeles) que se colocaliza con la MP, M2 es una medida de la proporción de píxeles de MP que se colocaliza con los correspondientes a la red de actina-F. Un valor de Manders de 1 es indicativo de colocalización completa, mientras que 0 puede interpretarse como falta de colocalización. En este análisis, se estudiaron dichos coeficientes al principio de la toma de imágenes (AI, cuando las células tienen el acrosoma intacto) y los coeficientes de las mismas células al finalizar la toma de imágenes (AR, cuando las células perdieron el acrosoma). La **Figura 32C** muestra que los espermatozoides con acrosoma intacto presentaron coeficientes de Manders bajos ($M1 = 0,32 \pm 0,03$; $M2 = 0,28 \pm 0,04$). Por el contrario, una vez que los espermatozoides realizaron la EA mostraron un aumento significativo en la colocalización entre la red de actina-F y la MP, a juzgar por un aumento en los coeficientes M1 y M2 ($M1 = 0,65 \pm 0,03$; $M2 = 0,69 \pm 0,03$), que ocurrió concomitantemente con la contracción de la pieza media.

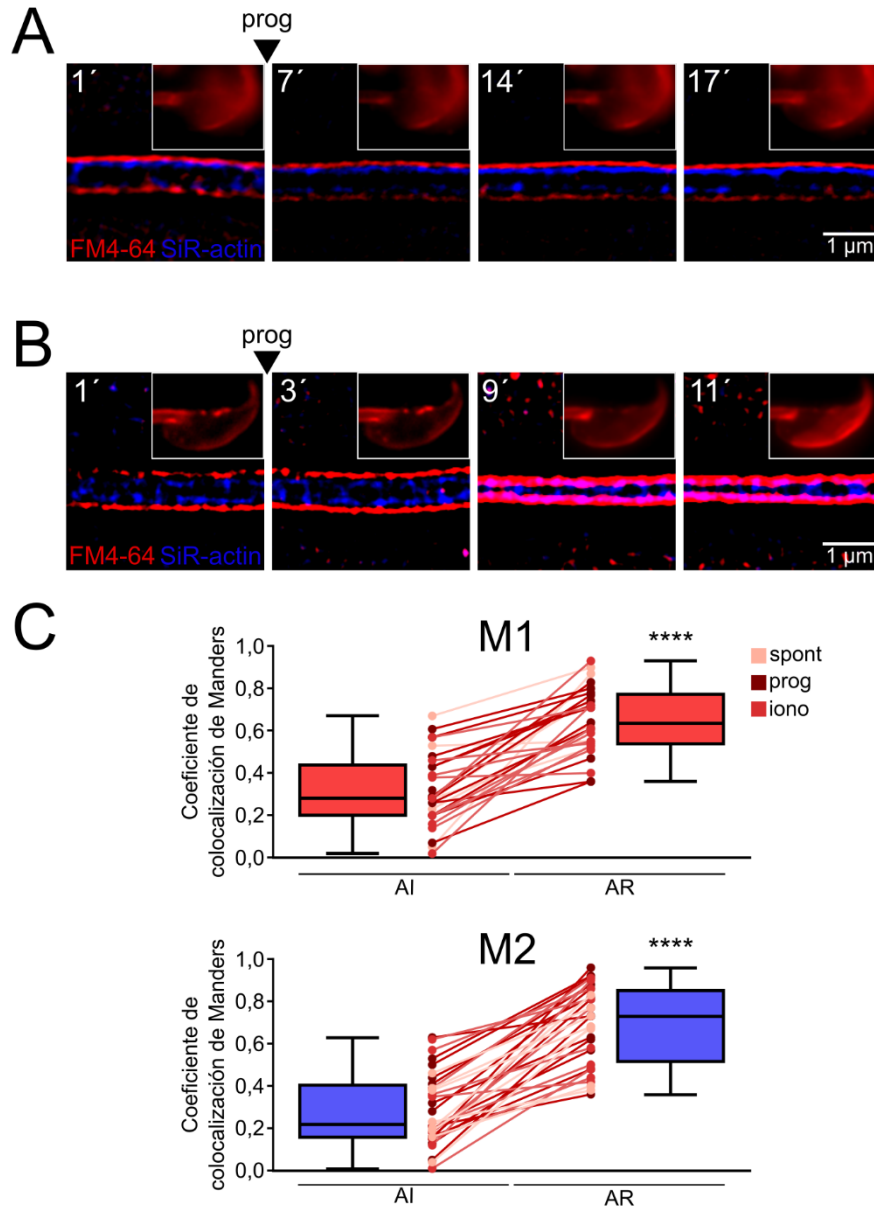


Figura 32. La MP de la pieza media se aproxima al citoesqueleto de actina durante la contracción y la EA. A-B) Serie de tiempo representativa de la colocalización entre la MP y el citoesqueleto de actina cuando no hay EA (**A**) y cuando hay EA inducida por progesterona (**B**, prog, 100 µM). FM4-64 se muestra en rojo y SiR-actin en azul. Los espermatozoides CD1 capacitados se cargaron con SiR-actin 100 nM, se inmovilizaron en cubreobjetos recubiertos con concanavalina A y se incubaron en un medio de registro que contenía FM4-64 0,5 µM y SiR-actin 100 nM. **C)** Coeficientes de colocación de Manders para células con acrosoma intacto (AI) y con acrosoma reaccionado (AR). M1 se asignó arbitrariamente a FM4-64 y M2 a SiR-actin. Se muestran las medidas para las células que reaccionaron espontáneamente (spont), y aquellas inducidas con progesterona 100 µM (prog) y por ionomicina 10 µM (iono). Los datos se presentan como la media ± SEM. Se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon, ****p<0,0001. Se muestran los datos de al menos 5 experimentos independientes y se analizaron un total de 36 células.

En microscopía de fluorescencia, la colocalización es indicativa de la presencia mutua de dos poblaciones de moléculas dentro de un volumen de observación formado por la función punto extendido (PSF), es decir, con una resolución de 250-350 nm (Alva et al., 2022). La microscopía de súper-resolución reduce la incertidumbre de los estudios de colocalización; sin embargo, la ganancia exacta de resolución varía según las propiedades ópticas del instrumento utilizado para obtener la imagen, las propiedades ópticas de la muestra, los protocolos de preparación, y las propiedades fotofísicas de las sondas fluorescentes. Como en este caso utilizamos el algoritmo SRRF, si hay colocalización, se puede interpretar como que la MP y la red de actina-F están a una distancia menor que el límite de resolución de la técnica, que es alrededor de 80-50 nm.

En general, estos resultados confirman que (i) la contracción de la pieza media está relacionada con la remodelación de la MP y, potencialmente, del citoesqueleto de actina-F, y que (ii) ambas estructuras interactúan entre sí, directa o indirectamente. A continuación, buscamos entender si la fuerza motriz para la contracción de la pieza media surge de la red de actina-F. Se contemplaron los siguientes escenarios: (a) la MP se mueve hacia el citoesqueleto de actina, (b) el citoesqueleto de actina se mueve hacia la MP, o (c) ambas estructuras se acercan al centro del flagelo. Para investigar la ocurrencia de cualquiera de estos escenarios, se rastrearon las posiciones de los máximos de fluorescencia de FM4-64 y SiR-actin en los kimogramas de súper-resolución (**Figura 20**), para ver la localización de la MP o del citoesqueleto de actina, respectivamente (**Figura 33A-B**). La **Figura 33C** muestra histogramas representativos de SiR-actin y FM4-64 a lo largo del tiempo. Como se puede observar, los picos de fluorescencia de FM4-64 y SiR-actin se acercaron entre sí a medida que pasa el tiempo. Este efecto también se puede ver en la **Figura 33F**, donde las células con acrosoma intacto muestran una distancia de $0,180 \pm 0,007 \mu\text{m}$ entre la MP y el citoesqueleto de actina y las mismas células luego de perder el acrosoma presentaron una distancia significativamente menor ($0,074 \pm 0,006 \mu\text{m}$) después de la contracción de la pieza media.

En la **Figura 33D**, se muestran los máximos de fluorescencia de una sección de la pieza media de un espermatozoide que experimentó la EA inducida por

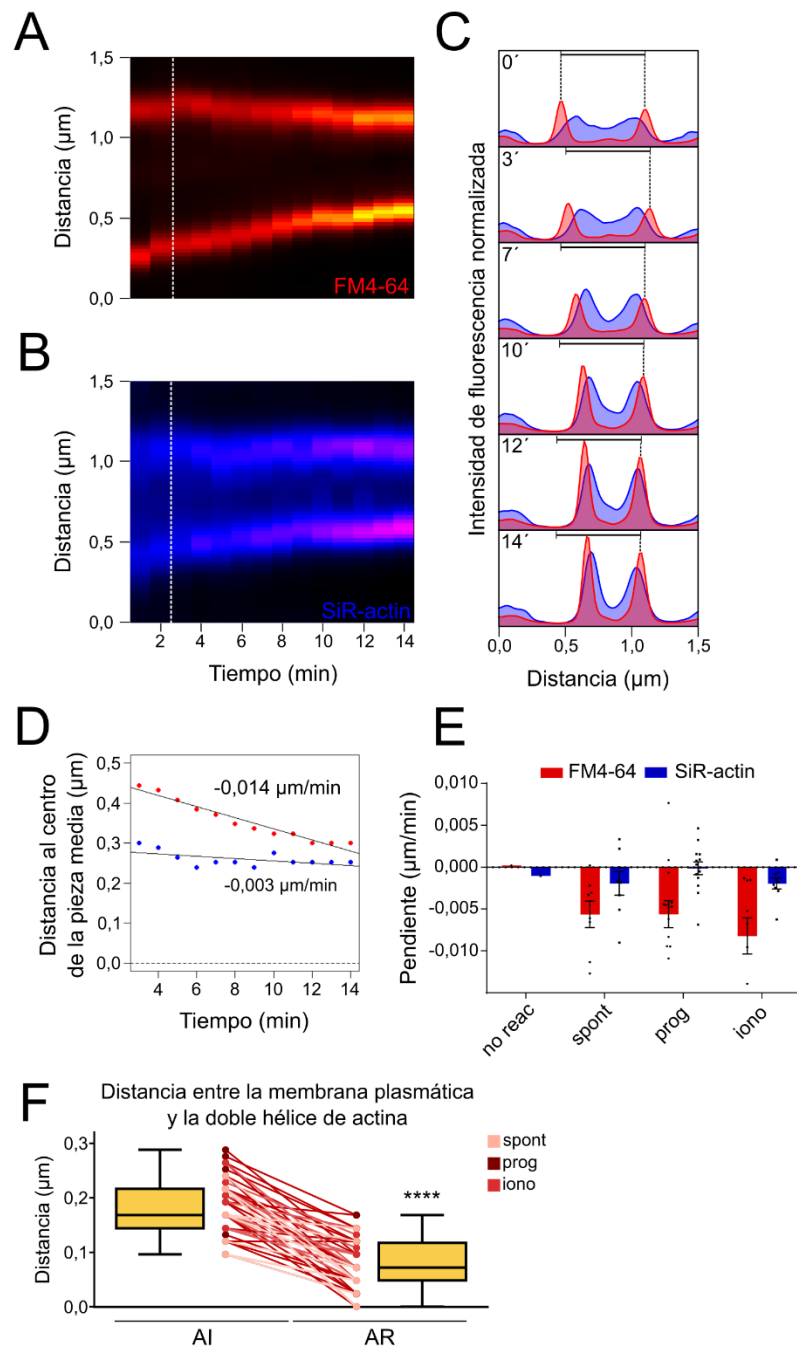


Figura 33. La MP se aproxima al citoesqueleto de actina durante la contracción de la pieza media. **A-B)** Kimograma de súper-resolución para FM4-64 (superior, rojo) y SiR-actin (inferior, azul). La línea blanca punteada indica en qué momento se realizó la inducción con ionomicina 10 μ M. **C)** Histogramas de fluorescencia normalizada de FM4-64 (rojo) y SiR-actina (azul) a lo largo del tiempo. La barra negra horizontal muestra la distancia inicial entre los picos de FM4-64. **D)** Cambios en la posición de los picos de fluorescencia a lo largo del tiempo. Los picos de fluorescencia de FM4-64 se muestran en rojo y los de SiR-actin en azul. Los números cerca de las rectas representan la pendiente. **E)** Valores de pendientes para FM4-64 y SiR-actin para el grupo control sin reacción (no reac), y con EA espontánea (spont), inducida por progesterona (prog) e inducida por ionomicina (iono). Se realizó un ANOVA en combinación con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. **F)** Análisis de la distancia entre la MP y la doble hélice de actina-F en la pieza media para espermatozoides con acrosoma intacto (AI) y reaccionado (AR). Se muestran las medidas para las células que reaccionan espontáneamente (spont), y aquellas que lo hacen como resultado de la inducción con progesterona 100 μ M (prog) y ionomicina 10 μ M (iono). Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. Se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon, **** $p < 0,0001$. Se muestran los datos de al menos 5 experimentos independientes y se analizaron un total de 36 células.

ionomicina. En este caso, la MP y el citoesqueleto de actina se aproximaron al centro de la célula (normalizado a 0). La pendiente calculada a partir del ajuste lineal denota la velocidad de este cambio. En este ejemplo, la MP se contrajo a una velocidad de 14 $\mu\text{m}/\text{min}$, mientras que el citoesqueleto de actina se contrajo a una velocidad de 3 $\mu\text{m}/\text{min}$ (**Figura 33D**). De esta manera, se analizaron las pendientes de los grupos experimentales que no realizaron la EA, y aquellos que sí experimentaron la EA espontáneamente, o como resultado de la inducción con progesterona o ionomicina (**Figura 33E**). En los casos en que hubo EA, la pendiente de FM4-64 fue negativa lo que es consistente con una disminución en el diámetro de la pieza media. Dado que los resultados del análisis de las pendientes de SiR-actin no fueron concluyentes, decidimos estudiar la estructura del citoesqueleto de actina con más resolución.

