



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Tesis de Maestría

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área Biología, Subárea Biología Celular y Molecular

Estudio de la función mitocondrial espermática en mamíferos; un papel central en la capacitación.

Lic. Mariana Ford

Directora: Dra. Rossana Sapiro

Co-directora: Dra. Adriana Cassina

Facultad de Medicina, Universidad de la República

Departamento de Histología y Embriología

Departamento de Bioquímica

Índice

Resumen.....	4
1 Introducción.....	6
1.0 Conceptos generales.....	6
1.1 El espermatozoide.....	7
1.2 El espermatozoide de ratón.....	11
1.3 La mitocondria: metabolismo energético y otras funciones.....	13
1.3.1 Las mitocondrias del espermatozoide.....	15
1.4 Capacitación.....	17
1.5 Calcio y capacitación.....	20
1.6 Mitocondrias y capacitación. Rol del Calcio en las mitocondrias del espermatozoide.....	21
2 Hipótesis.....	22
3 Estrategia de investigación y objetivos.....	22
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
3.2.1 Objetivo específico 1.....	23
3.2.2 Objetivo específico 2.....	23
3.2.3 Objetivo específico 3.....	23
4 Materiales y métodos.....	23
4.1 Manejo de animales.....	23
4.2 Consideraciones éticas.....	24
4.3 Obtención de espermatozoides y análisis de motilidad.....	24
4.4 Evaluación de reacción acrosómica con inhibidores mitocondriales.....	25
4.5 Fosforilación en tirosina.....	26
4.6 Fecundación in vitro (FIV).....	26
4.7 Respirometría de alta resolución.....	27
4.8 Análisis de calcio intracelular en célula única con inhibidores mitocondriales.....	28
4.9 Cuantificación automática de parámetros morfológicos en la pieza intermedia.....	29

4.9.1 Preparación de extendidos.....	29
4.9.2 Microscopía.....	30
4.9.3 Procesamiento de imágenes.....	30
4.10 Análisis estadísticos.....	30
5 Resultados.....	31
5.1 Capacitación <i>in vitro</i> : Estandarización de los marcadores de la capacitación.....	31
5.1.1 Aumento en porcentajes de reacción acrosómica.....	31
5.1.2 Aumento en porcentajes de hiperactivación y parámetros asociados.....	33
5.1.3 Fosforilación en tirosina.....	34
5.1.4 Fecundación <i>in vitro</i> (FIV): estandarización del método y obtención de embriones...	35
5.2 Análisis del papel de la mitocondria en la capacitación.....	39
5.2.1 La reacción acrosómica no se ve afectada cuando se inhibe la función mitocondrial.....	40
5.2.2 El porcentaje de hiperactivación y la VCL disminuyen en los espermatozoides cuando se afecta la función mitocondrial.....	41
5.2.3 La fosforilación en tirosina no se ve afectada en espermatozoides capacitados en presencia de antimicina A.....	41
5.2.4 El porcentaje de fecundación disminuye con espermatozoides capacitados en presencia de AA.....	42
5.2.5 Los espermatozoides capacitados presentan una mejor función mitocondrial respecto a los no capacitados.....	43
5.2.6 Calcio intracelular con Fluo-4.....	44
5.2.7 No se observa un aumento significativo del RCR en espermatozoides capacitados en un medio sin calcio.....	47
5.2.8 No se observan diferencias significativas entre el RCR de los espermatozoides capacitados y no capacitados de ratones Catsper KO y Slo3 KO.....	48
5.3 Automatización de cuantificación de parámetros morfológicos en la pieza intermedia.....	50
6 Discusión.....	55
7 Conclusiones.....	60
8 Perspectivas.....	60
9 Agradecimientos.....	61
10 Bibliografía.....	62
11 Apéndices.....	70

Resumen

Durante la migración desde el cérvix al oviducto, los espermatozoides sufren cambios bioquímicos y funcionales conocidos como capacitación, esenciales para lograr la fertilización. Estos cambios incluyen entre otros: modificaciones en el patrón de motilidad espermática (de motilidad progresiva a hiperactivación), reconocimiento y unión a la zona pelúcida que rodea el ovocito, aumento en la fosforilación en residuos de tirosina y exocitosis del acrosoma (reacción acrosómica). El espermatozoide requiere de ATP tanto para lograr la motilidad como para los eventos de la capacitación y este concepto es la base principal en las investigaciones sobre la importancia de la mitocondria en esta célula. Durante la diferenciación, los espermatozoides se desprenden de la mayoría de los componentes celulares innecesarios, pero mantienen en su pieza intermedia mitocondrias formando una vaina mitocondrial helicoidal. Considerando que en numerosas células somáticas la mitocondria juega un papel importante en la generación de energía, señalización, almacenamiento de calcio, producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), parece razonable hipotetizar que la mitocondria podría estar involucrada en otros mecanismos de función mitocondrial, además de la motilidad espermática. En nuestro laboratorio se ha demostrado una correlación entre la función mitocondrial y la motilidad de los espermatozoides humanos en condiciones no capacitantes. En este trabajo, analizamos el rol de la mitocondria en la capacitación. En primer lugar, estandarizamos los marcadores de la capacitación en espermatozoides de ratón: reacción acrosómica (RA), patrones de motilidad, fosforilación en tirosina y fecundación *in vitro* (FIV). Luego estudiamos la función mitocondrial por respirometría de alta resolución en espermatozoides de ratón capacitados y no capacitados encontrando que el índice de control respiratorio (RCR) aumenta en espermatozoides capacitados. Por otro lado, incubamos los espermatozoides con Antimicina A (inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial) y observamos que la droga disminuye el porcentaje de hiperactivación y el número de embriones obtenidos por fecundación *in vitro* pero no afecta el porcentaje de reacción acrosómica inducida ni la fosforilación en tirosina. Además, comparamos la función mitocondrial en espermatozoides de ratones salvajes con mutantes para canales relacionados a la entrada de calcio (Slo3 y CatSper) los cuales no se capacitan y por lo tanto son infértiles. No observamos diferencias significativas en el RCR de los ratones

Catsper KO capacitados y no capacitados. Finalmente, con el objetivo de buscar cambios morfológicos de la mitocondria durante la capacitación que acompañen los cambios funcionales, estandarizamos un sistema para la cuantificación automatizada de los parámetros morfológicos de la pieza intermedia de espermatozoides incubados con Mitotracker Red en imágenes obtenidas por microscopía. El procesamiento de imágenes automatizado fue desarrollado en el software de uso libre FIJI ImageJ. Observamos diferencias en el tamaño de la pieza intermedia en los espermatozoides capacitados relacionados fundamentalmente a la presencia o no del acrosoma.

Tomados en conjunto estos datos sugieren un papel de la función mitocondrial en los cambios del patrón de motilidad que ocurren durante la capacitación espermática que dependen de la entrada de Ca^{2+} por CatSper. Concomitantemente existen cambios morfológicos en la pieza intermedia de los espermatozoides capacitados que se relacionan principalmente con la presencia o no del acrosoma.

1.Introducción

1.0 Conceptos generales

La infertilidad conyugal afecta aproximadamente al 15% de las parejas en edad fértil y puede deberse a factores femeninos, masculinos, una combinación de ambos o puede no tener causa aparente (Adamson and Baker 2003). En el 50% de los casos de infertilidad conyugal existe un factor masculino implicado (De Jonge and Barratt 2019) que se evidencia por un aumento de espermatozoides anormales en el eyaculado (R. John Aitken and John Aitken 2004). Las causas de la infertilidad masculina son heterogéneas y difíciles de dilucidar, conduciendo a que exista inexactitud en el diagnóstico y tratamientos en las clínicas andrológicas, manteniéndose muchos de los casos como idiopáticas (Brugo-Olmedo, Chillik, and Kopelman 2001) (Cannarella et al. 2020).

Luego de la eyaculación, los espermatozoides de mamíferos que abandonan el testículo aún no son aptos para fecundar. Durante su paso por el epidídimo, los espermatozoides sufren alteraciones que involucran tanto el movimiento del flagelo como la adquisición de propiedades necesarias para la penetración del ovocito, especialmente de la zona pelúcida. Estos cambios se denominan colectivamente maduración (Sullivan and Mieusset 2016). Para adquirir su capacidad fecundante los espermatozoides deben completar aún otro proceso en el aparato reproductor femenino denominado capacitación (Austin and Bishop 1958) (Chang 1951). Como resultado de la capacitación, los espermatozoides adquieren una forma especial de motilidad conocida como hiperactivación y la posibilidad de sufrir una reacción acrosómica regulada (Yanagimachi, R 1994) (Gervasi and Visconti 2016). Sin embargo, las bases celulares y moleculares de estos procesos aún no se conocen completamente (Marín-Briggiler et al. 2021). Específicamente, la fuente de ATP necesaria para sostener la motilidad y los cambios metabólicos que se producen durante la capacitación son controvertidos y parecen ser especie-específicos (Giaccagli et al. 2021). Los espermatozoides pierden la mayoría de sus organelos durante la etapa de diferenciación, pero mantienen un número variable de mitocondrias en el flagelo. Las mitocondrias desempeñan varias funciones además de la producción de ATP (relacionadas con señales intracelulares, metabolismo del calcio, producción de ROS y muerte celular), por lo que el análisis de los cambios morfofuncionales de

las mitocondrias espermáticas durante estos procesos puede ayudar a la comprensión de los fenómenos relacionados con la fertilidad e infertilidad.

Dada la complejidad del proceso de fertilización, y las connotaciones éticas, morales y legales que conllevaría su análisis *in vivo* o *in vitro*, el mismo no puede estudiarse fácilmente con gametos humanos. Para este y otros casos, los modelos animales se han convertido en una alternativa viable en la investigación biomédica (Jamsai and O'Bryan 2011). Los ratones son los modelos animales más comúnmente utilizados en todos los campos de experimentación, incluyendo la biología de la reproducción. Los ratones poseen un ciclo reproductivo corto con camadas grandes, son pequeños y poseen condiciones de mantenimiento, manejo y transporte relativamente accesibles (<https://www.jax.org>). En particular, la espermatogénesis y ovogénesis de los ratones es comparable a la de los humanos (Church et al. 2009). Pero lo más importante es que se pueden manipular genéticamente con herramientas moleculares y esta habilidad para manipular el genoma de ratón es lo que lo hace un modelo de investigación tan relevante. En las últimas décadas, se han producido y puesto a disposición de investigadores muchos tipos de modelos de ratones, incluyendo *knockout/knockin* y modelos transgénicos (<https://www.jax.org>). En esta tesis se eligió el modelo de ratón para intentar comprender el rol de la mitocondria en la capacitación espermática.

1.1 El espermatozoide

El espermatozoide es una célula muy particular y altamente especializada cuya función biológica es fecundar al ovocito y transmitir su contenido genético (Mohanty and Samanta 2018). Se trata de una célula haploide, producto final de un proceso de división y diferenciación denominado espermatogénesis (figura 1) en el que se reduce el contenido genético, y se generan estructuras como el acrosoma y el flagelo, eventos que son acompañados de una pérdida de la mayoría del contenido citoplasmático de la célula. Las células germinales masculinas reducen el número diploide de cromosomas al comenzar la pubertad, manteniendo este proceso continuamente a lo largo de toda su vida (Neill 2006).