El citoesqueleto de actina en la pieza media se remodela durante la EA

Para investigar si la contracción de la pieza media se encuentra asociada con modificaciones estructurales de la doble hélice de actina, se utilizó la técnica de súper-resolución STORM 3D (**Figura 17**). Las células fueron expuestas a progesterona, fijadas y teñidas conjuntamente con PNA y *phalloidin*, para visualizar el estado acrosomal y la estructura de actina, respectivamente.

Las **Figuras 34A y 34C** muestran imágenes representativas de ambas sondas para espermatozoides con acrosoma intacto (AI) y sin acrosoma (AR). Las imágenes de PNA solo se utilizaron para ver el estado acrosomal mientras que de las imágenes de *phalloidin* se calcularon diferentes parámetros: 1) Paso helicoidal (l , *helical pitch*), que es la distancia entre vueltas de la hélice; 2) Frecuencia del paso helicoidal ($f_0 = 1/l$), que representa el número de vueltas que da la hélice en 1 μm ; y 3) Distribución radial (R), que es la distancia entre el centro de la pieza media y el máximo de fluorescencia (**Figuras 34B, 34D y 34E**) (Gervasi et al., 2018). En primer lugar, si comparamos las células que realizaron la EA con las que tienen el acrosoma intacto, las primeras presentaron un paso helicoidal menor (159 nm frente a 248 nm, **Figuras 34B y 34D**, panel izquierdo) y una frecuencia de paso helicoidal mayor en comparación con los espermatozoides intactos (6,29 frente a 4,04 μm^{-1} , **Figuras 34B y 34D**, panel

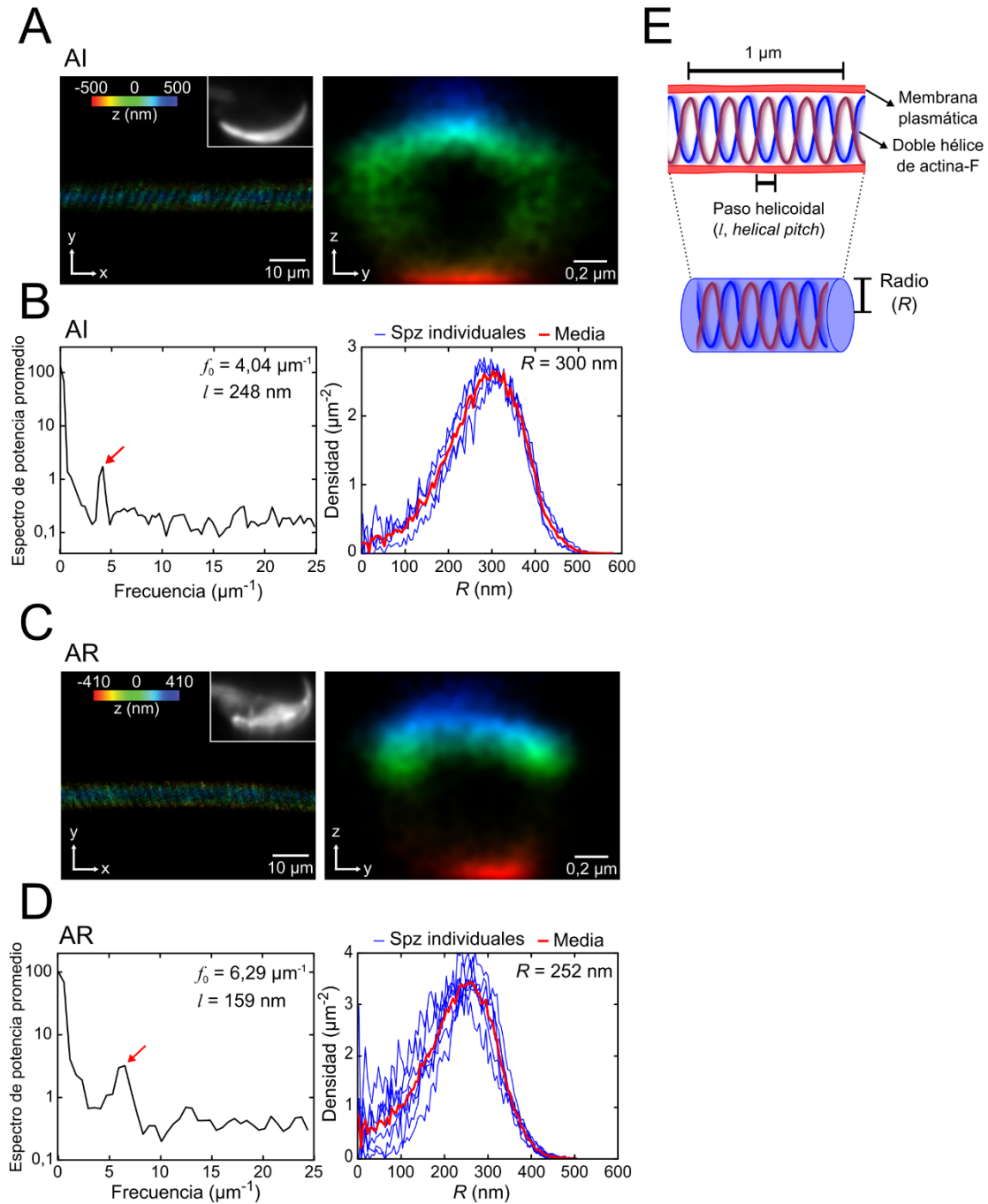


Figura 34. La doble hélice de actina-F en la pieza media se remodela durante la EA. **A, C)** Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con el marcador acrosomal PNA (panel izquierdo, recuadros de arriba a la derecha, limitado por difracción) y *phalloidin* (filamentos de actina, STORM) para células con acrosoma intacto (**A**, AI) y acrosoma reaccionado (**C**, AR). El panel izquierdo muestra una sección longitudinal de la pieza media mientras que el panel derecho muestra un corte transversal. **B, D)** Esquema de los parámetros de la doble hélice de actina analizados: paso helicoidal o *helical pitch* (l , distancia entre vueltas de la hélice, panel izquierdo), frecuencia de paso helicoidal (f_0 , número de vueltas que da la hélice en 1 μm , flecha roja del panel izquierdo) y distribución radial (R , radio de la doble hélice, panel derecho). En el panel derecho, las líneas azules son las distribuciones radiales de las células individuales y la línea roja es su promedio. **E)** Esquema ilustrativo de los parámetros analizados en **B)** y **D)**. Se muestran imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. Se analizaron 4 células para AI y 7 células para AR.

izquierdo). Asimismo, la distribución radial de la actina-F en las células que experimentaron la EA fue menor en comparación con los espermatozoides con acrosoma intacto (252 frente a 300 nm, **Figuras 34B y 34D**, panel derecho). En su conjunto, estos resultados confirman que la doble hélice de actina-F presentó cambios estructurales tras la contracción de la pieza media.

La mayoría de los espermatozoides localizados en el espacio perivitelino muestran una contracción de la pieza media

Observaciones previas demostraron que los espermatozoides murinos que experimentan la EA antes de unirse a la ZP pueden penetrar y fecundar (Jin et al., 2011). Como se requiere la movilidad de los espermatozoides para la penetración de la ZP, planteamos la hipótesis de que los cambios en la pieza media y el cese de la movilidad ocurren solo después de que los espermatozoides que perdieron el acrosoma penetren la ZP.

Para probar esta hipótesis, se realizó *live imaging* luego de experimentos de FIV usando espermatozoides EGFP-DsRed2 teñidos con FM4-64 (**Figura 35**). Los ovocitos se inseminaron con una gran cantidad de células (200.000) para promover la penetración de la ZP por muchos espermatozoides, es decir, polispermia. Esto nos permitió evaluar una mayor cantidad de células en cada experimento, así como visualizar a los espermatozoides en el espacio perivitelino, para poder analizar el estado de la pieza media una vez atravesada la ZP. Pasadas las 4 horas de co-incubación de los espermatozoides con los ovocitos, se realizó una tinción con el colorante nuclear Hoechst 33342 y con FM4-64 para observar los núcleos y la contracción de la pieza media, respectivamente. La **Figura 35A** muestra un ejemplo de un espermatozoide de acrosoma intacto (que contiene la señal de EGFP) unido a la ZP. Esta célula mostró una baja fluorescencia de FM4-64 en la pieza media. Como era de esperar, observamos que todos los espermatozoides que atravesaron la ZP perdieron el acrosoma (sin fluorescencia de EGFP). Sorprendentemente, la mayoría de estas células mostró una alta fluorescencia de FM4-64 (**Figura 35B**), es decir presentaron contracción en la pieza media. Asimismo, en algunos

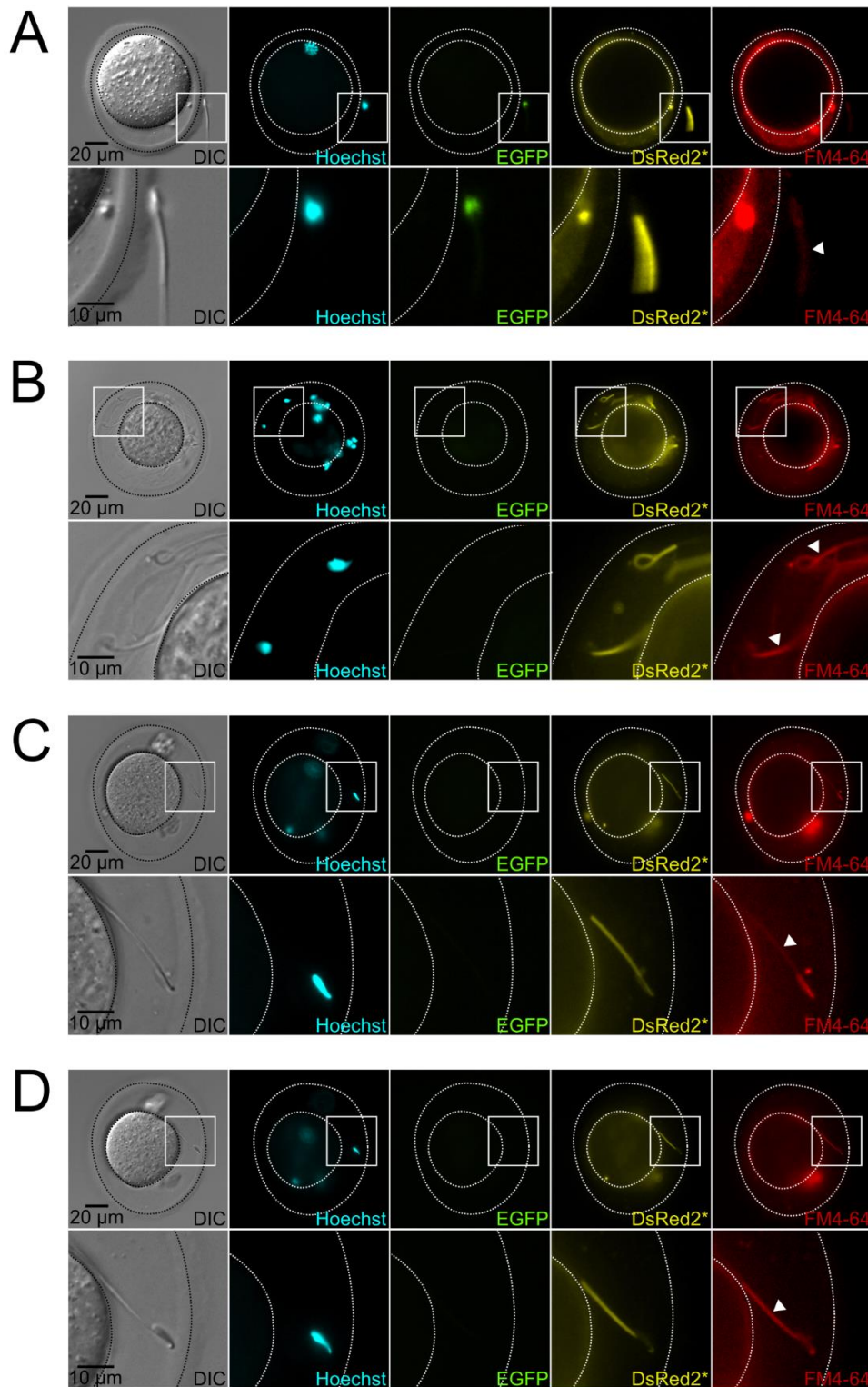


Figura 35. Luego de atravesar la ZP, los espermatozoides muestran una contracción de la pieza media. Imágenes representativas de experimentos de FIV con espermatozoides EGFP-DsRed2. Los complejos de ovocitos-espermatozoides se tiñeron con Hoechst 33342 10 $\mu\text{g/ml}$ y FM4-64 10 μM . Se muestran imágenes de DIC, Hoechst 33342, EGFP, DsRed2* y FM4-64 para: **A)** espermatozoides adheridos a la ZP con acrosoma intacto y pieza media no contraída; **B)** espermatozoides que pasaron a través de la ZP, que perdieron el acrosoma y su pieza media se contrajo y **C)** espermatozoides que atravesaron la ZP, que perdieron el acrosoma e inicialmente la pieza media no se contrajo pero **D)** luego de 20 min mostraron una contracción de la pieza media. El área delimitada en el panel superior se muestra con mayor aumento en el panel inferior. Se muestran imágenes representativas de al menos 6 experimentos independientes.

experimentos, se observaron espermatozoides que perdieron el acrosoma y sus flagelos presentaban movilidad dentro del espacio perivitelino con bajos niveles de fluorescencia de FM4-64 (**Figura 35C**). Luego de 20 minutos, estos espermatozoides dejaron de moverse y aumentaron la fluorescencia de FM4-64, lo que indica que experimentaron una contracción en la pieza media (**Figura 35D**). Las cuantificaciones de estos resultados muestran que el 82,9 % de los espermatozoides encontrados dentro del espacio perivitelino mostraron una alta fluorescencia de FM4-64 en la pieza media (**Figura 36**). Estos resultados sugieren que la contracción de la pieza media asociada a la EA puede ocurrir luego de la penetración de la ZP.

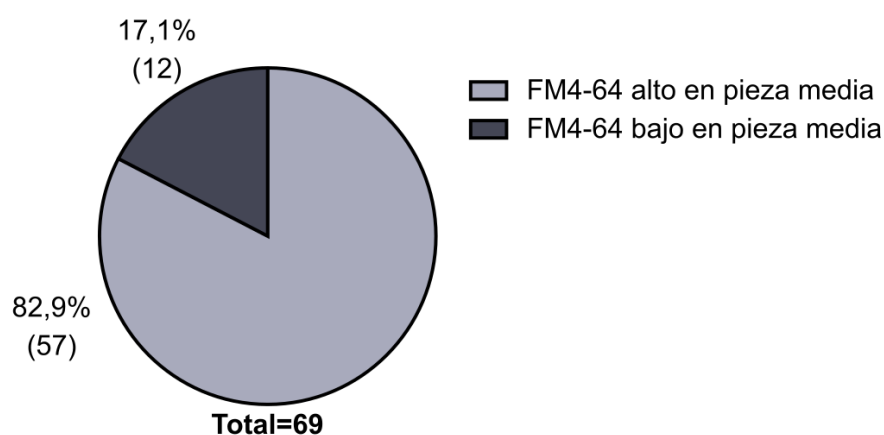


Figura 36. La mayoría de los espermatozoides localizados en el espacio perivitelino muestran una contracción de la pieza media. Cuantificación del patrón de fluorescencia de FM4-64 de la pieza media de los espermatozoides dentro de la ZP. Se muestran datos de al menos 6 experimentos independientes. Se cuantificó un total de 23 ovocitos y 69 espermatozoides.

La contracción de la pieza media se produce luego de la fusión del espermatozoide y el ovocito

Los espermatozoides que al atravesar la ZP perdieron el acrosoma, tienen movilidad y no presentan contracción de la pieza media; luego, en algún momento, dejan de moverse y experimentan un aumento en la fluorescencia de FM4-64, es decir, contracción de la pieza media. Esta observación sugiere que el cese de la movilidad puede ser importante para los eventos de fecundación que ocurren luego de la unión y penetración de la ZP. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que se requiere un cambio de la arquitectura de la pieza media para la fusión de espermatozoides y ovocitos.

Con este fin, diseñamos un experimento de *live imaging* utilizando ovocitos sin ZP. Una vez removidas las células del *cumulus* y la ZP, solo los ovocitos se cargaron con el colorante nuclear Hoechst 33342 para visualizar el momento exacto de la fusión espermatozoide-ovocito (los espermatozoides no son teñidos con el colorante, a diferencia del experimento de FIV). Una vez que la MP del ovocito y el espermatozoide inician la fusión, el colorante Hoechst 33342 presente en el ovocito se incorpora al espermatozoide y el núcleo de este emite

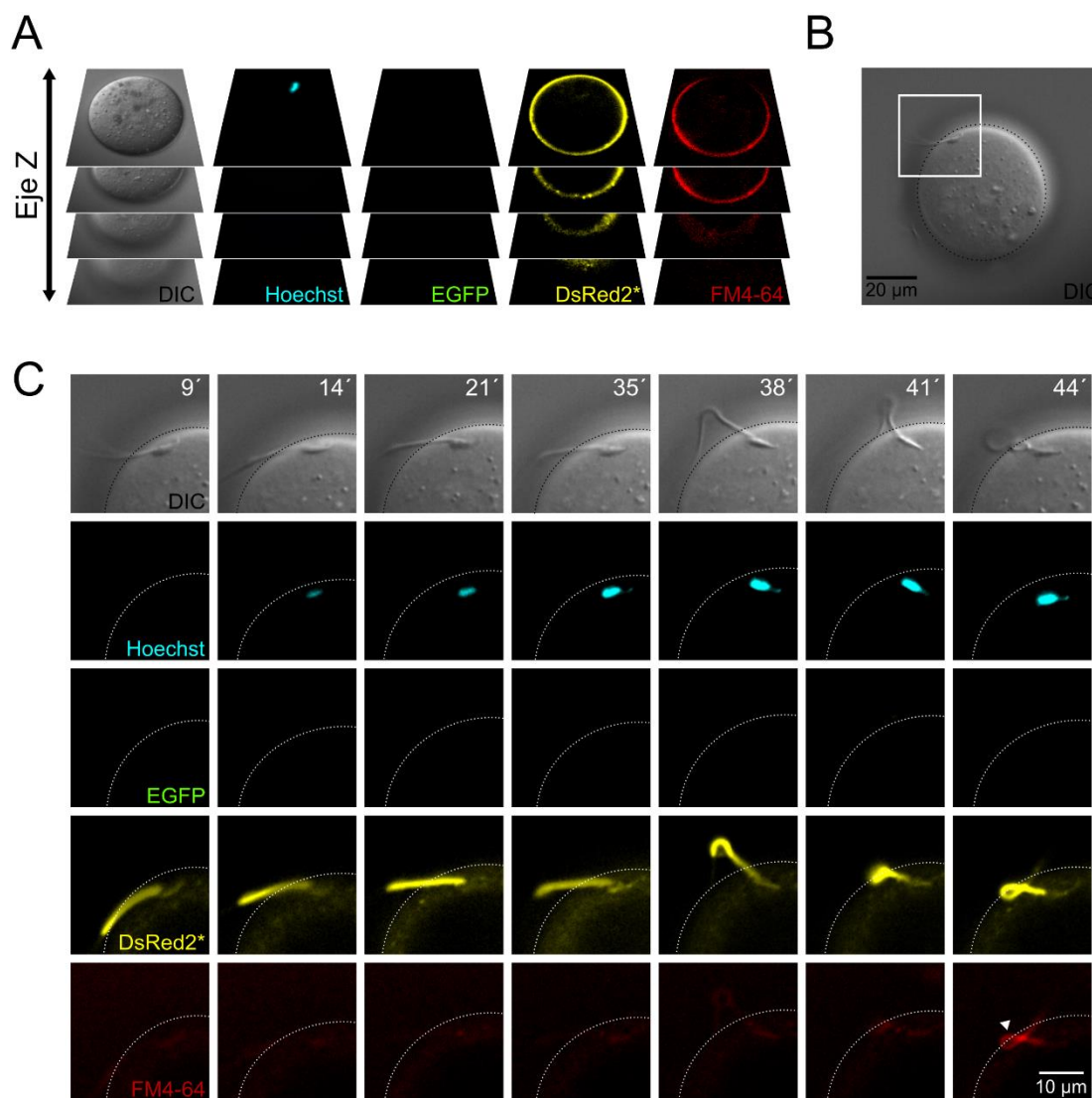


Figura 37. La contracción de la pieza media se produce después de la fusión de las gametas. A) Representación esquemática de la configuración de adquisición de imágenes para el experimento de fusión de espermatozoides y ovocitos. Se tomó una imagen cada 7 µm en el eje z. **B)** Imagen DIC de espermatozoide-ovocito, el área delimitada se muestra con mayor magnificación en **C)**. **C)** Serie de tiempo representativa de experimentos de ensayo de fusión de espermatozoide-ovocito utilizando espermatozoides EGFP-DsRed2. Los ovocitos se tiñeron con Hoechst 33342 1 µg/ml y FM4-64 10 µM. Las imágenes DIC, Hoechst 33342, EGFP, DsRed2* y FM4-64 se muestran a lo largo del tiempo. Se muestran imágenes representativas de al menos 4 experimentos independientes.

fluorescencia correspondiente a la unión de Hoechst 33342 al ADN espermático (Conover y Gwatkin, 1988; Hinkley et al., 1986; Stewart-Savage y Bavister, 1988). Llevamos a cabo este experimento con FM4-64 presente en el medio de registro, utilizando espermatozoides transgénicos EGFP-DsRed2. El experimento se realizó recolectando señales simultáneamente de cinco canales separados a lo largo del tiempo (DIC, Hoechst 33342, EGFP, DsRed2* y FM4-64). Además, para aumentar las posibilidades de observar la fusión de un espermatozoide con un ovocito, se recopilaron datos volumétricos mediante imágenes en diferentes planos z (una imagen cada 7 μm , **Figura 37A**).

La **Figura 37C** muestra una serie de tiempo representativa de un espermatozoide que se fusionó con el ovocito. En este caso, solo se muestra el plano focal óptimo del espermatozoide que perdió el acrosoma (EGFP negativo). Inicialmente, este espermatozoide no mostró fluorescencia de Hoechst 33342, lo que indica una ausencia de fusión espermatozoide-ovocito. Sin embargo, a los 14 minutos, el colorante nuclear entró en el espermatozoide y tiñó su núcleo, lo que indica que comenzó la fusión. En este punto, el espermatozoide estaba unido a la MP del ovocito, pero permaneció levemente móvil, lo que se observa siguiendo la fluorescencia de DsRed2* presente en la pieza media. Asimismo, el diámetro de la pieza media no se alteró durante los primeros instantes de la fusión, ya que la señal de fluorescencia procedente de FM4-64 era baja. En la mayoría de los casos, varios minutos después del inicio de la fusión de las gametas (evidenciado por la presencia de Hoechst 33342 en la cabeza del espermatozoide), la pieza media se plegó sobre sí misma y aumentó la fluorescencia de FM4-64 (*frames* de 38 min a 44 min, **Figura 37C**). En este punto, el espermatozoide cesó su movilidad. Es decir, registramos por primera vez que, como consecuencia de la fusión, el plegado de la pieza media, la contracción de la misma y el cese de movilidad del espermatozoide ocurren simultáneamente. En algunos casos, observamos que, luego del plegado del flagelo, la pieza media volvió a desplegarse (**Figura 38C**).