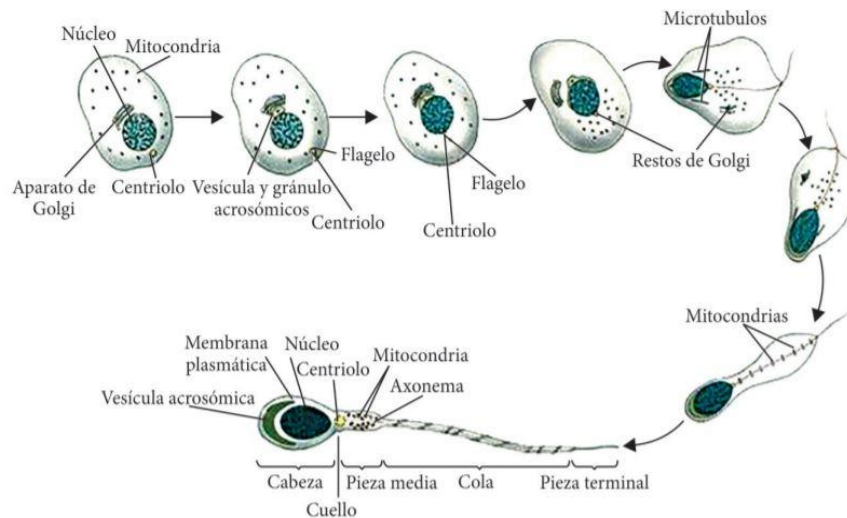


Figura 1: Representación esquemática del proceso de espermatogénesis en un espermatozoide mamífero (Gilbert 2010).

El espermatozoide maduro es una célula polarizada con una estructura de cabeza nuclear en un extremo y un flagelo en el otro, que le permite propagarse a través del tracto genital femenino (Nozawa et al. 2014) (Figura 2). En la cabeza se encuentran el núcleo y el acrosoma. El núcleo contiene el material genético en forma de cromatina altamente condensada. En la zona anterior se encuentra el acrosoma, vesícula que se origina del complejo de Golgi y que contiene enzimas hidrolíticas esenciales para que el espermatozoide consiga penetrar las capas que rodean al ovocito y se logre la fecundación (Uzman 2003).

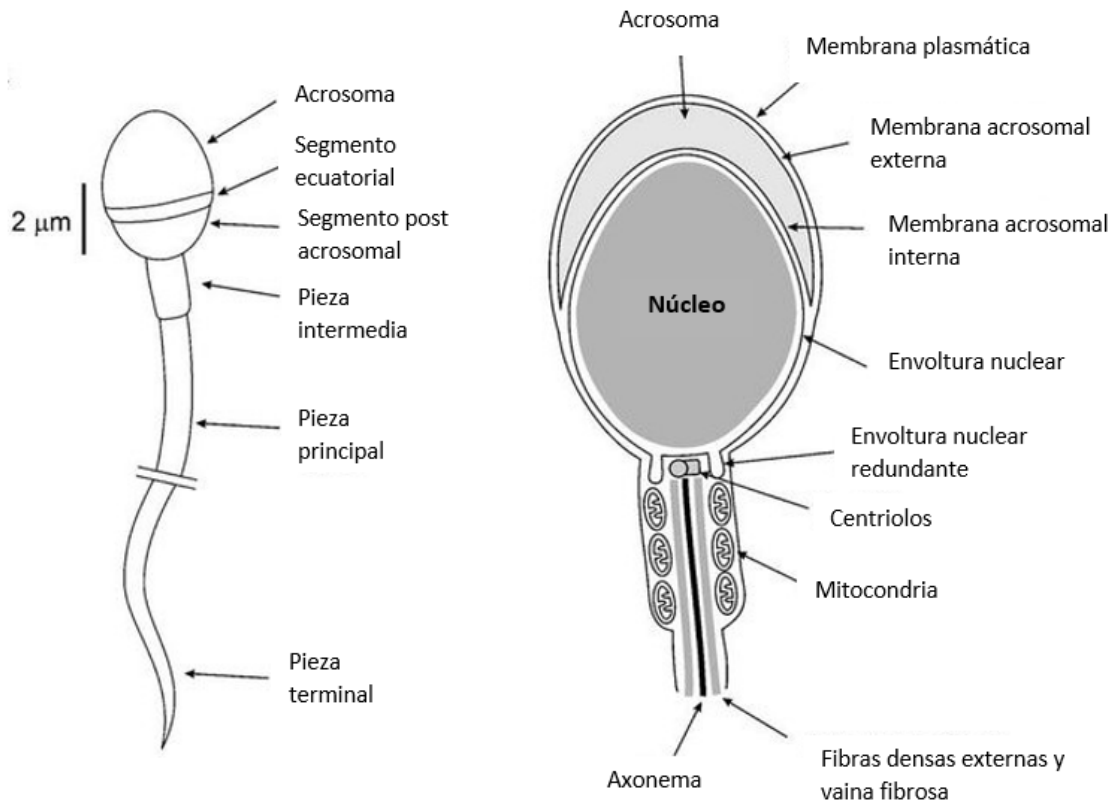


Figura 2: Diagrama de espermatozoide humano. Componentes de la cabeza y flagelo (izquierda). Estructura de la cabeza y pieza intermedia en mayor detalle (derecha). Obtenido, modificado y traducido de (Darszon et al. 2005)

Desde el cuello, el flagelo se divide sucesivamente en pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. La integridad estructural del flagelo espermático es un requisito para la motilidad espermática y sus defectos se asocian con la infertilidad masculina (Linck, Chemes, and Albertini 2016). La estructura interna del flagelo se denomina axonema, presenta una formación $9 + 2$ constituida por microtúbulos y se encuentra rodeada de 9 fibras densas desde el cuello hasta la pieza intermedia. En la pieza principal dos de ellas forman una vaina fibrosa que se dispone rodeando a las 7 fibras densas restantes.

Durante la espermatogénesis, las mitocondrias, que se encuentran originalmente en el citoplasma periférico, migran y se acumulan alrededor de la porción proximal del filamento axial (la pieza intermedia). El movimiento de las mitocondrias se asocia con la pérdida de una gran proporción de citoplasma como cuerpo residual (Holstein 1976). Los mecanismos que generan y mantienen la disposición organizada de las mitocondrias en la pieza intermedia son poco conocidos. Éstas se disponen, en número variable según la especie, formando una vaina compacta en donde las mitocondrias permanecen unidas mediante puentes disulfuro (Olson and Winfrey 1990), (Otani et al. 1988) siguiendo una disposición helicoidal (H.-C. Ho and Wey 2007) (Figura 3).

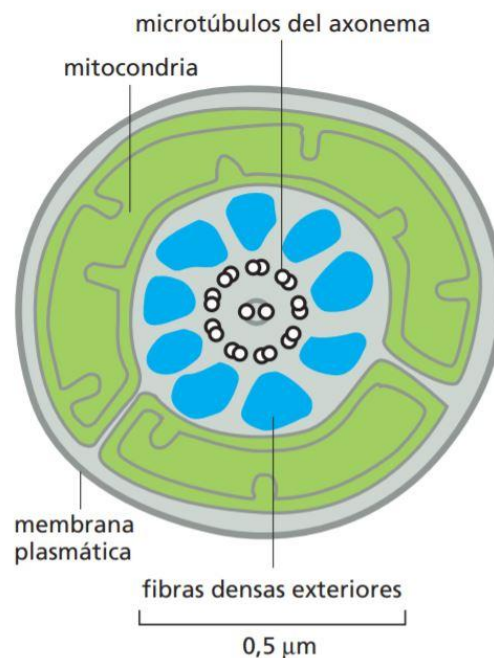


Figura 3: Esquema de la pieza intermedia en sección transversal de un espermatozoide mamífero. El centro del flagelo está formado por un axonema rodeado por nueve fibras densas. Las mitocondrias se distribuyen en una disposición espiral alrededor del axonema. (Alberts, Biología molecular de la célula, 5ta Ed.)

1.2 El espermatozoide de ratón

Aunque la mayoría de los espermatozoides de mamíferos presentan las mismas características generales, hay diferencias sustanciales específicas de cada especie, como tamaño y forma de la cabeza, largo del flagelo y tamaño relativo de cada uno de sus componentes (Knobil 2006) (Figura 4).

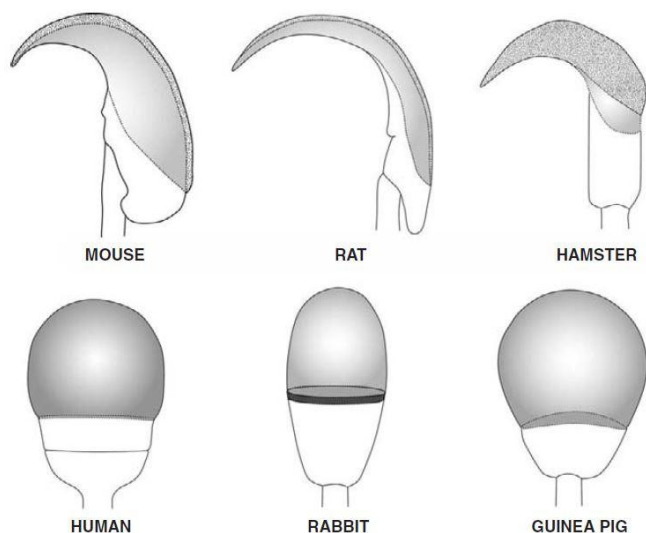


Figura 4: Diagrama lateral de espermatozoides de cabeza falciforme (ratón, rata y hámster) y espatulada (humano, conejo y cobayo). Los tamaños y formas varían considerablemente entre las distintas especies (Knobil and Neills, 2006).

Los espermatozoides de ratón se diferencian en los túbulos seminíferos a lo largo de toda la vida de un animal normal adulto. Esta diferenciación, que abarca desde las células primordiales (denominadas espermatogonias) hasta los espermatozoides, tarda alrededor de 13 semanas para que una espermatogonia produzca alrededor de 120 espermatozoides. Luego, los espermatozoides maduran pasando por el epidídimo y realizan la capacitación al entrar en contacto con el tracto reproductivo femenino tras la monta o mediante capacitación *in vitro*. (Benavides and Guénet 2003).

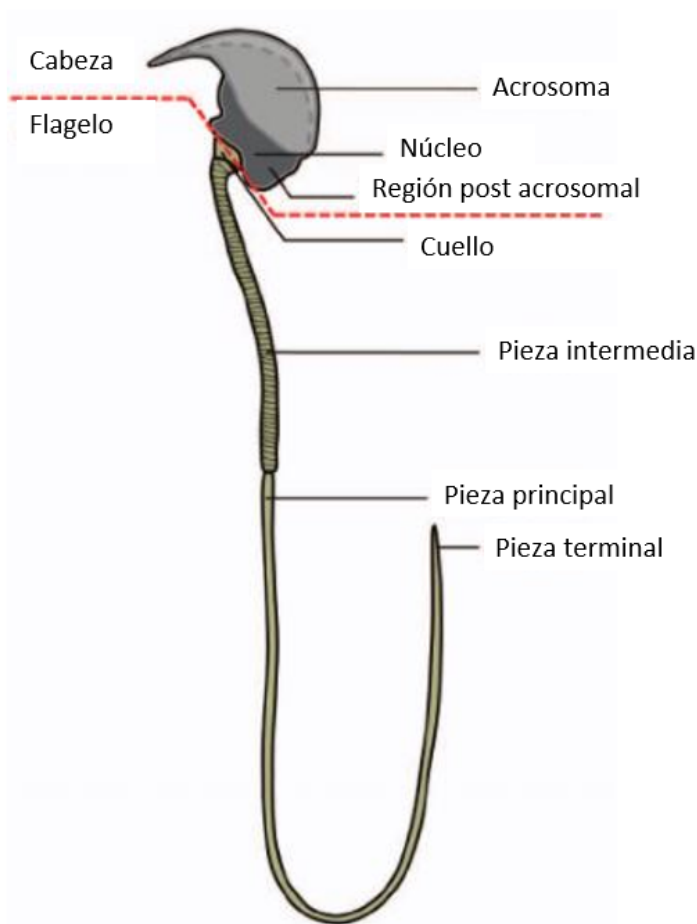


Figura 5: Esquema de las regiones del espermatozoide de ratón. Cabeza (acrosoma, núcleo y región postacrosomal) y flagelo (cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal). Obtenido y traducido de (Zitanski et al. 2010).