En su conjunto, estos resultados indican que la contracción de la pieza media se produjo después del inicio de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito.

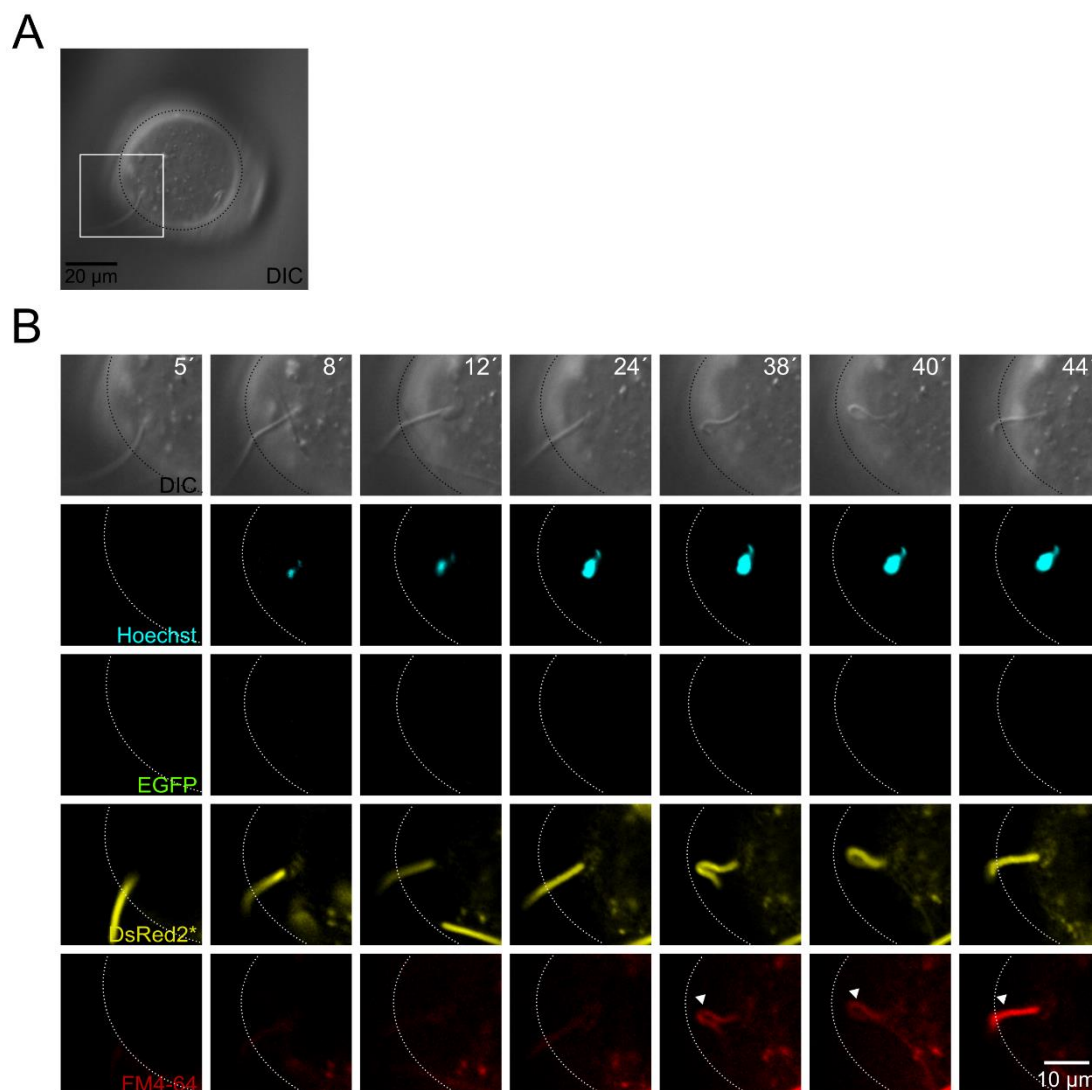


Figura 38. Coincidentemente con la contracción de la pieza media durante la fusión de las gametas, se observa un pliegue de la misma seguido por un despliegue. A) Imagen DIC de espermatozoide-ovocito, el área delimitada se muestra con mayor aumento en **B)**. **B)** Serie de tiempo representativa de experimentos de ensayo de fusión de espermatozoide-ovocito utilizando espermatozoides EGFP-DsRed2. Los ovocitos se tiñeron con Hoechst 33342 1 µg/ml y FM4-64 10 µM. Las imágenes DIC, Hoechst 33342, EGFP, DsRed2* y FM4-64 se muestran a lo largo del tiempo. Se muestran imágenes representativas de al menos 4 experimentos independientes.

Luego de la fusión, una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ precede a la contracción de la pieza media

En los experimentos anteriores, se demostró que, durante la EA se produce un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ a lo largo de toda la pieza media, que coincidió con la contracción de la misma (**Figura 30** y **Figura 31**). Para investigar más a fondo el mecanismo de la contracción de la pieza media luego de la fusión, se realizaron ensayos de fusión utilizando espermatozoides de Híbridos F1 cargados con Fluo4 y ovocitos sin ZP cargados con Hoechst 33342. Teniendo en cuenta los

resultados de célula única, hipotetizamos que los cambios dinámicos en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la fusión de las gametas impulsan la contracción de la pieza media requerida para la inmovilización de los espermatozoides.

La **Figura 39A** muestra una serie de tiempo representativa de un experimento destinado a observar la fusión de espermatozoide con ovocito. El experimento se realizó recolectando señales simultáneamente de 4 canales separados a lo largo del tiempo (DIC, Hoechst 33342, Fluo4 y FM4-64). Al igual que para el experimento de la **Figura 37** y **Figura 38**, para aumentar las posibilidades de observar eventos de fusión, se tomaron una serie de imágenes en diferentes planos z, pero solo se muestra el plano focal óptimo.

Para nuestra sorpresa, los espermatozoides que se unieron/adhirieron a la MP del ovocito mostraron altos niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza y la pieza media (**Figura 39A**, tiempo 1 min). Unos minutos después de que se hizo evidente la fusión (aumento de la señal de Hoechst 33342 en la cabeza del espermatozoide) se observó una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza y la pieza media (**Figura 39A**, 21 min a 51 min). Luego de esta disminución en la $[Ca^{2+}]_i$, ocurrió la contracción de la pieza media evidenciada por el aumento en la fluorescencia de FM4-64 (**Figura 39A**, 56 min). Nuevamente, observamos que en varias células la pieza media se plegó antes de la contracción de la misma. Los espermatozoides que experimentaron este cambio en el flagelo con mayor frecuencia permanecieron plegados durante el tiempo total de registro, pero en algunos casos, el flagelo volvió a desplegarse. Las **Figuras 39B-F** muestran la cuantificación de los eventos clave descritos anteriormente durante la fusión espermatozoide-ovocito. En resumen, el $75,8 \pm 12,2$ % de los espermatozoides fusionados presentaron contracción de la pieza media. En el $61,8 \pm 12,0$ % de los casos, la pieza media se plegó sobre sí misma y posteriormente, solo el $31,6 \pm 7,5$ % se desplegó y volvió a estirar. En lo que a las dinámicas de la $[Ca^{2+}]_i$ respecta, todos los espermatozoides unidos a la MP antes de la fusión presentaron $[Ca^{2+}]_i$ elevada en la cabeza. La gran mayoría mostró una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza antes de la contracción de la pieza media ($75,1 \pm 3,1$ %). En cuanto a la pieza media, se observaron tres patrones durante la fusión. En la mayoría de los casos ($69,7 \pm 11,5$ %), la pieza media disminuyó

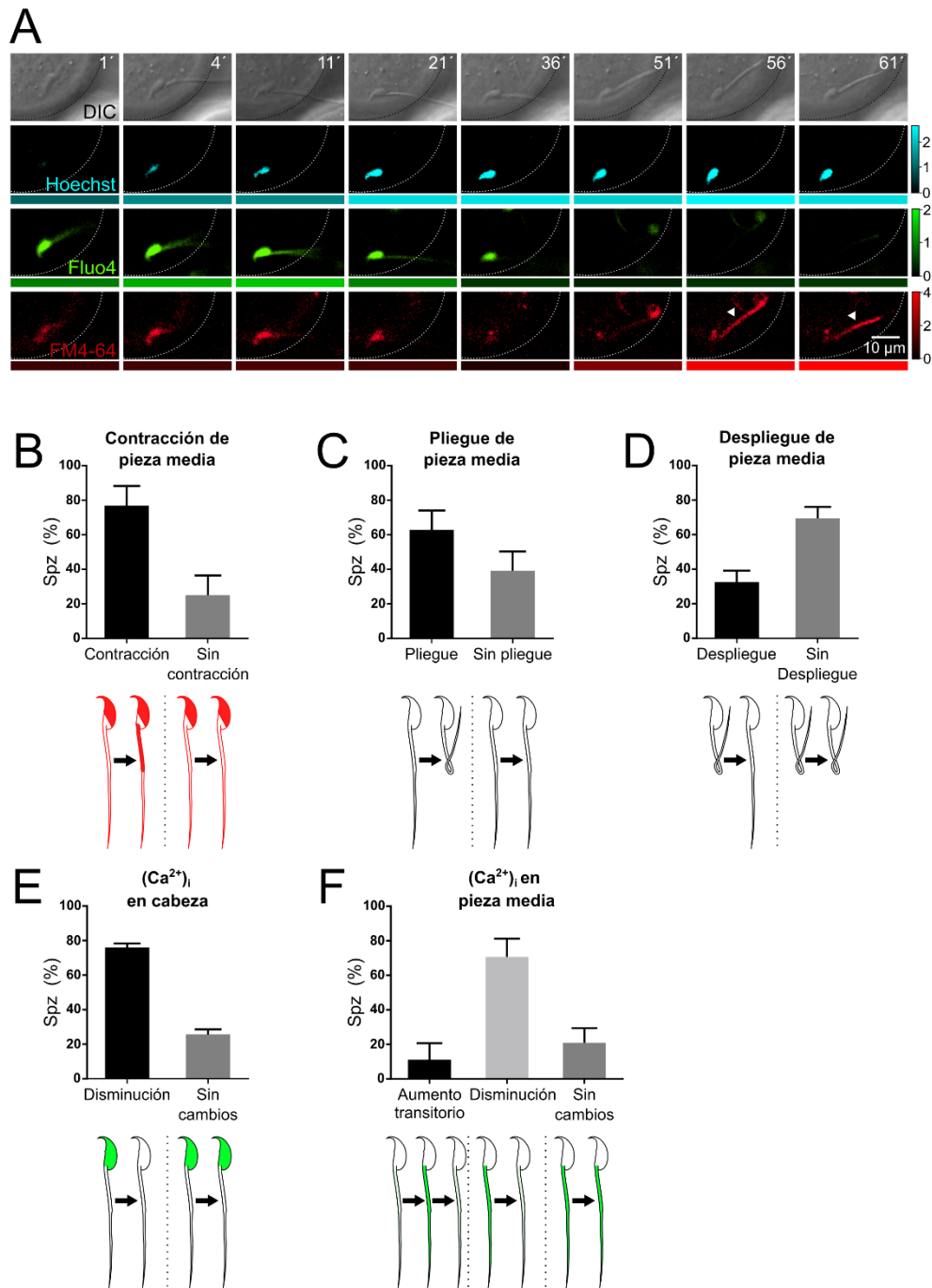


Figura 39. Durante la fusión de las gametas, la contracción de la pieza media se produce luego de una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$. **A)** Serie de tiempo representativa de experimentos de ensayo de fusión de espermatozoides y ovocitos utilizando espermatozoides de Híbridos F1 cargados con Fluo4 1 μ M. Los ovocitos se tiñeron con Hoechst 33342 1 μ g/ml y FM4-64 10 μ M. Las imágenes DIC, Hoechst 33342, Fluo4 y FM4-64 se muestran a lo largo del tiempo. Debajo de cada *frame* en las imágenes de Hoechst 33342 (mostrado en cian), Fluo4 (mostrado en verde) y FM4-64 (mostrado en rojo) hay un código de color que indica la intensidad normalizada de la señal de fluorescencia (utilizando la fórmula $[F-F_0]/F_0$, siendo F_0 el valor de intensidad de fluorescencia del *frame* inicial); barra de escala a la derecha del panel. **B-F)** Cuantificación de: **B)** espermatozoides que presentan contracción de la pieza media (visualizado por el aumento de la fluorescencia de FM4-64), **C)** el plegue de la pieza media, **D)** el despliegue de la pieza media, **E)** la dinámica del Ca^{2+} en la cabeza y **F)** diferentes patrones de Ca^{2+} en la pieza media durante la fusión. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM del porcentaje de espermatozoides contados para cada experimento. Se muestran imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. Se cuantificaron en total 74 ovocitos y 136 espermatozoides.

la $[Ca^{2+}]_i$. El $10,3 \pm 10,3$ % de los espermatozoides presentó un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$, mientras que el otro $20,0 \pm 9,4$ % no mostró ningún cambio.