El espermatozoide de ratón, al igual que el de la rata y el hámster, posee una cabeza falciforme o en forma de gancho que se compone por tres partes: el núcleo, el acrosoma y la zona post acrosomal. El núcleo ocupa la mayor parte de la cabeza. El acrosoma se posiciona sobre el núcleo en la región anterior-dorsal de la cabeza y contiene numerosas enzimas que facilitan el pasaje de los espermatozoides a través de la capa de células del cumulus y la zona pelúcida durante la fertilización. (Yi Wen Li et al, 2013). (Figura 5). El espermatozoide de ratón maduro mide alrededor de 120 μm de largo total. El ancho de la cabeza mide aproximadamente 4 μm y

el largo 8 μm . La pieza intermedia del flagelo mide 20 μm aproximadamente (Albrechtová et al. 2014).

1.3 La mitocondria: metabolismo bioenergético y otras funciones

Las mitocondrias desempeñan funciones que son vitales para la célula: suministran energía en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa, proporcionan intermediarios metabólicos para la biosíntesis de macromoléculas, señalizan en la vía de la apoptosis, almacenan Ca^{2+} , y producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por su siglas en inglés) que sirven como segundos mensajeros (Brand and Nicholls 2011). (Figura 6).

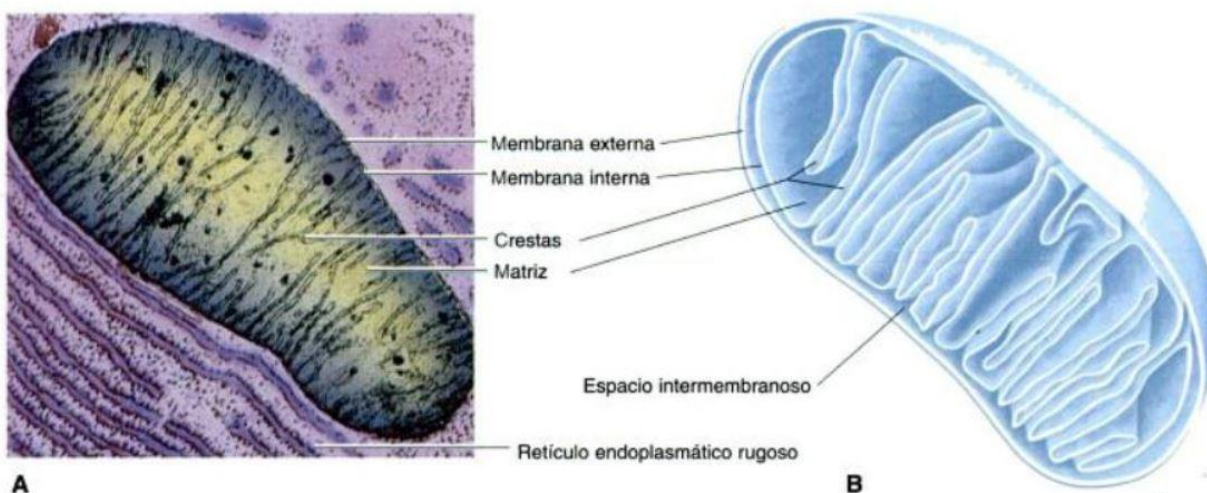


Figura 6: Estructura y compartimientos de la mitocondria. A) Microfotografía electrónica de una mitocondria animal. B) Diagrama de corte transversal de una mitocondria. (Extraída de Bioquímica de Voet y Voet, 2006).

Mediante la fosforilación oxidativa la mitocondria es capaz de generar 36 o 38 moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa (Lenhinger 2005). El transporte de electrones a lo largo de los complejos ubicados en la membrana interna mitocondrial libera energía acoplada a la salida de protones desde la matriz al espacio intermembrana (Voet and Voet 2006) (figura 7). Este movimiento genera un gradiente electroquímico, utilizado por la ATP sintasa que permite el ingreso de protones a la matriz sintetizando moléculas de ATP (Voet and Voet 2006)

El oxígeno es el aceptor final de electrones reduciéndose a agua, esto ocurre a nivel de la citocromo oxidasa (complejo IV de la cadena de transporte de electrones). En condiciones normales una pequeña cantidad de oxígeno, entre el 0.2-0.5%, sufre una reducción parcial por un electrón a nivel del complejo I y III, formando superóxido (O_2^-). La formación del radical libre O_2^- aumenta frente a un daño o en presencia de inhibidores de los complejos del transporte de electrones como la Antimicina A (inhibidor del complejo III) o la rotenona (inhibidor del complejo I). En la cadena respiratoria mitocondrial es donde se produce la mayor cantidad de O_2^- a nivel celular (Valez et al., n.d.). En la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana se encuentran enzimas antioxidantes: i) *la superóxido dismutasa*, que cataliza la dismutación del superóxido formando a peróxido de hidrógeno (otra especie oxidante), que difunde a través de las membranas ii) *la peroxirredoxina 3*, la cual reduce el peroxinitrito (A. Cassina and Radi 1996) (A. M. Cassina et al. 2000) (Radi 2013). El O_2^- formado en la mitocondria puede reaccionar con óxido nítrico a concentraciones equimolares ($k=10^{10} M^{-1}s^{-1}$) formando peroxinitrito ($ONOO^-$), una especie altamente oxidante y nitrante (Richter and Matthias Schweizer 2002) .

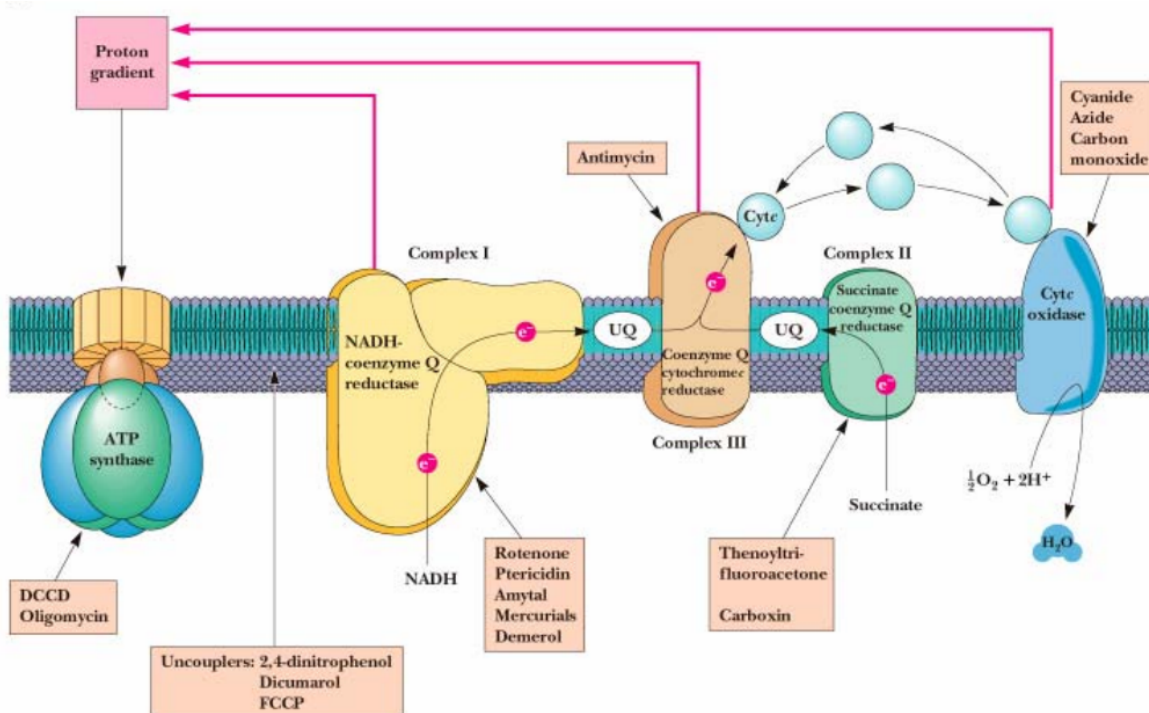


Figura 7: Diagrama esquemático de los componentes de la cadena de transporte de electrones dentro de la membrana mitocondrial interna. (Garret and Grisham 1999)

Las mitocondrias también juegan un papel central en la homeostasis del Ca^{2+} celular (Contreras et al. 2010). La entrada de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial está mediada por un canal iónico, el mCU (Elustondo et al. 2017). Recientemente, se ha sugerido que las mitocondrias pueden expresar más de una mCU, se ha propuesto una vía alternativa de entrada de Ca^{2+} (un anti puerto de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$). La entrada de Ca^{2+} a través de la mCU está impulsada por el potencial de membrana (dentro negativo; $\Delta\Psi_m$) que existe a través de la membrana mitocondrial interna. Dado que $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico en estado de reposo es de alrededor de 100 nM y el $\Delta\Psi_m$ debido a la actividad de la cadena respiratoria es de ~ -180 mV, la predicción es que, en equilibrio electroquímico, $[\text{Ca}^{2+}]_m$ podría alcanzar valores tan altos como 0,1 M. La captación de Ca^{2+} mitocondrial se consideró como un mecanismo de reservorio que se pone en acción cuando se producen elevaciones patológicas de Ca^{2+} citosólico. Pero el metabolismo oxidativo mitocondrial depende de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la matriz mitocondrial (Denton 2009).

Un funcionamiento anormal de alguno de los procesos en los que actúa la mitocondria se podría catalogar como disfunción mitocondrial pudiendo ser la causa de diversas enfermedades (Brand and Nicholls 2011). Actualmente, se ha relacionado el mal funcionamiento mitocondrial con enfermedades como cáncer, envejecimiento, Parkinson, Alzheimer o diabetes (Ailshul 1975) e incluso la presencia de espermatozoides defectuosos en el eyaculado (Adriana Cassina et al. 2015). El estudio del consumo de oxígeno por la cadena respiratoria, nos aporta datos sobre el estado funcional de los sistemas de transferencia de electrones, la fosforilación oxidativa y del metabolismo intermediario (Brand and Nicholls 2011), por lo que es una herramienta para entender función y disfunción mitocondrial.

1.3.1 Las mitocondrias del espermatozoide

Los espermatozoides son células altamente especializadas que poseen sus funciones metabólicas muy compartimentadas entre la cabeza y el flagelo (Zitanski et al. 2010). Durante el proceso de diferenciación en el testículo los espermatozoides pierden la mayor parte de sus organelos y contenido citoplasmático. Sin embargo, como se indicó, conservan un importante número de mitocondrias (figura 8).

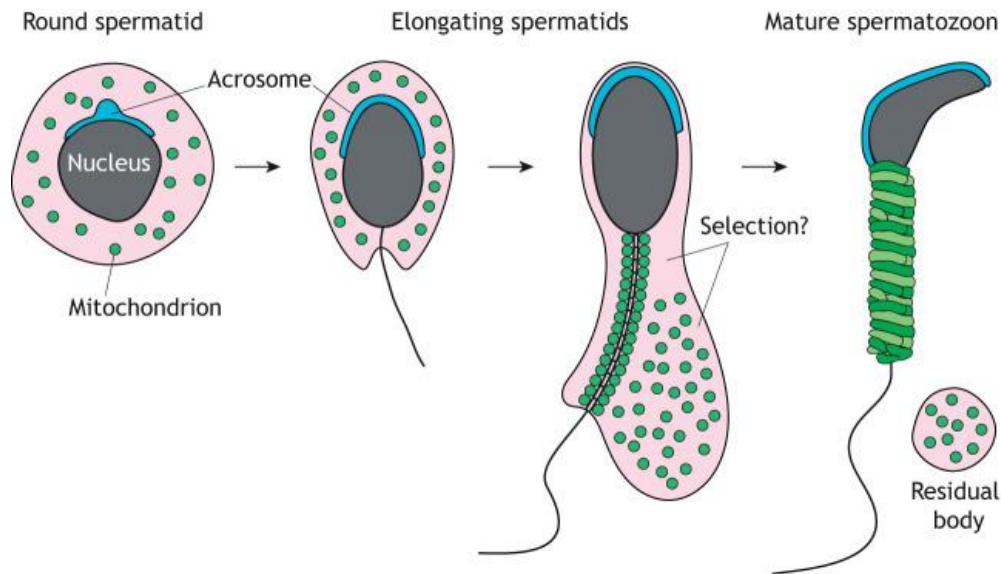


Figura 8: Esquema enfatizado en la formación del acrosoma y reorganización mitocondrial. Durante la elongación de la espermátida un grupo de mitocondrias se alinean en la pieza intermedia mientras el resto son transferidas a cuerpos residuales para su degradación fagocítica en las células de Sertoli. El acrosoma (azul) es otro organelo que sufre una reorganización drástica durante la espermiogénesis. (Varuzhanyan and Chan 2020)

Estas son diferentes morfológica y bioquímicamente a las de las células somáticas (Ailshul 1975). Se encuentran exclusivamente en la pieza intermedia, en un número variable (entre 50-75 en el ratón), formando una vaina helicoidal y unidas por puentes disulfuro alrededor del axonema (Robert J. Aitken 2017). Por otro lado, muchas proteínas y enzimas son isoformas específicas en los espermatozoides (Yang et al. 2011), y estas isoformas pueden permitirle a las células espermáticas modular diferentes funciones mitocondriales en diferentes estadios de la fertilización (Luo, Schatten, and Sun 2013).

Existe evidencia indicando que la morfología y función mitocondrial son importantes para la actividad del espermatozoide (Moraes and Meyers 2018). Por ejemplo, en pacientes infértiles con trastornos de la motilidad espermática, el número de mitocondrias es menor al de individuos normales (Mundy, Ryder, and Edmonds 1995). Fallas en el preciso ordenamiento mitocondrial podrían conducir a alteraciones de la motilidad espermática en pacientes astenozoospermicos (Bartoov and Messer 1976) (Mundy, Ryder, and Edmonds 1995). Del mismo modo, el volumen así como alteraciones en la ultraestructura de la membrana mitocondrial también han sido reportados como determinantes en la motilidad y batido flagelar y

por ende asociados a astenozoospermia e infertilidad (Cardullo and Baltz 1991) (Pelliccione et al. 2011).

Como las mitocondrias se ubican en la pieza intermedia espermática de mamíferos y la fosforilación oxidativa produce más ATP por molécula de glucosa que la glucólisis, la respiración ha sido históricamente considerada como la fuente principal de producción de ATP para la motilidad espermática, dejando la glucólisis en un segundo lugar (Hammerstedt and Lardy 1983) (Tourmente et al. 2015). Sin embargo, también es posible que debido a que las mitocondrias están restringidas a la primera parte del flagelo, adyacente a la cabeza del espermatozoide, es poco probable que el ATP se pueda distribuir lo suficientemente rápido por todo lo largo del flagelo por difusión simple para mantener la motilidad (Nevo and Rikmenspoel 1970) (Takao and Kamimura 2008). Además, la motilidad espermática se mantiene en presencia de inhibidores de la fosforilación oxidativa pero no en presencia de inhibidores de la glucólisis (Mukai and Okuno 2004) (Williams and Ford 2001). Por otro lado, se ha demostrado que la glucólisis es esencial para la producción de ATP en el espermatozoide mediante el uso de modificaciones genéticas en ratones. Los ratones KO para la *Gadphs* (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, espermátogénica) son infértiles (Miki et al. 2004) y los ratones KO de *Pgk2* (fosfoglicerato quinasa 2) son severamente subfértiles (Danshina et al. 2010), debido a una motilidad espermática disminuida y bajos niveles de ATP. En contraste, los ratones KO de *Cyct* (citocromo c, testicular), una proteína esencial para la respiración mitocondrial, son fértiles (Narisawa et al. 2002) (Odet et al. 2013).

Existe, también, un amplio rango de variación entre los espermatozoides de las especies de mamíferos con respecto al principal mecanismo de producción de ATP en estas células (Tourmente et al. 2015).

1.4 Capacitación

Como se ha mencionado, durante la migración desde la cervix al oviducto, los espermatozoides sufren ciertos cambios bioquímicos y funcionales conocidos como capacitación, esenciales para lograr la fertilización (Austin and Bishop 1958) (Chang 1951). Estos cambios incluyen: modificaciones en el patrón de motilidad espermática (de motilidad progresiva a hiperactivación), reconocimiento y unión a la zona pelúcida que rodea el ovocito y exocitosis del acrosoma (figura 9). El cambio de patrón en la motilidad durante la capacitación se conoce

como hiperactivación. Los movimientos del espermatozoide observados en el estado de hiperactivación se caracterizan por ondas flagelares asimétricas, de gran amplitud y velocidad, los cuales determinan trayectorias no progresivas (Zaferani, Suarez, and Abbaspourrad 2021) (Burkman 1984). Este tipo de movimiento asegura la penetración por la zona pelúcida, capa mucosa que rodea al ovocito, otra de las barreras que debe sobrepasar el espermatozoide para lograr la fecundación (Kozlovsky and Gefen 2012). Durante la capacitación, los espermatozoides también adquieren la capacidad de sufrir reacción acrosómica (RA). En la RA el espermatozoide libera el contenido del acrosoma, hacia el exterior celular por exocitosis. El acrosoma contiene enzimas que colaboran en la penetración de la matriz extracelular que rodea al ovocito, incluida la zona pelúcida (ZP) (Breitbart 2002) (Florman 1994). Además, la liberación de esta vesícula puede permitir la unión a la ZP ya sea por la ahora expuesta membrana acrosomal interna o membrana plasmática (Ryuzo Yanagimachi and Phillips 1984) (Simons and Fauci 2018).

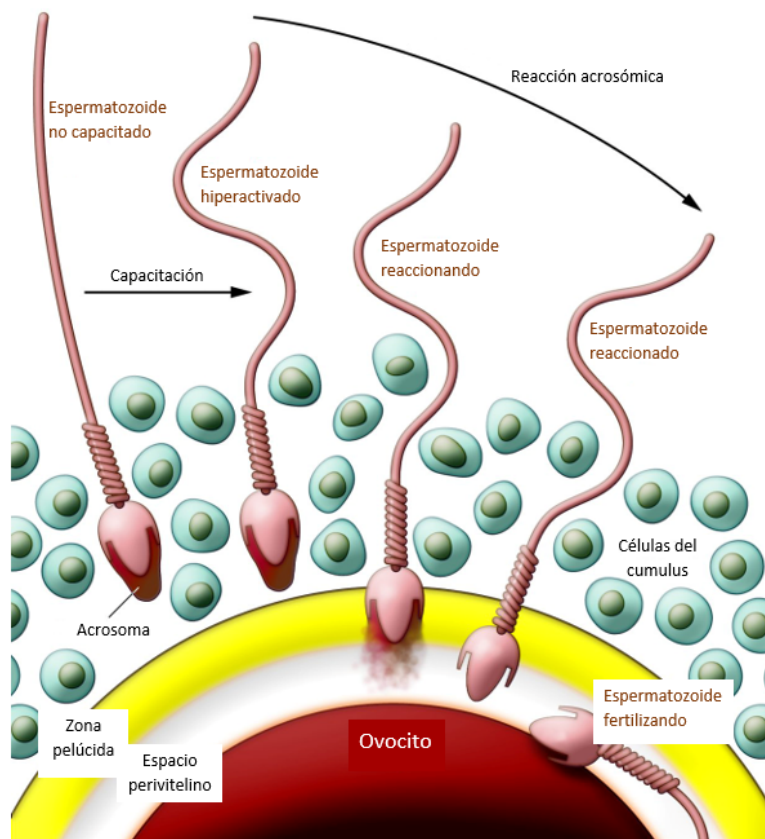


Figura 9: Diagrama del mecanismo de interacción entre el espermatozoide y el ovocito. La capacitación se lleva a cabo luego de la eyaculación en el sistema reproductor femenino. (Extraído y traducido de (Ikawa et al. 2010).

Estos cambios se correlacionan con varias modificaciones a nivel molecular. Durante la capacitación existe pérdida del colesterol de la membrana plasmática con aumento de la fluidez de la misma y cambios en la permeabilidad iónica (Pablo E. Visconti et al. 2011). La capacitación involucra además, aumento del pH intracelular y cambios en el potencial de membrana. Con respecto a los cambios en el potencial de membrana, se ha visto que los espermatozoides de varias especies se hiperpolarizan durante la capacitación (Hernández-González et al. 2006) y que esta hiperpolarización es necesaria para que la hiperactivación y la RA tengan lugar (Chávez et al. 2014). Además, durante la capacitación existe aumento de la actividad de la *protein kinase A* dependiente de la estimulación de la síntesis del AMP cíclico (Krapf et al. 2010) acompañada de aumento en la fosforilación en tirosina de muchas proteínas, probablemente claves en los fenómenos de hiperactivación y RA (Arcelay, Alvarez, and Storey, n.d.; Salicioni et al. 2007; Stival et al. 2016; Gervasi and Visconti 2016)).

Se considera que un espermatozoide está completamente capacitado cuando puede experimentar hiperactivación y una reacción acrosómica regulada, pero si alguno de estos procesos falla, la fecundación no se lleva a cabo (Darszon et al. 2011).

La capacitación se puede lograr *in vitro*, incubando los espermatozoides en medios que remedan la composición de iones y metabolitos presentes en el tracto genital femenino (R. Yanagimachi 1981) (P. E. Visconti et al. 1995), con requerimiento absoluto de Ca^{2+} , HCO_3^- , una fuente de proteína y una fuente de energía (Hidalgo et al. 2020). La fuente de proteína, en general albúmina de suero bovino (BSA), induce cambios en los niveles de colesterol de la membrana plasmática, causando cambios en su fluidez y aumentando la permeabilidad a Ca^{2+} y HCO_3^- . El aumento en niveles iónicos resultante dentro del compartimiento intracelular estimula la actividad de la adenil ciclasa, aumentando cAMP, fosforilación de *protein kinase A* y fosforilación de tirosina (P. E. Visconti et al. 1995) (P. E. Visconti and Kopf 1998) (Sansegundo, Tourmente, and Roldan 2022). La omisión de alguna de estas moléculas en la incubación espermática bloquea su habilidad para adquirir capacidad fecundante. Más aún, existe evidencia sugiriendo que, *in vitro*, sólo una fracción de espermatozoides se capacitan (Hidalgo et al. 2020).