En su conjunto, estos resultados indican que una disminución en la $[Ca^{2+}]_i$ de la pieza media luego de la fusión, precedió a la contracción de la misma. Este fenómeno promueve el cese de la movilidad del espermatozoide necesario para completar correctamente la fusión entre ambas gametas.

Discusión

En esta tesis describimos por primera vez un cambio estructural fundamental que ocurre en el flagelo del espermatozoide en el momento de la fusión con el ovocito. Mediante el uso de diferentes técnicas de microscopia de súper-resolución e imágenes de célula única, se pudieron describir los eventos celulares y moleculares que ocurren en los espermatozoides que pierden el acrosoma, y por ende son los capaces de fecundar al ovocito (Hino et al., 2016; la Spina et al., 2016). En este preciso momento del proceso de fecundación, los espermatozoides necesitan dejar de moverse para completar la fusión entre las dos gametas (Gaddum-Rosse et al., 1982; Gaddum-Rosse et al., 1984; Ravaux et al., 2016). Demostramos que el cese del movimiento es causado por dos eventos concomitantes que tienen lugar en la pieza media flagelar: un cambio en la estructura helicoidal de la actina-F y una disminución en el diámetro de la pieza media. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se describe una modificación estructural del flagelo espermático luego de la EA, ante una necesidad celular específica relacionada con la fusión de las gametas.

Los primeros resultados de esta tesis indican que, utilizando células en experimentos *in vitro*, la mayoría de los espermatozoides que llevan a cabo la EA aumentan la fluorescencia de FM4-64 y pierden su movilidad. Este aumento de fluorescencia de FM4-64 en la pieza media ya resultó visible tanto en el trabajo de Sanchez-Cardenas como de Romarowski (**Figura 13**) (Romarowski et al., 2016b; Sánchez-Cárdenas et al., 2014a). Dichos trabajos fueron pioneros en el estudio de la dinámica de FM4-64 en la cabeza del espermatozoide humano y murino respectivamente utilizando *live imaging* de célula única durante la EA. Ambos trabajos concluyeron que en ambas especies se puede utilizar FM4-64 como marcador de la EA ya que su fluorescencia aumenta, al igual que aumenta el marcador FITC-PSA en el humano (Zoppino et al., 2012) y disminuye EGFP (Inoue et al., 2011) en el modelo transgénico EGFP-DsRed2 de ratón. Los autores explican el aumento de fluorescencia de FM4-64 en la cabeza durante la EA por una entrada de la sonda cuando se originan las fenestraciones entre el acrosoma y la MP. Esto permitiría que FM4-64 ingrese a la célula y tiña la cara interna de la bicapa lipídica, aumentando así su fluorescencia (Romarowski et al., 2016b; Sánchez-Cárdenas et al., 2014a). En nuestro caso, en la pieza media, hasta el día de hoy, no existen reportes de fenestraciones de la MP durante la

EA. Esto indicaría que, si la entrada de FM4-64 al interior celular es el motivo del aumento de fluorescencia, debería ocurrir por otro mecanismo. Una opción es la propuesta por Li y colaboradores usando como modelo un cultivo celular de astrocitos (Li et al., 2009). En este trabajo, los autores indican que al ser FM4-64 una sonda cargada positivamente, no puede difundir a través de la MP hacia el interior celular. Sin embargo, en este tipo celular, observan que FM4-64 (y FM1-43) ingresa a la célula a través de canales de Ca^{2+} . En el contexto de la EA, donde se encuentra reportado que existe un aumento de Ca^{2+} tanto en la cabeza como en el flagelo, esta explicación resulta factible. Aquellos canales de Ca^{2+} que se abren en respuesta a los inductores de la EA podrían, de igual forma, facilitar la entrada de FM4-64. Por otro lado, sabiendo que la pieza media se contrae, una alternativa más simple para explicar el aumento en la intensidad de fluorescencia de FM4-64 en la pieza media, es la existencia de más fluoróforos por unidad de superficie. Esta posibilidad podría explicar los resultados observados con Memglow-700 y Bodipy-GM1, marcadores de membrana que poseen diferente estructura química y hasta donde sabemos, no existen reportes en la literatura de que puedan ingresar a través de canales de Ca^{2+} como las sondas FM. Ambas opciones también podrían aplicarse a los resultados preliminares de la pieza principal, donde se observó un aumento de fluorescencia de FM1-43 coincidente con la contracción de dicho segmento del flagelo.

Interesantemente, observamos que a medida que ocurre la contracción de la pieza media, en la mayoría de las células aparecen gotas citoplasmáticas. Las gotas citoplasmáticas han sido históricamente relacionadas a fallas en la espermatogénesis, proceso mediante el cual la mayoría del citoplasma es removido o sino a fallas en la maduración epididimaria (Cooper, 2005). Sin embargo, en los últimos años, se le ha asociado con la regulación del volumen celular y el control de la movilidad (Fetic et al., 2006; Xu et al., 2013). En nuestro caso, el hecho de que la célula se contraiga en la pieza media y aparezcan gotas citoplasmáticas indicaría que la célula está regulando su volumen celular total. De todas formas, como se mencionó anteriormente, son necesarios experimentos adicionales para corroborar esta hipótesis. En particular, existe una sonda llamada calceína que aumenta o disminuye la fluorescencia cuando las células se contraen o hinchan, respectivamente (Davidson y Higgins, 2013).

Sería interesante llevar a cabo experimentos de célula única para ver simultáneamente cómo es la dinámica de la contracción del flagelo con FM4-64 y el volumen celular con calceína para esclarecer de este modo el mecanismo de regulación del volumen celular.

Esta ampliamente aceptado que el Ca^{2+} es importante para la EA, y que un aumento transitorio específico de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ originado en la cabeza puede desencadenarla (Romarowski et al., 2016b). Observaciones previas mostraron que la cabeza y la cola del espermatozoide no son compartimentos separados, pues iones y otras moléculas pueden difundir entre ellos (Buffone et al., 2012; de La Vega-Beltran et al., 2012). En nuestros experimentos de célula única, observamos que el aumento de la fluorescencia de FM4-64 en la pieza media ocurre luego del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en esa región, lo que sugiere que ambos eventos pueden estar asociados.

Al igual que otras estructuras biológicas cilíndricas, el flagelo del espermatozoide depende del citoesqueleto para su organización estructural y sus propiedades mecánicas especializadas. Además del cambio en el diámetro de la pieza media, también se produjo un reordenamiento significativo del citoesqueleto de actina-F. En la pieza media, la actina polimerizada se organiza en una doble hélice que acompaña a las mitocondrias (Gervasi et al., 2018). El citoesqueleto de actina en numerosos sistemas biológicos posee funciones estructurales importantes, y los cambios dinámicos de la actina-F permiten que las células realicen funciones importantes tales como la exocitosis. Sin embargo, poco se sabe sobre los cambios estructurales que puede llevar a cabo el citoesqueleto de actina dentro de las cilias y flagelos. Nuestras observaciones demuestran que la doble hélice de actina-F presentó un claro cambio en el paso helicoidal, así como en la distancia radial relacionada con el axonema (posición de la actina-F con respecto al centro geométrico del flagelo) en respuesta a la EA.

De esta manera, un posible mecanismo para conectar los eventos observados, como ser el incremento de Ca^{2+} , los cambios en la actina-F y la contracción, es que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la cabeza inducido por la EA difunda al flagelo, y active proteínas remodeladoras de actina dependientes de Ca^{2+} tales como

Gelsolin, Scinderin o Cofilin (Breitbart et al., 2005; Finkelstein et al., 2010b; Megnagi et al., 2015; Pelletier et al., 1999). La activación de estas proteínas podría ser la causa de la remodelación de la doble hélice de actina-F que observamos por STORM y provocar así que la pieza media se contraiga.

Sumado a esto, nuestros experimentos de célula única utilizando microscopía de súper-resolución también revelaron que la red de actina-F se acercó más a la MP durante la contracción de la pieza media. Está bien establecido que varias proteínas pueden funcionar como conectores entre la MP y el citoesqueleto de actina (Köster y Mayor, 2016), como por ejemplo las llamadas ankyrin, Ezrin, filamin A y EBP50 (Bretscher et al., 2003; Fehon et al., 2010; Reczek et al., 1997; Stossel et al., 2001). Sin embargo, al igual que las proteínas remodeladoras dependiente de Ca^{2+} , queda por estudiar su papel en este proceso específico. Independientemente de cómo estén conectadas estas estructuras, es evidente que ambas ocurren en asociación, pero nuestros datos experimentales no pueden dilucidar si la MP está causando este efecto en la red de actina-F o si ocurre al revés.

Un resultado llamativo es la ocurrencia de los focos de contracción y el hecho de que los grupos experimentales con EA espontánea y EA inducida por progesterona muestren preferencia por iniciar el foco en la parte proximal de la pieza media, cercana a la cabeza del espermatozoide. Se podría decir que ambos grupos representan la condición más fisiológica ya que la inducción con ionomicina es farmacológica. La identidad del receptor murino implicado en la EA inducida por progesterona hasta el día de hoy es desconocida. Pero, sin lugar a duda, el efecto de la progesterona en espermatozoides no parece implicar la regulación clásica que involucra receptores nucleares. Algunos receptores de progesterona no genómicos se han encontrado en la MP de los espermatozoides, incluyendo al canal CatSper (Lishko et al., 2011; Miller et al., 2016; Strünker et al., 2011). Fue reportado que la progesterona interactúa y activa dichos canales en la pieza principal del flagelo de espermatozoides humanos (no así murinos), y de esta manera, modula los niveles de Ca^{2+} (Lishko et al., 2011; Miller et al., 2016; Strünker et al., 2011). Sin embargo, los autores limitaron su interpretación a la acción de progesterona sobre CatSper y por ende el Ca^{2+} en el flagelo y no lo relacionaron directamente a la EA. En el caso de los

humanos, otra posibilidad es que la progesterona induzca la EA a través de su interacción con los receptores de progesterona ubicados en la MP de la cabeza y pieza media del espermatozoide, como ser los mPR α (Buffone et al., 2014; Thomas, 2008). Dichos receptores pertenecen a la familia de receptores de progesterona no genómicos y su activación desencadena respuestas rápidas como la activación de proteínas Gs (estimuladoras). De esta forma, si bien se desconoce la identidad del receptor de progesterona en ratón, una posibilidad es que este se encuentre en la cabeza del espermatozoide como sucede en humanos. Una vez activado, podría desencadenar la EA la cual se inicia con un influjo de Ca^{2+} en la cabeza y esto podría explicar por qué los focos de contracción se dan más frecuentemente en las regiones de la pieza media cercanas a la cabeza. Por otro lado, el hecho de que el grupo inducido por ionomicina no presente preferencias por iniciar el foco en la parte proximal, central o distal habla también de la naturaleza de la inducción. Al ser la ionomicina un ionóforo, esta molécula es liposoluble y facilita el transporte de Ca^{2+} en cualquier parte de la membrana. Por este motivo, inicialmente, al ingresar Ca^{2+} por cualquier región de la pieza media, el foco podría ocurrir aleatoriamente en cualquier sección de esta parte del flagelo.

La entrada de Ca^{2+} al flagelo de los espermatozoides de mamíferos está controlada principalmente por el canal CatSper (Kirichok et al., 2006). El ingreso de dicho ion es fundamental para el desarrollo de la movilidad que permite el tránsito de las células a través del tracto reproductor femenino y su capacidad de atravesar las distintas capas que rodean al ovocito. Recientemente, se demostró que CatSper se localiza en cuatro dominios longitudinales en la pieza principal flagelar (Chung et al., 2014). Estas estructuras únicas se encuentran a su vez asociadas a otras proteínas de señalización dependientes de Ca^{2+} formando complejos de transducción de señales que median los efectos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sobre la movilidad de los espermatozoides (Chung et al., 2014). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regula cada una de estas proteínas y el axonema.