1.5 Calcio y capacitación

El ion Ca^{2+} es una señal intracelular altamente versátil que puede regular un amplio rango de procesos celulares. Cada tipo celular expresa un conjunto único de componentes para los sistemas de señalización (Berridge, Bootman, and Roderick 2003). En el espermatozoide, el calcio es considerado un regulador de la motilidad, participante de la capacitación y segundo mensajero esencial para la reacción acrosómica (Wennemuth, Babcock, and Hille 2003).

Los espermatozoides dependen de rápidos intercambios de iones intraflagelares y esto es mediado por un grupo selecto de canales iónicos (figura 10). Uno de esos canales es CatSper, un canal de calcio de los espermatozoides de mamíferos. CatSper es el principal mecanismo para importar calcio extracelular al interior de la cola espermática, y es por tanto, vital para la fecundación. Los espermatozoides deficientes de CatSper no se hiperactivan y los ratones mutantes son infértiles, aunque presentan RA y fosforilación en tirosina normal (Lishko and Mannowetz 2018). Además, los espermatozoides KO para CatSper presentan un contenido de ATP bajo con respecto a los ratones salvajes (Xia et al. 2007).

Slo3 es un canal de potasio que controla la entrada de Ca^{2+} a través de los canales CatSper durante el proceso de capacitación. Los espermatozoides de los ratones KO para este canal no se hiperactivan y presentan una RA disminuida (Chávez et al. 2014). La delección genética de este canal también provoca infertilidad en ratones machos.

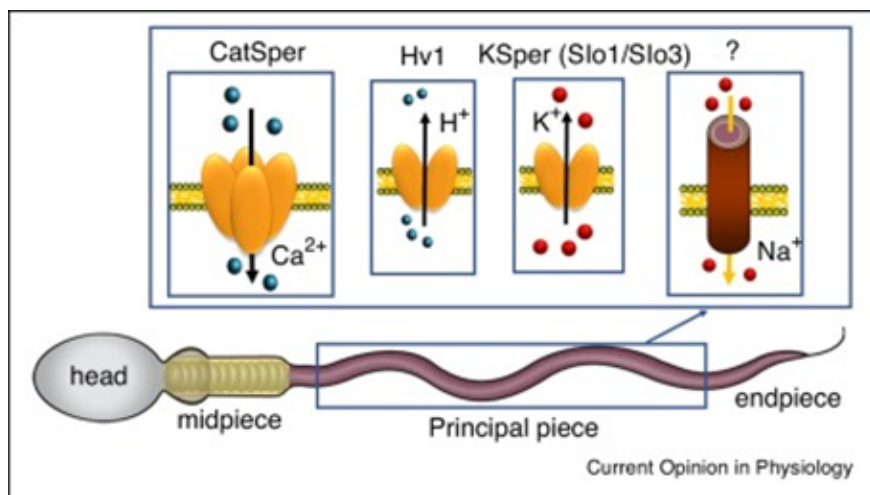


Figura 10: Representación esquemática de un espermatozoide humano con sus compartimientos celulares y la distribución de canales iónicos de la pieza principal. Entre ellos: CatSper, canal de calcio y Slo3, canal de potasio. (Lishko et al., 2018.)

1.6 Mitochondrias y capacitación. Rol del Calcio en las mitochondrias del espermatozoide

Los mecanismos moleculares que se producen como consecuencia de la entrada de calcio durante la capacitación no se comprenden completamente. La capacitación también se asocia con un aumento en la función mitocondrial (Ferramosca and Zara 2014). Si bien, como se dijo, en muchas especies la glucólisis parece ser la fuente principal de ATP para mantener la motilidad espermática (Mukai and Okuno 2004) (Nascimento et al. 2008), otros estudios muestran que la actividad mitocondrial de los espermatozoides aumenta durante la capacitación tanto en humanos (Stendardi et al. 2011), como en ratones (Boell 1985) y equinos (Leemans et al. 2019). En otros modelos celulares, la entrada regulada de calcio en las mitochondrias regula el metabolismo mitocondrial (McCormack et al. 1990) (Glancy and Balaban 2012) (Simpson and Russell 1998) (O-Uchi et al. 2013) pero esto no ha sido suficientemente estudiado en el espermatozoide. Por otro lado, existen evidencias de la existencia de reservorios internos de calcio en el espermatozoide los cuales son fundamentales para la propagación de las señales de este ion. Si bien el retículo endoplásmico (representado en el espermatozoide por estructuras vesiculares que se encuentran en el cuello y la parte anterior de la pieza intermedia) es el organelo que tradicionalmente es considerado como reservorio de calcio, otros organelos entre ellos las mitochondrias, también contribuyen a la generación y propagación de señales complejas de Ca^{2+} al menos dentro de las células somáticas (Michelangeli, Ogunbayo, and Wootton 2005) (Correia, Michelangeli, and Publicover 2015). Se han identificado transportadores de Ca^{2+} dentro de estos organelos; y muchos de ellos se encuentran en los espermatozoides (Costello et al. 2009). Por ejemplo el mCU, ubicado en la MMI transporta calcio hacia la mitocondria y su presencia ha sido identificada en la mitocondria espermática (Elustondo et al. 2017).

2. Hipótesis

Durante la capacitación existen modificaciones morfofuncionales en las mitocondrias espermáticas que son necesarias para lograr la capacidad fecundante del espermatozoide.

3. Estrategia de investigación y objetivos

Los espermatozoides deben capacitarse para poder fecundar el ovocito y muchos de los mecanismos moleculares en la base de este proceso se desconocen. Específicamente, el papel de la mitocondria no se conoce totalmente. Teniendo esto en cuenta, nos propusimos profundizar en el estudio de la función mitocondrial en este proceso, analizando si podía relacionarse con la entrada de calcio a la célula.

En primera instancia, estandarizamos algunos métodos que permitieran determinar la capacitación en espermatozoides de ratón.

Luego analizamos cambios en la función mitocondrial de espermatozoides de ratones salvajes comparando con animales genéticamente modificados que no se capacitan por falta de entrada de calcio al flagelo. La función mitocondrial se estudió midiendo el consumo de oxígeno en los espermatozoides capacitados y no capacitados, con un respirómetro de alta resolución (HRR). Se analizará si se modifican los parámetros de capacitación estandarizados en presencia de inhibidores mitocondriales.

Finalmente, quisimos analizar si podrían existir cambios morfológicos en las mitocondrias de la pieza intermedia durante la capacitación que acompañaran posibles cambios de la función mitocondrial. Para obtener parámetros objetivos de cuantificación de estos cambios, se automatizó este proceso trabajando en colaboración con ingenieros del grupo IMAGINA.

3.1 Objetivo general:

Estudiar cambios de la función y morfología de las mitocondrias asociados a la adquisición de la capacidad fecundante del espermatozoide de ratón.

Para alcanzar nuestro objetivo se plantearon 3 objetivos específicos:

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Objetivo específico 1: Estandarizar los marcadores de la capacitación en espermatozoides de ratón (RA, patrones de motilidad, fosforilación en tirosina y FIV)

3.2.2 Objetivo específico 2: Analizar la función mitocondrial en espermatozoides de ratones en la capacitación. Comparar la función mitocondrial en espermatozoides de ratones salvajes (WT) con mutantes (KO) para canales relacionados a la entrada de calcio (Slo3 y CatSper) los cuales no se capacitan y por lo tanto son infértiles.

3.2.3 Objetivo específico 3: Analizar cambios morfológicos de las mitocondrias de los espermatozoides en la capacitación mediante la automatización de la cuantificación de intensidad de fluorescencia y parámetros morfológicos de la pieza intermedia de espermatozoides incubados con Mitotracker Red en imágenes obtenidas por microscopía.

4. Materiales y métodos

4.1 Manejo de animales

Los animales se mantuvieron en el bioterio bajo un ciclo de 12hs de luz/12 hs de oscuridad, a una temperatura constante de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con acceso libre a comida y agua. Los espermatozoides fueron obtenidos de ratones machos CB6F1/J (12–16 semanas de edad) y ratones knock out para Catsper (12-16 semanas de edad) (Ren et al, 2001). Los ovocitos fueron obtenidos de ratones hembra CB6F1/J (4-8 semanas de edad). Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

4.2 Consideraciones éticas

Todos los experimentos fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Uruguay-CHEA.

4.3 Obtención de espermatozoides y análisis de motilidad

Los espermatozoides fueron obtenidos del cauda epididimario de ratones machos y se depositaron en medio TYH (NaCl 119.3mM, KCl 4.7mM, CaCl₂·2H₂O 1.71mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄·7H₂O 1.2mM, NaHCO₃ 25.1mM, Glucosa 5.56mM, Piruvato de sodio 0.51mM, Rojo fenol (1%) 0.0006%) por 60 min a 37°C y 5% CO₂ para inducir la capacitación.

Las suspensiones de espermatozoides fueron cargadas en cámaras CELL-VU precalentadas (profundidad 20µm) (DRM-600, Millennium Sciences, Inc. CELL-VU®, NY) y colocadas en una platina a 37°C. Los movimientos espermáticos fueron examinados utilizando un sistema de análisis computarizado (CASA, por sus siglas en inglés) (SCA, Microptic, Barcelona, España). El microscopio utilizado fue Nikon (Japón) Eclipse E200 con contraste de fase 100X equipado con cámara acA780-75gc Basler (Alemania). Los seteos utilizados incluyen los siguientes: adquisición: 30; frecuencia: 60 Hz; tamaño de la cabeza: 5-70. Los espermatozoides con motilidad hiperactivada se clasificaron usando los siguientes parámetros: ALH>8µm, VCL>180µm/s y LIN<50 µm. Al menos 500 espermatozoides fueron analizados en cada ensayo. (Figura 11)

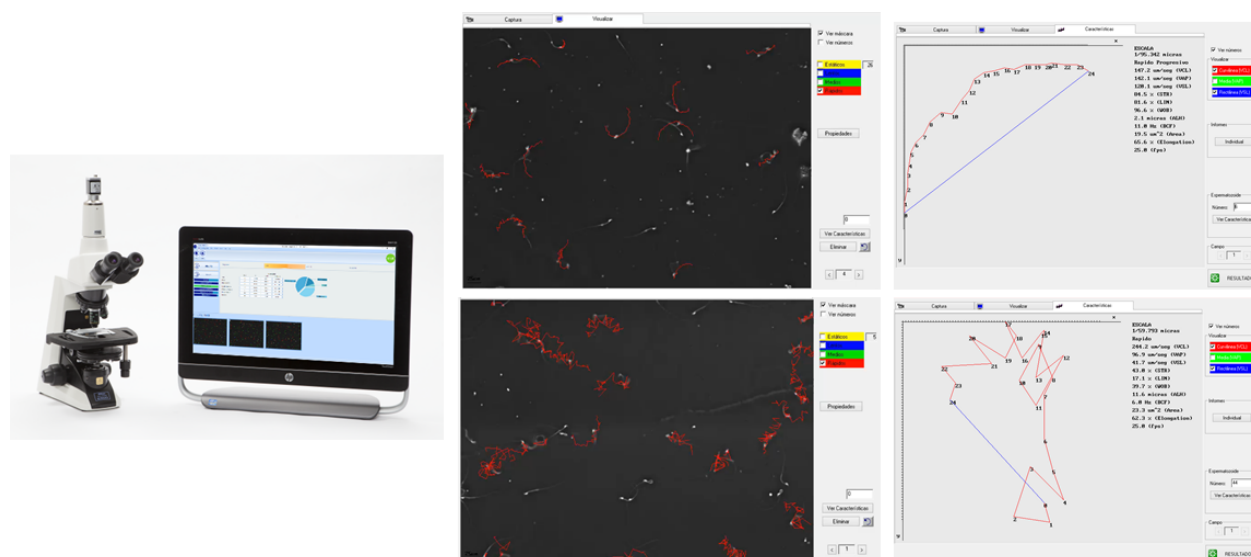


Figura 11: Análisis de motilidad con sistema computarizado SCA. Se categorizan los espermatozoides por su motilidad progresiva (rápida o lenta), no progresiva o estática. Además se obtienen los resultados de cinética de cada espermatozoide: VCL, velocidad curvilínea (µm/s), ALH, amplitud del movimiento lateral de la cabeza (µm),

LIN, linearidad y STR, rectitud, entre otras. Con estos datos se puede cuantificar el porcentaje de espermatozoides hiperactivados. Arriba) Muestra no hiperactivada y espermatozoide no hiperactivado. Abajo) Muestra hiperactivada y espermatozoide hiperactivado.

4.4 Evaluación de reacción acrosómica con inhibidores mitocondriales

Los espermatozoides se capacitaron en presencia de 2.5 μ M antimicina A (Sigma-Aldrich) inhibidor del complejo 3 de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, o con vehículo. Se extendieron 15 μ l de muestra de cada suspensión de espermatozoides en un portaobjetos y los espermatozoides se fijaron en PAF 4% por 30 minutos, seguido de dos lavados de 5 minutos cada uno en PBS. Los extendidos de espermatozoides se incubaron con azul de Coomassie (0.22% Coomassie Blue G-250 (Thermo Scientific, Massachusetts), 50% metanol, 10% ácido acético glacial, 40% agua) por 2 minutos. Transcurrido este tiempo se lavaron con agua destilada para remover el exceso de colorante. Los extendidos se dejaron secar y se colocaron los cubreobjetos utilizando medio de montaje. Los espermatozoides teñidos se examinaron con microscopio en campo claro a 400X (Nikon E100, Japón) para cuantificar el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado. Los espermatozoides con acrosoma intacto se distinguen fácilmente de aquellos reaccionados. Se evaluaron un mínimo de 200 espermatozoides por condición.

4.5 Fosforilación en tirosina

Luego del *swim out*, los espermatozoides no capacitados fueron centrifugados a 500xg y las células fueron resuspendidas en buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 0,1 %, EGTA 1 mM, pirofosfato de sodio 25 mM, SDS 0.1% e inhibidor de proteasas y proteasas (*Minc Tablets Thermo Fisher*)). Se sonicaron durante 5 segundos y luego fueron centrifugadas a 14000g durante 10 minutos a 4°C. Se siguió el mismo procedimiento con los espermatozoides capacitados y capacitados con AA, luego de la capacitación *in vitro*. Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C. Se determinó la concentración de proteínas por Bradford.

Posteriormente, se corrieron las proteínas en geles de poliacrilamida entre 10-12% con SDS (SDS-PAGE). Estos fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Odyssey) a 20V, 4 °C durante toda la noche. Luego las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente en TBS 0.1% tween-20 y 5% BSA. El anticuerpo primario utilizado fue anti-fosfo tirosina monoclonal ratón (pY20, Invitrogen). Se incubaron con agitación durante toda la noche a 4°C. Se revelaron incubando 1 hora a temperatura ambiente con anti-ratón IR Dye 800CW. Las señales fueron detectadas usando Odyssey CLx.

4.6 Fecundación *in vitro* (FIV)

Se estimuló la superovulación de ratones hembra mediante la administración intraperitoneal de 7,5UI gonadotrofina coriónica equina eCG o PMSG por sus siglas en inglés (Syntex, Argentina) seguido de gonadotrofina coriónica humana 7,5UI (hCG) (Intervet, Holanda) 48 horas después. Pasadas 12 a 15 horas luego de la inyección de hCG las hembras fueron sacrificadas y sus oviductos removidos. El complejo cumulus-ovocito fue aislado en gotas de 250µl de medio TYH. Se colocaron 30-50 ovocitos por placa de fertilización y se añadió la suspensión de espermatozoides previamente capacitados, con o sin AA, dependiendo de la condición del experimento. Los embriones se cultivaron *in vitro* hasta la etapa de dos células (24 horas después) y se contaron para calcular la tasa de fecundación.

4.7 Respirometría de alta resolución

El estudio de la función mitocondrial en el espermatozoide se realizó midiendo el consumo de oxígeno en las células espermáticas. Los ensayos se realizaron en un respirómetro de alta resolución (Oroboro), utilizando un software (DatLab, versión 4.2; Oroboros Instruments GmbH). Se midió la velocidad de consumo de oxígeno (OCR) en tiempo real expresándose como flujo de oxígeno en $\text{pmol O}_2/10^6$ células/segundo. El consumo basal de los espermatozoides se midió durante 10 minutos, luego se añadieron $2 \mu\text{g/ml}$ de oligomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en la cámara para bloquear la ATP sintasa mitocondrial. A continuación se agregan bolos de $0.5 \mu\text{M}$ del desacoplante de la fosforilación oxidativa, FCCP (Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona, Sigma-Aldrich) hasta que no aumente más el consumo de oxígeno (titulación para obtener la máxima respiración). Finalmente, se agregan $2.5 \mu\text{M}$ de Antimicina A (Sigma-Aldrich) para distinguir la respiración mitocondrial de la residual (no dependiente de la cadena de transporte de electrones), como se ha descrito previamente (Cassina et al, 2015). Se evaluó un total de 15 millones de espermatozoides/ml en cada condición con velocidad de agitación a 750 rpm. Los parámetros que se obtiene del registro son: respiración basal (figura 12-a, que ocurre en ausencia de inhibidores mitocondriales y representa la suma de todos los procesos mitocondriales que consumen oxígeno), la respiración vinculada a la síntesis de ATP (figura 12-c OCR sensible a la adición del inhibidor de la ATP-sintasa oligomicina), la respiración independiente de ATP (Fig12-b, respiración resistente a la oligomicina). La tasa de respiración máxima es obtenida después de la titulación con el FCCP (figura 12-d). A todos estos parámetros se le resta por último la adición de un inhibidor de la cadena respiratoria (rotenona o antimicina A) para descartar todo el consumo de oxígeno que no es mitocondrial (figura 12-e). Se determinaron también los siguientes índices respiratorios, que al ser relaciones entre los parámetros están internamente normalizadas (Brand & Nicholls, 2011): Capacidad respiratoria de reserva: (respiración máxima /respiración basal), Eficiencia de acoplamiento (relación entre la respiración ligada a producción de ATP y la respiración basal) y el índice de control respiratorio (RCR; la relación entre la tasa de respiración máxima y la resistente a oligomicina). Nuestro trabajo se basó principalmente en el RCR que es la relación entre la respiración máxima y la respiración en presencia de oligomicina (d/b en la figura 12) y es análogo al RCR de las mitocondrias aisladas. Es sensible a los cambios en la oxidación del sustrato y la fuga de protones, pero no a la cantidad de ATP.

Debido a que es una relación de dos tasas, la relación de control respiratorio celular tiene las mismas dos ventajas principales que la eficiencia del acoplamiento: sensibilidad a varios sitios potenciales de disfunción y normalización interna. En principio, es un excelente marcador de la disfunción mitocondrial en las células, pero el requisito de una titulación cuidadosa de FCCP. Esto se realizó en las células intactas lo que permitió el análisis de la actividad mitocondrial en su propio ambiente, expuestas a sustratos en concentraciones fisiológicas y en interacción con el citoplasma, membrana plasmática y demás organelos celulares (Brand and Nicholls 2011).

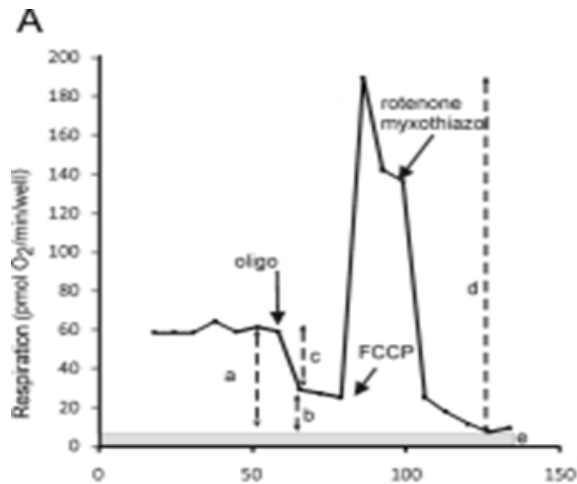


Figura 12: Esquema indicando los parámetros mitocondriales. RCR, Índice de control respiratorio: FCCP (d) / Oligo (b); Síntesis de ATP, tasa de síntesis de ATP mitocondrial en estado basal: basal (a) – Oligo (b); Eficiencia de acople, Fracción de consumo de oxígeno basal mitocondrial utilizado para síntesis de ATP: Basal (a) – Oligo (b)/ Basal (a). (Brand, et al. 2011)

4.8 Análisis de calcio intracelular en célula única con inhibidores mitocondriales

Se obtuvieron espermatozoides de ratones WT y se capacitaron en presencia de inhibidores y desacoplante mitocondriales (AA 2,5μM y FCCP 3μM, respectivamente) o control. Durante la capacitación también se cargaron con 2 μM de Fluo4-Am y 0.02% de ácido plurónico. Las células fueron adheridas en portaobjetos cubiertos previamente con laminina 1mg/mL por 10 minutos y luego se lavaron con medio capacitante para retirar el exceso. Se obtuvieron las imágenes utilizando un microscopio Leica DMI8 equipado con cámara Zyla Andor sCMOS y las

imágenes se tomaron con una exposición de 1.5ms cada 10s. Para el control se añadió 50 mM KCl pH 7,4 y ionomicina 2uM. Las imágenes se analizaron utilizando el software libre ImageJ, las ROIs se seleccionaron automáticamente. Los cambios en la concentración de calcio fueron normalizados luego de la sustracción de la fluorescencia basal. Los datos fueron analizados con pCLAMP10.6 y GraphPad Prism.

4.9 Cuantificación automática de parámetros morfológicos de la pieza intermedia

4.9.1 Preparación de extendidos

Se obtuvieron los espermatozoides de ratón según se detalló anteriormente. Luego de un lavado de los mismos (centrifugación 600g, 10 minutos) fueron resuspendidos en medio TYH e incubados con Mitotracker Red durante 30 minutos. MitoTracker Red (CMXRos M7512, Thermo Fisher, USA) difunde pasivamente a través de la membrana plasmática y se acumula en la mitocondria activa, marcando la pieza intermedia de la cola espermática. Luego de esto se realizaron extendidos que fueron fijados en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron los extendidos con Lectina PNA (Lectin PNA from *Arachis hypogaea* (peanut) conjugado con Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, USA) a una concentración de 15 ug/ml, durante 30 minutos. La lectina PNA se une a los residuos de beta-galactosa de la membrana acrosomal externa, y permite evaluar la RA y contabilizar el porcentaje de espermatozoides reaccionados e intactos. Para comprobar que la incubación de los espermatozoides con las sondas fluorescentes no afecta la funcionalidad espermática se analizó la capacidad fecundante de los espermatozoides pre-incubados 30 minutos con Mitrotracker red o en condiciones normales, mediante FIV en ratones. Los embriones se cultivaron *in vitro* hasta la etapa de embrión de dos células y/o blastocisto donde fueron contados para calcular la tasa de fecundación.