Un reporte reciente sostiene que se requiere un aumento inicial en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para inducir cambios en el batido flagelar necesarios para la hiperactivación

(Sánchez-Cárdenas et al., 2018). Sin embargo, cuando la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta más allá de un umbral determinado, cesa la movilidad flagelar. Estas conclusiones se basan en experimentos de célula única tratando a espermatozoides murinos con diferentes concentraciones del ionóforo de Ca^{2+} , A23187. Los autores reportaron que la pérdida completa de la movilidad fue observada cuando utilizan concentraciones de ionóforo superiores a 1 μM . En cambio, los espermatozoides incubados con A23187 0,5 μM permanecieron móviles durante todo el experimento. Una vez que se retira el ionóforo de Ca^{2+} , el espermatozoide reduciría la concentración de este ion a niveles compatibles con la movilidad y la hiperactivación (Navarrete et al., 2016). No obstante, algunas de las células lavadas no recuperaron la movilidad en la ventana de tiempo registrada (Sánchez-Cárdenas et al., 2018). Estos resultados indicarían que debido al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el ionóforo ocurrieron cambios irreversibles en el flagelo espermático que impidieron recuperar la movilidad, incluso no estando el ionóforo presente en el medio de registro. Teniendo en cuenta los resultados de esta tesis, una posibilidad para explicar este cambio irreversible sería la contracción de la pieza media. Nuestros resultados demuestran que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ observado en la pieza media (ya sea por inducción con progesterona, ionomicina o que ocurre espontáneamente) provoca la contracción de esta sección del flagelo y su posterior inmovilización. Como se mencionó anteriormente, si bien quedan pendientes experimentos para dilucidar la causa del cese de movilidad, postulamos que posiblemente la contracción de la pieza media ocurre por una remodelación de la doble hélice de actina-F como consecuencia de la activación de proteínas remodeladoras de actina dependientes de Ca^{2+} . De esta manera, el axonema (estructura que le confiere movimiento) del flagelo ahora contraído, no tendría la misma libertad de movimiento para poder batir y, por ende, se produciría un cese de la movilidad.

De millones de espermatozoides depositados en la vagina o útero (según la especie) solo unos cientos logran ingresar al oviducto (Yanagimachi, 1994a). De esta manera, el tracto femenino modula la selección, supervivencia y capacitación de los espermatozoides que migran hasta el sitio de fecundación (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 este sentido, los resultados que relacionan la contracción de la pieza media con el cese de la movilidad podrían sugerir un mecanismo adicional de selección de espermatozoides en el tracto reproductor femenino. Una posibilidad es que solo los espermatozoides que experimentan la EA en el oviducto pero no la contracción de la pieza media son los capaces de migrar a la *ampulla* y penetrar las células del *cumulus* y la ZP. En cambio, los espermatozoides que experimentan esta contracción del flagelo tempranamente en el tracto quedan inmovilizados y dejan de ser aptos para continuar su viaje. La ocurrencia anticipada de la contracción flagelar podría ser un mecanismo fisiológico de selección de las gametas durante su tránsito hacia la *ampulla*. Sería interesante observar dentro del tracto reproductor femenino cuál es el estado de la pieza media de los espermatozoides que van quedando en el camino. Una forma de lograrlo es la observación del tracto en experimentos *ex vivo* como fue reportado por nuestro y otros grupos de investigación (Hino et al., 2016; la Spina et al., 2016). Si bien se intentó llevar a cabo este experimento reiteradas veces, la presencia de FM4-64 tiñó significativamente la MP de las células de la pared oviductal y el colorante no logró ingresar a los espermatozoides, lo que hizo imposible visualizar la dinámica de la MP espermática durante su tránsito por el tracto. Dada la posible importancia de este mecanismo en el proceso de selección de las gametas, quedan pendientes futuros experimentos para poder visualizar el estado de la pieza media dentro del tracto reproductor femenino.

Durante la fusión espermatozoide-ovocito, varios autores han reportado en diferentes especies que los espermatozoides dejan de moverse (Gaddum-Rosse et al., 1982; Gaddum-Rosse et al., 1984; Ravaux et al., 2016). Sin embargo, el mecanismo detrás de este comportamiento aún no está establecido. En nuestros experimentos de fusión notamos un fenómeno específico que ocurre en la pieza media de los espermatozoides: el diámetro se reduce y se pliega sobre sí misma en la mayoría de los casos registrados. Esta reducción del diámetro de la pieza media que detiene por completo la movilidad de los espermatozoides aparentemente es necesaria para que se complete el proceso de fusión.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, una posible explicación es que la fusión promueve cambios en el transporte de iones en los espermatozoides, lo que altera significativamente el movimiento y la arquitectura flagelar. En este sentido, previamente se demostró que ciertos iones como el Ca^{2+} pueden difundir desde el ovocito al espermatozoide (Jones et al., 1998; Lawrence et al., 1997).

Durante los experimentos de fusión se estudió a los espermatozoides unidos a la MP del ovocito para evaluar si el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ también se produce en el momento de la fusión. Sorprendentemente, notamos que la mayoría de los espermatozoides unidos que efectivamente se fusionaron con el ovocito mostraban altos niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tanto en la cabeza como en el flagelo. La contracción de la pieza media y la inmovilización ocurrieron cuando los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bajaron en la pieza media, lo que sugiere una posible conexión entre ambos eventos. Sin embargo, una clara limitación técnica en nuestro enfoque experimental es que las sondas que monitorean la dinámica de iones pueden intercambiarse entre ambas gametas. Si la concentración de una sonda dada no permanece estable, es imposible determinar el cambio exacto que ocurre durante la fusión. Futuros experimentos pueden aprovechar modelos transgénicos que incorporen un sensor particular para estudiar este proceso *in vivo*, como el utilizado por Cohen y colaboradores (Cohen et al., 2022). En dicho trabajo se generó un ratón transgénico que expresa un sensor de Ca^{2+} dirigido al acrosoma (AcroSenseE) con el fin de investigar la dinámica espacio-temporal del Ca^{2+} durante la EA en espermatozoides vivos. AcroSenseE combina un indicador de Ca^{2+} codificado genéticamente (GCaMP) fusionado con un indicador mCherry para resolver el aumento de Ca^{2+} acrosomal y eventos de fusión de membrana, respectivamente. Como es un componente de la matriz, la pérdida de fluorescencia de mCherry (fotoestable e insensible al pH) reflejaría la fusión de las membranas en el estudio en tiempo real de la EA. Al no ser una sonda, este modelo ayudaría en gran medida en la interpretación de nuestros resultados.

Independientemente de la naturaleza precisa del intercambio iónico entre las gametas, una posible explicación es que tan pronto como el espermatozoide se une a la MP del ovocito, se produce un rápido aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en toda la

célula. Por otro lado, también podría ocurrir un transporte masivo de Ca^{2+} del ovocito al espermatozoide. En experimentos *in vitro* usando espermatozoides de erizo de mar, se reportó un pliegue del flagelo luego de un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Darszon et al., 2004; Guerrero et al., 2010). Esto podría explicar nuestra observación del pliegue de la pieza media una vez iniciada la fusión. Estas hipótesis, sin embargo, se ven obstaculizadas por las limitaciones técnicas mencionadas anteriormente. Como el ovocito no se tiñe con Fluo4, no podemos descartar que la disminución aparente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observada en estos experimentos se deba a la difusión de la sonda en el ovocito.

Si bien no fueron mostrados los resultados en la presente tesis, durante la puesta a punto de este experimento, también se probó teñir a los ovocitos con Fluo4 y observar el pasaje de dicha sonda al espermatozoide sin teñir. El mayor problema de este abordaje fue que el volumen del ovocito es significativamente mayor que el del flagelo espermático y por ende la señal de Fluo4 es más intensa. Esto sumado a las oscilaciones de Ca^{2+} que la gameta femenina presenta como consecuencia de la fusión, la observación del flagelo y la dinámica de Ca^{2+} es muy difícil de lograr.

De cualquier manera, está claro que el transporte de este ion dentro o fuera del espermatozoide es clave para detener la movilidad durante la fusión, paso fundamental de la fecundación. Estos resultados demostrarían a su vez que solo los espermatozoides con la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevada son capaces de unirse a los ovocitos. Independientemente del mecanismo, se observa un claro cambio en la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el momento de la contracción de la pieza media. Estudios futuros ayudarán a dilucidar si ciertas proteínas dependientes de Ca^{2+} que pueden modificar el citoesqueleto de actina son las responsables de este cambio en el flagelo espermático.

En conclusión, los resultados de esta tesis demuestran que la pieza media del flagelo murino atraviesa cambios estructurales y dinámicos durante la fusión con el ovocito que pueden ser esenciales para que el flagelo detenga su movilidad y se fusione correctamente con la gameta femenina.

Bibliografía

- 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.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 6248–6258.
- Alva, A., Brito-Alarcón, E., Linares, A., Torres-García, E., Hernández, H. O., Pinto-Cámara, R., Martínez, D., Hernández-Herrera, P., D'Antuono, R., Wood, C., et al.** (2022). Fluorescence fluctuation-based super-resolution microscopy: Basic concepts for an easy start. *J Microsc* **288**,.
- 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. *Development (Cambridge)* **143**, 2325–33.
- Andrews, J. C. and Bavister, B. D.** (1989). Capacitation of hamster spermatozoa with the divalent cation chelators D-penicillamine, L-histidine, and L-cysteine in a protein-free culture medium. *Mol Reprod Dev* **23**, 159–170.
- Austin, C. R.** (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian journal of scientific research* **4**, 581–596.
- Austin, C. R. and Bishop, M. W. H.** (1958). Capacitation of Mammalian Spermatozoa. *Nature* **181**, 851–851.
- Austin, C. R. and Braden, A. W. H.** (1956). Early Reactions of the Rodent Egg to Spermatozoon Penetration. *Journal of Experimental Biology* **33**, 358–365.
- Avidor-Reiss, T., Mazur, M., Fishman, E. L. and Sindhvani, P.** (2019). The Role of Sperm Centrioles in Human Reproduction - The Known and the Unknown. *Front Cell Dev Biol* **7**,.
- 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.
- Balestrini, P. A., Jabłoński, M., Schiavi-Ehrenhaus, L. J., Marín-Briggiler, C. I., Sánchez-Cárdenas, C., Darszon, A., Krapf, D. and Buffone, M. G.** (2020). Seeing is believing: Current methods to observe sperm acrosomal exocytosis in real time. *Mol Reprod Dev* **87**, 1188–1198.
- Balhorn, R.** (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* **8**, 227.
- Barboux, S., Ialy-Radio, C., Chalbi, M., Dybal, E., Homps-Legrand, M., do Cruzeiro, M., Vaiman, D., Wolf, J. P. and Ziyat, A.** (2020). Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion. *Sci Rep* **10**,.
- 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.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. and Plastino, J.** (2014). Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiol Rev* **94**,.

- 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.
- 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.
- Breitbart, H., Cohen, G. and Rubinstein, S.** (2005). Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* **129**, 263–268.
- 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.
- Bretscher, A., Chambers, D., Nguyen, R. and Reczek, D.** (2003). ERM-Merlin and EBP50 Protein Families in Plasma Membrane Organization and Function. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.113> **16**, 113–143.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **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. *International Journal of Developmental Biology* **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., Ijiri, T. W., Cao, W., Merdiushev, T., Aghajanian, H. K. and Gerton, G. L.** (2012). Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol Reprod Dev* **79**, 4–18.
- Buffone, M. G., Hirohashi, N. and Gerton, G.** (2014). Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biol Reprod* **90**, 112.
- Burton, K. A., Treash-Osio, B., Muller, C. H., Dunphy, E. L. and McKnight, G. S.** (1999). Deletion of type II α regulatory subunit delocalizes protein kinase A in mouse sperm without affecting motility or fertilization. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 24131–24136.

- Campagnola, G., Nepal, K., Schroder, B. W., Peersen, O. B. and Krapf, D.** (2015). Superdiffusive motion of membrane-targeting C2 domains. *Sci Rep* **5**, 17721.
- Carafoli, E. and Krebs, J.** (2016). Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *J Biol Chem* **291**, 20849–20857.
- Carlson, A. E., Quill, T. A., Westenbroek, R. E., Schuh, S. M., Hille, B. and Babcock, D. F.** (2005). Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 32238–32244.
- Chang, M. C.** (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**, 697–698.
- 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.
- 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* (1979) **289**, 625–628.
- Cheng, C. Y. and Mruk, D. D.** (2009). An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: A biochemical and molecular perspective. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**, 245.
- 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.
- Chhabra, E. S. and Higgs, H. N.** (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* **9**, 1110–1121.
- Chung, J.-J., Navarro, B., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. and Clapham, D. E.** (2011). A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun* **2**, 153.
- 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). CatSperζ 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., Mukai, C., Nelson, J. L., Zenilman, S. S., Sosnicki, D. M. and Travis, A. J.** (2022). A genetically targeted sensor reveals spatial and temporal dynamics of acrosomal calcium and sperm acrosome exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **298**, 101868–101869.
- Conover, J. C. and Gwatkin, R. B. L.** (1988). Pre-loading of mouse oocytes with DNA-specific fluorochrome (Hoechst 33342) permits rapid detection of sperm-oocyte fusion. *J Reprod Fertil* **82**, 681–690.
- Cooper, T. G.** (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod* **20**, 9–11.
- Corkidi, G., Hernandez-Herrera, P., Montoya, F., Gadêlha, H. and Darszon, A.** (2021). Long-term segmentation-free assessment of head-flagellum movement and intracellular calcium in swimming human sperm. *J Cell Sci* **134**,.
- Correia, J., Michelangeli, F. and Publicover, S.** (2015). Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm. *Reproduction* **150**, R56–R76.
- Cox, L. J., Larman, M. G., Saunders, C. M., Hashimoto, K., Swann, K. and Lai, F. A.** (2002). Sperm phospholipase C ζ from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* **124**, 611–623.
- 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.
- Culley, S., Tosheva, K. L., Matos Pereira, P. and Henriques, R.** (2018). SRRF: Universal live-cell super-resolution microscopy. *Int J Biochem Cell Biol* **101**, 74–79.
- Daan, V. D. Z., Sijors, W., Nane, V., Ew, M., Bruno, D. G. and Lorenzo, A.** (2016). Super resolution imaging of supramolecular biomaterials: Shining a light on biomaterials in vitro and in cells. *Front Bioeng Biotechnol* **4**,.
- Dan, J. . C. .** (1952). Studies on the Acrosome . I. Reaction to Egg-Water. *Biological Bulletin* **103**, 54–66.
- Darszon, A., Guerrero, A., Galindo, B. E., Nishigaki, T. and Wood, C. D.** (2004). Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *International Journal of Developmental Biology* **52**, 595–606.
- 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.
- Davidson, A. F. and Higgins, A. Z.** (2013). Detection of volume changes in calcein-stained cells using confocal microscopy. *J Fluoresc* **23**, 393–398.
- Davis, B. K.** (1981). Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7560–4.

- 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.** (2005). Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* **11**, 205–214.
- 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. *Journal of Experimental Zoology* **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. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 44384–44393.
- de las Heras, M. A., Valcarcel, A., Perez, L. J. and Moses, D. F.** (1997). Actin localization in ram spermatozoa: Effect of freezing/thawing, capacitation and calcium ionophore-induced acrosomal exocytosis. *Tissue Cell* **29**, 47–53.
- 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-Buenrostro, N. L., Hernández-González, E. O., Segura-nieto, M. and Mújica, A.** (2005). Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. *Mol Reprod Dev* **70**, 198–210.
- 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 Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 7001–7009.
- Demott, R. P. and Suarez, S. S.** (1992). Hyperactivated Sperm Progress in the Mouse Oviduct. *Biol Reprod* **46**, 779–785.
- Deneke, V. E. and Pauli, A.** (2021). The Fertilization Enigma: How Sperm and Egg Fuse. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2021** **37**, 391–414.
- Ducibella, T.** (1996). The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum Reprod Update* **2**, 29–42.
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M. and McDonald, J. H.** (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**,.
- Eddy, E. M.** (2006). The spermatozoon. In J. D. Neill, ed. *Knobil and Neill's - Physiology of Reproduction*. 3–53.
- Eddy, E. M., Toshimori, K. and O'Brien, D. A.** (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* **61**, 103–115.
- Ehrenwald, E., Foote, R. H. and Parks, J. E.** (1990). Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* **25**, 195–204.
- 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.

- Esposito, G., Jaiswal, B. S. B. S., Xie, F., Krajnc-Franken, M. A. M., Robben, T. J. A. A., Strik, A. M., Kuil, C., Philipsen, R. L. A., van Duin, M., Conti, M., et al.** (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2993–8.
- Evans, J. P. and Kopf, G. S.** (1998). Molecular mechanisms of sperm–egg interactions and egg activation. *Andrologia* **30**, 297–307.
- 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.
- Fehon, R. G., McClatchey, A. I. and Bretscher, A.** (2010). Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:4 **11**, 276–287.
- 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**,.
- Fetic, S., Yeung, C. H., Sonntag, B., Nieschlag, E. and Cooper, T. G.** (2006). Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *J Androl* **27**, 294–301.
- Finkelstein, M., Etkovitz, N. and Breitbart, H.** (2010a). Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 39702–39709.
- Finkelstein, M., Etkovitz, N. and Breitbart, H.** (2010b). Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization. *J Biol Chem* **285**, 39702–39709.
- Flaherty, S. P., Winfrey, V. P. and Olson, G. E.** (1988). Localization of actin in human, bull, rabbit, and hamster sperm by immunoelectron microscopy. *Anat Rec* **221**, 599–610.
- 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.
- 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.
- Gaddum-Rosse, P., Blandau, R. J., Langley, L. B. and Sato, K.** (1982). Sperm tail entry into the mouse egg in vitro. *Gamete Res* **6**, 215–223.
- Gaddum-Rosse, P., Blandau, R. J., Langley, L. B. and Battaglia, D. E.** (1984). In vitro fertilization in the rat: observations on living eggs. *Fertil Steril* **42**, 285–292.
- Gadella, B. M. M.** (2008). Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci* **107**, 229–236.
- Gadella, B. M., Tsai, P.-S., Boerke, A. and Brewis, I. A.** (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol* **52**, 473–80.
- Gadella, B. M., Leahy, T. and Gadella, B. M.** (2015). New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian J Androl* **17**, 561.
- 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.
- 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.
- Grasa, P., Coward, K., Young, C. and Parrington, J.** (2008). The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase C ζ , in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Human Reproduction* **23**, 2513–2522.
- Guerrero, A., Nishigaki, T., Carneiro, J., Yoshiro Tatsu, Wood, C. D. and Darszon, A.** (2010). Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Dev Biol* **344**, 52–65.
- 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.
- Gupta, S. K. and Bhandari, B.** (2011). Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J Androl* **13**, 97–105.
- Gustafsson, N., Culley, S., Ashdown, G., Owen, D. M., Pereira, P. M. and Henriques, R.** (2016). Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nat Commun* **7**, 12471.
- Harper, C. v, Cummerson, 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.
- 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.
- Hernández-González, E. O., Lecona-Valera, A. N., Escobar-Herrera, J. and Mújica, A.** (2000). Involvement of an F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton* **46**, 43–58.
- 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.

- Hess, R. A. and de Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol* **636**, 1–15.
- 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.
- Hinkley, R. E., Wright, B. D. and Lynn, J. W. (1986). Rapid visual detection of sperm-egg fusion using the DNA-specific fluorochrome Hoechst 33342. *Dev Biol* **118**, 148–154.
- Hino, T., Muro, Y., Tamura-Nakano, M., Okabe, M., Tatenno, 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.
- Holtzer, L., Meckel, T. and Schmidt, T. (2007). Nanometric three-dimensional tracking of individual quantum dots in cells. *Appl Phys Lett* **90**, 053902.
- Huang, B., Wang, W., Bates, M. and Zhuang, X. (2008a). Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* (1979) **319**, 810–813.
- Huang, B., Wang, W., Bates, M. and Zhuang, X. (2008b). Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* **319**, 810–3.
- Hunter, R. H. F. (1973). Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology* **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.
- 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.
- Hwang, J. Y., Wang, H., Lu, Y., Ikawa, M. and Chung, J. J. (2022). C2cd6-encoded CatSpert targets sperm calcium channel to Ca²⁺ signaling domains in the flagellar membrane. *Cell Rep* **38**,.
- 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.
- Inaba, K. and Shiba, K. (2018). Microscopic analysis of sperm movement: links to mechanisms and protein components. *Microscopy* **67**, 144–155.
- 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**,.

- Izeddin, I., el Beheiry, M., Andilla, J., Ciepielewski, D., Darzacq, X. and Dahan, M.** (2012). PSF shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking. *Opt Express* **20**, 4957.
- Jacquemet, G., Carisey, A. F., Hamidi, H., Henriques, R. and Leterrier, C.** (2020). The cell biologist's guide to super-resolution microscopy.
- Jaffe, L. A.** (1990). First messengers at fertilization. *J Reprod Fertil Suppl* **42**, 107–116.
- Jaffe, L. F.** (1991). The path of calcium in cytosolic calcium oscillations: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9883.
- 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.
- Jin, J., Jin, N., Zheng, H., Ro, S., Tafolla, D., Sanders, K. M. and Yan, W.** (2007). Catsper3 and Catsper4 Are Essential for Sperm Hyperactivated Motility and Male Fertility in the Mouse. *Biol Reprod* **77**, 37–44.
- 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.
- Jones, K. T., Soeller, C. and Cannell, M. B.** (1998). The passage of Ca^{2+} and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development* **125**, 4627–4635.
- Jones, R., James, P. S., Howes, L., Bruckbauer, A. and Klennerman, D.** (2007). Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian J Androl* **9**, 438–44.
- Kang, H., Liu, M., Zhang, W., Huang, R. Z., Zhao, N., Chen, C. and Zeng, X. H.** (2021). $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ Exchangers Involve in Regulating the pH-Sensitive Ion Channels in Mouse Sperm. *Int J Mol Sci* **22**, 1–13.
- Kao, H. P. and Verkman, A. S.** (1994). Tracking of single fluorescent particles in three dimensions: use of cylindrical optics to encode particle position. *Biophys J* **67**, 1291.
- 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.
- 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.
- 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.

- Köster, D. v. and Mayor, S.** (2016). Cortical actin and the plasma membrane: inextricably intertwined. *Curr Opin Cell Biol* **38**, 81–89.
- Krasznai, Z., Krasznai, Z. T., Morisawa, M., Bazsáné, Z. K., Hernádi, Z., Fazekas, Z., Trón, L., Goda, K. and Márián, T.** (2006). Role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in calcium homeostasis and human sperm motility regulation. *Cell Motil Cytoskeleton* **63**, 66–76.
- 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.
- Langlais, J., Zollinger, M., Plante, L., Chapdelaine, A., Bleau, G. and Roberts, K. D.** (1981). Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 7266–7270.
- Lawrence, Y., Whitaker, M. and Swann, K.** (1997). Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca²⁺ increase at fertilization in the mouse. *Development* **124**, 233–241.
- Lefièvre, L., Jha, K. N., de Lamirande, E., Visconti, P. and Gagnon, C.** (2002). Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. *J Androl* **23**, 709–716.
- Li, D., Héroult, K., Oheim, M. and Ropert, N.** (2009). FM dyes enter via a store-operated calcium channel and modify calcium signaling of cultured astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21960–21965.
- Lichtman, J. W. and Conchello, J. A.** (2005). Fluorescence microscopy. *Nat Methods* **2**, 910–919.
- Lindemann, C. B. and Lesich, K. A.** (2016). Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton* **73**, 652–669.
- 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. 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.
- 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. *Human Reproduction* **21**, 1002–1008.
- Liu, J., Xia, J., Cho, K.-H., Clapham, D. E. and Ren, D.** (2007). CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *J Biol Chem* **282**, 18945–52.

- 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.
- Lukinavičius, G., Reymond, L., D'Este, E., Masharina, A., Göttfert, F., Ta, H., Güther, A., Fournier, M., Rizzo, S., Waldmann, H., et al.** (2014). Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nature Methods* **11**, 731–733.
- Luque, G. M., Xu, X., Romarowski, A., Gervasi, M. G., Orta, G., de la Vega-Beltrán, J. L., Stival, C., Gilio, N., Dalotto-Moreno, T., Krapf, D., et al.** (2021). Cdc42 localized in the CatSper signaling complex regulates cAMP-dependent pathways in mouse sperm. *The FASEB Journal* **35**, e21723.
- 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.
- Magliocca, V., Petrini, S., Franchin, T., Borghi, R., Niceforo, A., Abbaszadeh, Z., Bertini, E. and Compagnucci, C.** (2017). Identifying the dynamics of actin and tubulin polymerization in iPSCs and in iPSC-derived neurons. *Oncotarget* **8**, 111096–111109.
- Mahé, C., Zlotkowska, A. M., Reynaud, K., Tsikis, G., Mermillod, 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.
- 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.
- 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**,.
- Matamoros-Volante, A. and Trevino, C. L.** (2020). Capacitation-associated alkalization in human sperm is differentially controlled at the subcellular level. *J Cell Sci* **133**,.
- Mayorga, L. S., Tames, C. N. and Belmonte, S. A.** (2007). Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* **59**, 286–292.
- Megnagi, B., Finkelstein, M., Shabtay, O. and Breitbart, H.** (2015). The role and importance of cofilin in human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Cell Tissue Res* **362**, 665–675.
- 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., 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.