4.9.2 Microscopía

Los extendidos se observaron con microscopio de epifluorescencia Olympus IX81, con objetivo de inmersión de aceite 100X 1.4 NA (excitación: $\lambda=488$ nm y $\lambda=543$ nm). Se obtuvieron imágenes de al menos 100 piezas intermedias fluorescentes para cada condición y se corroboró la integridad de los espermatozoides verificando con campo claro la correspondencia con su respectiva cabeza y cola.

4.9.3 Procesamiento de imágenes

Se umbralizaron automáticamente las piezas intermedias de los espermatozoides capacitados para el canal de mitotracker con el método de máxima entropía (Kapur et al., 1985). Previamente todas las imágenes fueron convolucionadas con un kernel Gaussiano para reducir el ruido y suavizar la señal. Las regiones de interés (ROIs) obtenidas fueron analizadas automáticamente para mantener solamente piezas intermedias aisladas y bien definidas. Finalmente, se realizó una operación matemática de morfología para remover picos y redondear las formas. Estos procesos obtienen una ROI bien definida al segmentar las piezas intermedias del espermatozoide sin ningún conocimiento previo de su condición de reaccionado o no reaccionado. El proceso automático se programó en Python y en ImageJ/FIJI (Schindelin et al. 2012). Se midieron varios parámetros para cada ROI, por ejemplo, área, intensidad de fluorescencia, densidad integrada, perímetro, diámetro de Feret, entre otros. Los espermatozoides se clasificaron manualmente como reaccionados (R, presencia de señal fluorescente con lectina en el acrosoma) o no reaccionados (NR, ausencia de señal fluorescente). Los valores obtenidos se agruparon en las dos clases dadas por R y NR y se analizaron estadísticamente.

4.10 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA <http://www.graphpad.com>). Se utilizó la prueba *t Student* pareado para las medidas de porcentajes de reacción acrosómica, porcentaje de hiperactivación y parámetros asociados, FIV e índices mitocondriales de espermatozoides no capacitados y capacitados, o capacitados control y capacitados en presencia de inhibidor mitocondrial. También se utilizó *t Student* no pareado en análisis de área e intensidad de

fluorescencia en piezas intermedias con Mitotracker. La significancia estadística está indicada por un $p < 0.05$.

5. Resultados

Objetivo 1

5.1 Capacitación *in vitro*: Estandarización de los marcadores de la capacitación

Para corroborar la efectividad de la capacitación *in vitro* se analizaron los parámetros que se ha descrito se modifican de forma característica durante este proceso: hiperactivación, reacción acrosómica y fosforilación en tirosina. Antes y después de la capacitación, se evaluó la motilidad en el sistema CASA, se realizaron extendidos para cuantificar el porcentaje de reacción acrosómica (RA) y western blot para la fosforilación en tirosina. Además se puso a punto la técnica de fecundación *in vitro* (FIV).

5.1.1 Aumento en porcentajes de reacción acrosómica

Para cuantificar la reacción acrosómica se utiliza la técnica de tinción con azul de coomassie, donde el acrosoma intacto se observa teñido de azul y por el contrario, no se observa acrosoma teñido en las cabezas de los espermatozoides que sufrieron la reacción acrosómica. Los espermatozoides reaccionados se distinguen fácilmente de los no reaccionados al microscopio (figura 13).

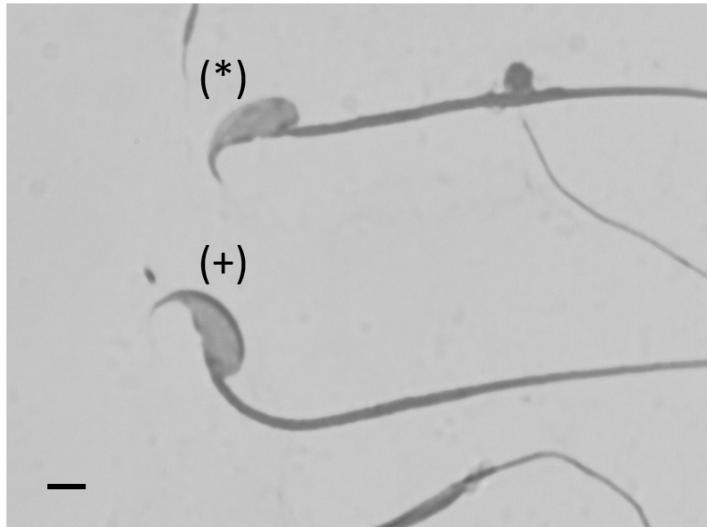


Figura 13: Espermatozoides de ratón con tinción de azul de coomassie, (*) indica reaccionado y (+) indica acrosoma intacto. La barra corresponde a 5μm.

Se contabilizaron al menos 200 espermatozoides por condición en cada experimento y se clasificaron como reaccionado o no reaccionado. Con estos valores se calcularon los porcentajes de reacción acrosómica. La diferencia es significativa con un $p < 0,0001$, siendo la media $\pm$ error estándar de los NC=8,9 $\pm$ 1,0 y C=37,2 $\pm$ 3,9 (*t student*, pareado) (figura 14).

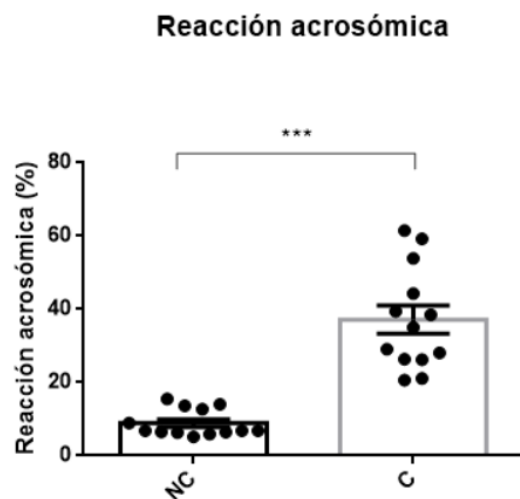


Figura 14: Porcentajes de reacción acrosómica en espermatozoides de ratón no capacitados (NC) y capacitados (C). La diferencia es significativa con un $p < 0,0001$ con prueba *t Student* pareado, siendo la media $\pm$ error estándar de los NC=8,9 $\pm$ 3,7 y C=37,2 $\pm$ 13,9.

5.1.2 Aumento en porcentajes de hiperactivación y parámetros asociados.

En el sistema CASA es posible predeterminar los valores de cinética espermática para obtener el porcentaje de espermatozoides hiperactivados. En este caso los valores de corte fueron: ALH>8 μ M, VCL>180 μ m/s y LIN<50 μ m. Se observan también las trayectorias individuales de cada espermatozoide con sus velocidades representadas y se logran detectar patrones de motilidad característicos de la hiperactivación (figura 15). La velocidad curvilínea (VCL, μ m/s) es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo y la velocidad rectilínea (VSL, μ m/s) es la distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer punto y el último de su trayectoria. Además calcula la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media (VAP, μ m/s).

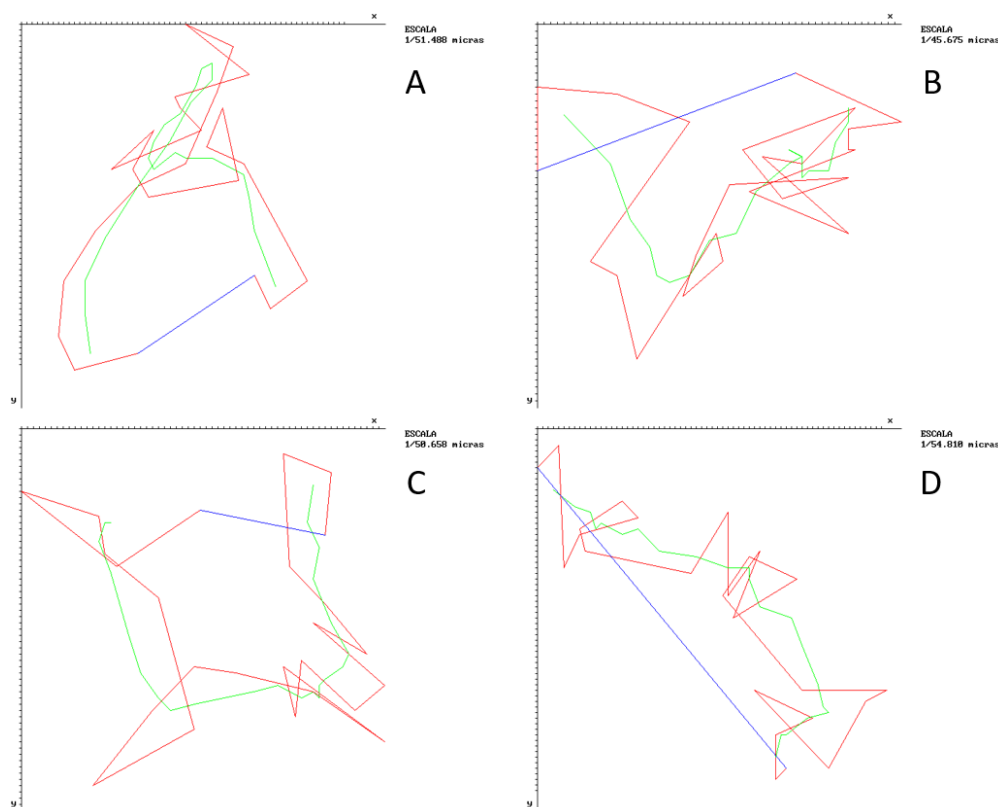


Figura 15: Representación esquemática de las velocidades calculadas en las trayectorias de cuatro espermatozoides hiperactivados, detectados en sistema CASA. En rojo se representa la velocidad curvilínea (VCL), en verde la velocidad media (VAP) y en azul la velocidad rectilínea (VSL).

La diferencia entre los valores obtenidos para cada condición se corresponde con los esperados, aumentando el porcentaje de hiperactivación en los espermatozoides capacitados. El análisis estadístico pareado de *t Student* para no capacitados y capacitados arrojó un $p=0,0012$ (figura 16).

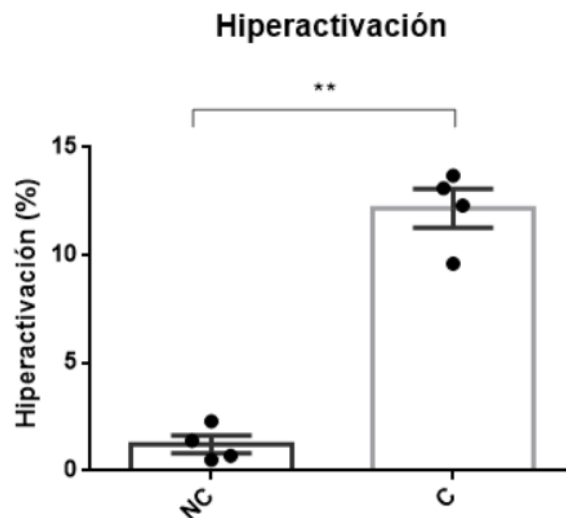


Figura 16: Porcentajes de hiperactivación en espermatozoides de ratón no capacitados (NC) y capacitados (C). La diferencia es significativa con un $p=0,0012$ en prueba *t Student* pareado, siendo la media $\pm$ error estándar de los NC=1,2 $\pm$ 0,4 y C=12,2 $\pm$ 0,9.