- 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.
- Miller, M. R., Kenny, S. J., Mannowetz, N., Mansell, S. A., Wojcik, M., Mendoza, S., Zucker, R. S., Xu, K. and Lishko, P. v. (2018). Asymmetrically Positioned Flagellar Control Units Regulate Human Sperm Rotation. *Cell Rep* **24**, 2606–2613.
- Moreno Fierros, L., Hernandez-González, E. O., Salgado, Z. O. and Mújica, A. (1992). F-actin in guinea pig spermatozoa: Its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* **33**, 172–181.
- 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.
- Navarrete, F. A., Alvau, A., Lee, H. C., Levin, L. R., Buck, J., Leon, P. M.-D., Santi, C. M., Krapf, D., Mager, J., Fissore, R. A., et al. (2016). Transient exposure to calcium ionophore enables in vitro fertilization in sterile mouse models. *Sci Rep* **6**, 33589.
- 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.
- Nicolson, G. L., Yanagimachi, R. and Yanagimachi, H. (1975). Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zonae pellucidae and plasma membranes of mammalian eggs. *J Cell Biol* **66**, 263–274.
- 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**,.
- Nolan, M. a, Babcock, D. F., Wennemuth, G., Brown, W., Burton, K. a and McKnight, G. S. (2004). Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13483–8.
- Oikonomopoulou, I., Patel, H., Watson, P. F. and Chantler, P. D. (2009). Relocation of myosin and actin, kinesin and tubulin in the acrosome reaction of bovine spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* **21**, 364–77.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **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.
- Oren-Benaroya, R., Orvieto, R., Gakamsky, A., Pinchasov, M. and Eisenbach, M.** (2008). The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Human Reproduction* **23**, 2339–2345.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* jbc.RA117.001566.
- Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D. and Meizel, S.** (1989). Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* **160**, 828–833.
- 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.
- 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.
- Ovesný, M., Křížek, P., Borkovec, J., Švindrych, Z. and Hagen, G. M.** (2014). ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics* **30**, 2389–2390.
- 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.
- 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). $[Ca^{2+}]_i$ 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, Alkalinization, and Hyperpolarization During Human Sperm Capacitation. *J Cell Physiol* **232**, 1404–1414.
- Puga Molina, L. DC., 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. *Journal of Biological Chemistry* **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.
- 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.
- Ravaux, B., Garroum, N., Perez, E., Willaime, H. and Gourier, C.** (2016). A specific flagellum beating mode for inducing fusion in mammalian fertilization and kinetics of sperm internalization. *Sci Rep* **6**,.
- Rayleigh, L.** (1903). On the Theory of Optical Images, with Special Reference to the Microscope. *Journal of the Royal Microscopical Society* **23**, 447–473.
- Reczek, D., Berryman, M. and Bretscher, A.** (1997). Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* **139**, 169–179.
- 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., 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.
- 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.
- Robaire, B., Hinton, B. T. and Orgebin-Crist, M. C.** (2006). The Epididymis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 1071–1148.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 26335–26343.
- Roldan, E. R., Murase, T. and Shi, Q. X.** (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* **266**, 1578–81.
- Romarowski, A., Luque, G. M., la Spina, F. A., Krapf, D. and Buffone, M. G.** (2016a). Role of Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **220**, 129–44.

- 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. (2016b). A Specific Transitory Increase in Intracellular Calcium Induced by Progesterone Promotes Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm. *Biol Reprod* **94**, 1–12.
- Romarowski, A., Velasco Félix, Á. G., Rodriguez, P. T., Gervasi, M. G., Xu, X., Luque, G. M., Contreras-Jiménez, G., Sánchez-Cárdenas, C., Ramirez-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.
- Sagare-Patil, V., Galvankar, M., Satiya, M., Bhandari, B., Gupta, S. K. and Modi, D. (2012). Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *Int J Androl* **35**, 633–644.
- 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. *Journal of Experimental Zoology* **209**, 229–238.
- Sánchez-Cárdenas, C., Servín-Vences, M. R., José, O., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A. and Darszon, A. (2014a). Acrosome reaction and Ca²⁺ imaging in single human spermatozoa: New regulatory roles of [Ca²⁺]_i. *Biol Reprod* **91**,.
- Sánchez-Cárdenas, C., Servín-Vences, M. R., José, O., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A. and Darszon, A. (2014b). Acrosome Reaction and Ca²⁺ Imaging in Single Human Spermatozoa: New Regulatory Roles of [Ca²⁺]_i. *Biol Reprod* **91**, 1–21.
- Sánchez-Cárdenas, C., Montoya, F., Navarrete, F. A., Hernández-Cruz, A., Corkidi, G., Visconti, P. E. and Darszon, A. (2018). Intracellular Ca²⁺ threshold reversibly switches flagellar beat off and on†. *Biol Reprod*.
- Sansegundo, E., Tourmente, M. and Roldan, E. R. S. (2022). Energy Metabolism and Hyperactivation of Spermatozoa from Three Mouse Species under Capacitating Conditions. *Cells* **11**,.
- 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.
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K. and Lai, F. A. (2002). PLCζ: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* **129**, 3533–3544.

- Schermelleh, L., Ferrand, A., Huser, T., Eggeling, C., Sauer, M., Biehlmaier, O. and Drummen, G. P. C. (2019). Super-resolution microscopy demystified. *Nature Cell Biology* 2019 21:1 21, 72–84.
- Schultz, R. M. and Kopf, G. S. (1995). Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr Top Dev Biol* 30, 21–62.
- 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.
- Servin-Vences, M. R., Tatsu, Y., Ando, H., Guerrero, A., Yumoto, N., Darszon, A. and Nishigaki, T. (2012). A caged progesterone analog alters intracellular Ca²⁺ and flagellar bending in human sperm. *Reproduction* 144, 101–109.
- 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.
- Siu, K. K., Serrão, V. H. B., Ziyat, A. and Lee, J. E. (2021). The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. *J Cell Biol* 220,.
- Skålhegg, B. S., Huang, Y., Su, T., Idzerda, R. L., McKnight, G. S. and Burton, K. A. (2002). Mutation of the Cα subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Molecular Endocrinology* 16, 630–639.
- Skerget, S., Rosenow, M. A., Petritis, K. and Karr, T. L. (2015). Sperm Proteome Maturation in the Mouse Epididymis. *PLoS One* 10, e0140650.
- 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.-Y., 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* 122, 2741–2749.
- Stewart-Savage, J. and Bavister, B. D. (1988). A cell surface block to polyspermy occurs in golden hamster eggs. *Dev Biol* 128, 150–157.
- Stice, S. L. and Robl, J. M. (1990). Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol Reprod Dev* 25, 272–280.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 290, 18855–18864.
- 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.
- Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J. H., Noegel, A., Schleicher, M. and Shapiro, S. S.** (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001 2:2 **2**, 138–145.
- 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.
- Suarez, S. S.** (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* **14**, 647–657.
- Suarez, S. S. and Dai, X.** (1992). Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod* **46**, 686–691.
- 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.
- Sullivan, R.** (2015). Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian J Androl* **17**, 726–729.
- Suzuki, F. and Yanagimachi, R.** (1989). Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res* **23**, 335–47.
- Swann, K.** (1990). A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* **110**, 1295–1302.
- 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.
- 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.
- Thomas, P.** (2008). Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Front Neuroendocrinol* **29**, 292–312.
- 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-García, E., Pinto-Cámara, R., Linares, A., Martínez, D., Abonza, V., Brito-Alarcón, E., Calcines-Cruz, C., Valdés-Galindo, G., Torres, D., Jabłoński, M., et al.** (2022). Extending resolution within a single imaging frame. *Nature Communications* 2022 13:1 **13**, 1–22.

- 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.
- 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.
- 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., Grootenhuys, 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.
- Vangindertael, J., Camacho, R., Sempels, W., Mizuno, H., Dedecker, P. and Janssen, K. P. F.** (2018). An introduction to optical super-resolution microscopy for the adventurous biologist. *Methods Appl Fluoresc* **6**,.
- 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.
- Vogl, A. W., Genereux, K. and Pfeiffer, D. C.** (1993). Filamentous actin detected in rat spermatozoa. *Tissue Cell* **25**, 33–48.
- Vondrakova, J., Frolikova, M., Ded, L., Cerny, J., Postlerova, P., Palenikova, V., Simonik, O., Nahacka, Z., Basus, K., Valaskova, E., et al.** (2022). MAIA, Fc receptor-like 3, supersedes JUNO as IZUMO1 receptor during human fertilization. *Sci Adv* **8**, 47.
- 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, 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). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 9325–9330.
- Wang, H., Liu, J., Cho, K.-H. and Ren, D.** (2009). A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol Reprod* **81**, 539–44.
- Weigel, A. v., Simon, B., Tamkun, M. M. and Krapf, D.** (2011). Ergodic and nonergodic processes coexist in the plasma membrane as observed by single-molecule tracking. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 6438–6443.
- Wennemuth, G., Westenbroek, R. E., Xu, T., Hille, B. and Babcock, D. F.** (2000). CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ 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. *Journal of Biological Chemistry* **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. *Journal of Biological Chemistry* **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.
- Wolf, D. P. and Armstrong, P. B.** (1978). Penetration of the zona-free mouse egg by capacitated epididymal sperm: Cinemicrographic observations. *Gamete Res* **1**, 39–46.
- 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.
- Wu H, He CL and Fissore RA** (1997). Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol Reprod Dev.*
- 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, H., Yuan, S. Q., Zheng, Z. H. and Yan, W.** (2013). The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis. *Asian J Androl* **15**, 799.
- 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.
- Yamazaki, S., Harata, M., Idehara, T., Konagaya, K., Yokoyama, G., Hoshina, H. and Ogawa, Y.** (2018). Actin polymerization is activated by terahertz irradiation. *Sci Rep* **8**, 9990.
- Yanagimachi, R.** (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* **23**, 193–196.
- 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., 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.

- Yang, F., Gracia Gervasi, M., Orta, G., Tourzani, D. A., de la Vega-Beltrán, J. L., Ruthel, G., Darszon, A., Visconti, P. E. and Wang, P. J. (2022). C2CD6 regulates targeting and organization of the CatSper calcium channel complex in sperm flagella. *Development* **149**,.
- Yoon, S. Y., Jellerette, T., Salicioni, A. M., Hoi, C. L., Yoo, M. S., Coward, K., Parrington, J., Grow, D., Cibelli, J. B., Visconti, P. E., et al. (2008). Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca(2+) release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest* **118**, 3671–3681.
- Yoon, S. Y., Eum, J. H., Lee, J. E., Lee, H. C., Kim, Y. S., Han, J. E., Won, H. J., Park, S. H., Shim, S. H., Lee, W. S., et al. (2012). Recombinant human phospholipase C zeta 1 induces intracellular calcium oscillations and oocyte activation in mouse and human oocytes. *Human Reproduction* **27**, 1768–1780.
- Young, C., Grasa, P., Coward, K., Davis, L. C. and Parrington, J. (2009). Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertil Steril* **91**, 2230–2242.
- 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.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 5879–5884.
- Zepeda-Bastida, A., Chiquete-Felix, N., Uribe-Carvajal, S. and Mujica, A. (2011). The acrosomal matrix from guinea pig sperm contains structural proteins, suggesting the presence of an actin skeleton. *J Androl* **32**, 411–9.
- 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.
- Zhao, Y., Wang, H., Wiesehofer, C., Shah, N. B., Reetz, E., Hwang, J. Y., Huang, X., Wang, T., Lishko, P. v., Davies, K. M., et al. (2022). 3D structure and in situ arrangements of CatSper channel in the sperm flagellum. *Nat Commun* **13**,.

- 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**,.
- Zoppino, F. C. M., Halón, N. D., Bustos, M. A., Pavarotti, M. A. and Mayorga, L. S. (2012).** Recording and sorting live human sperm undergoing acrosome reaction. *Fertil Steril* **97**, 1309–1315.