5.1.3 Fosforilación en tirosina

Otro de los marcadores que se utilizaron para corroborar el estado de la capacitación *in vitro* fue la fosforilación proteica, específicamente en residuos de tirosina. Se realizaron *western*

blots de las proteínas obtenidas de espermatozoides no capacitados y capacitados. Se observó un incremento de la fosforilación en espermatozoides capacitados (figura 17).

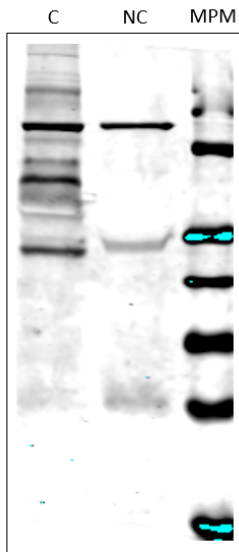


Figura 17: *Western Blot* representativo de los análisis de fosforilación en residuos de tirosina en proteínas de espermatozoides capacitados y no capacitados.

5.1.4 Fecundación *in vitro* (FIV): estandarización del método y obtención de embriones

Aunque la técnica para realizar la FIV en ratones está bien descrita, se requiere de una meticulosa puesta a punto inicial para lograr altos porcentajes de fecundación. Los pasos para alcanzar este objetivo varían desde la simple preparación de materiales hasta la delicada manipulación de embriones. Se elaboran y esterilizan las pipetas para la manipulación del embrión, dejando su punta redondeada para asegurarse de no dañarlo al entrar en contacto con los bordes y se preparan las placas con las gotas de lavado y fecundación. Los medios que se utilizan deben estar al pH y temperatura indicados, ya sean para capacitación de espermatozoides como para obtención de ovocitos y posterior fecundación.

El rendimiento de cada cepa es diferente para esta técnica y dependiendo de su trasfondo genético pueden variar tanto en la superovulación como en la tasa de fecundación (Byers, Payson, and Taft 2006). Se realizaron pruebas de superovulación con hembras Balb/c y

hembras C57BL/6 para comparar los resultados y utilizar la cepa que logre minimizar el uso de animales obteniendo más cantidad de ovocitos. Se obtuvo más cantidad de ovocitos por hembra utilizando la cepa Balb/c. Otro punto importante fue la concentración de hormona suministrada, llegando al mejor resultado con 7,5UI/mL.

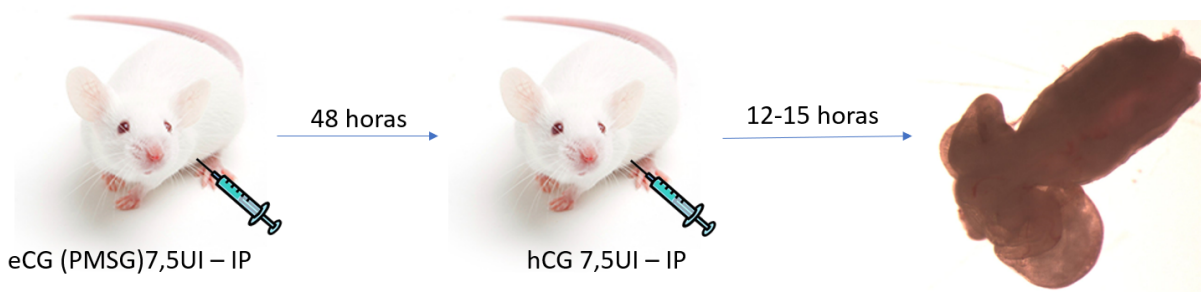


Figura 18: Esquema de protocolo de fecundación *in vitro* en ratones hembra Balb/c. Para la superovulación se inyectan 7,5UI de eCG (PMSG) de manera intraperitoneal y 48hs después, de la misma forma, se inyectan 7,5UI de hCG. 12 a 15 horas después se sacrifican las hembras por dislocación cervical y se colectan los oviductos. Posteriormente, bajo lupa y en medio TYH 37°C se rasgan las ámpulas para obtener los ovocitos.

Para la inducción de superovulación se inyectaron 7,5UI de eCG (PMSG) a cada hembra madura (mayor a 4 semanas de edad) de manera intraperitoneal. 48hs después, de la misma forma, se inyectaron 7,5UI de hCG. Se extrajeron de las hembras superovuladas los oviductos (ámpulas) entre 15 y 17Hs luego de la administración hCG (figura 18). Para esto se sacrificaron las hembras superovuladas por dislocación cervical, se esterilizó la región ventral inferior y se realizó un corte de los tejidos epiteliales dejando al descubierto el aparato reproductor. Se cortaron los fragmentos de oviductos con cuidado de no rasgar las ámpulas que contienen los ovocitos. Se colocaron en una placa con medio TYH completo de donde se recuperaron los complejos cúmulo-ovocito (COCs) bajo lupa (figura 19). Los COCs se pipetearon en el menor volumen de medio posible y se llevaron a la placa de lavado donde se realizó un pasaje por cada gota de medio (total de 3 lavados). Bajo lupa, se los dividió según el número de placas de fertilización a utilizar para cada experimento y se los distribuyó en cada

una de ellas. Estas últimas se dejaron en estufa a 37°C, 5% CO₂ hasta el momento en que se inocularon los espermatozoides en cada placa de fertilización.

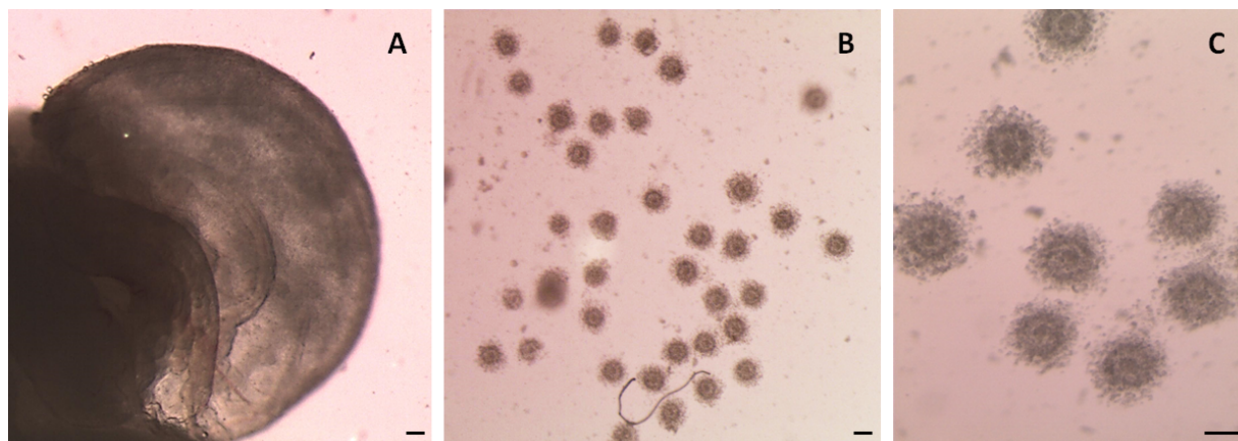


Figura 19: Oviducto obtenido post superovulación de ratones hembra donde se observa el ámpula (A). El complejo cumulus-ovocito fue aislado en gotas de medio (B y C). Las barras indican 50 µm.

La capacitación de espermatozoides se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente en machos C57BL/6. Se obtuvieron los *cuada* epididimarios de ratones machos de 3 a 6 meses de edad, previa dislocación cervical del animal. Luego de la limpieza de la región ventral inferior se realizó un corte de los tejidos epiteliales dejando al descubierto la zona del aparato reproductor. Los cauda se colocaron en una placa con una gota de medio TYH completo (pH 7.3) cubierta por aceite donde se realizaron pequeños cortes y se los llevó a la estufa (37°C, 5% CO₂) por 15 minutos para permitir el swim out de los espermatozoides. Luego se retiraron los epidídimos y se llevó la muestra a analizar al sistema CASA del cual obtenemos los valores de motilidad y concentración iniciales de la muestra. Luego, se llevó la placa con la muestra nuevamente a la estufa, y se los dejó capacitando durante 1hs 30min. Cuando realizamos FIV con diferentes condiciones separamos la muestra en varios tubos o placas luego del swim out y previo a la capacitación. Culminado el tiempo de capacitación, se realizó nuevamente el análisis por CASA para medir los parámetros de motilidad y concentración nuevamente. Cuando la capacitación se realizó en presencia de un inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial (ejemplo AA), la muestra se centrifugó a baja velocidad para retirarlo y se analizó nuevamente en CASA. De acuerdo a la condición final de parámetros de los espermatozoides se calculó el volumen del inóculo a usar con los ovocitos a razón de un millón de espermatozoides por inóculo.

Se dejaron las placas de fertilización (ovocitos + espermatozoides) durante 24Hs en la estufa (37°C, 5% CO₂). Transcurrido este tiempo se observaron bajo lupa y se separaron los ovocitos fecundados (estadio de dos células) de los no fecundados y fueron contabilizados para obtener el porcentaje de fecundación de cada experimento. Los embriones se transfirieron a una nueva gota de medio M16 o Global Total para su pasaje a blastocisto si se deseaba llegar a este estadio (figura 20).

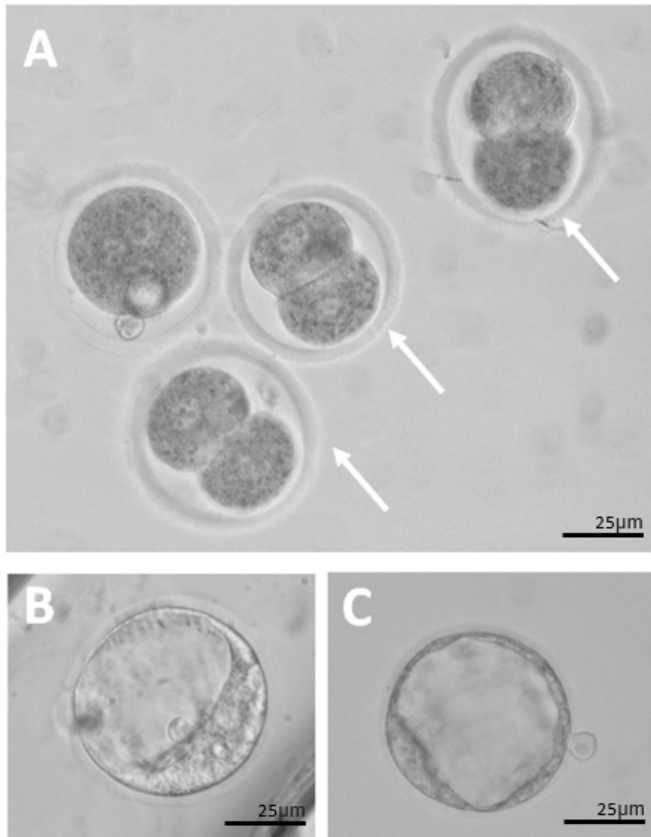


Figura 20: Embriones de ratón obtenidos mediante FIV. A) Embriones de 2 células (indicados con flechas) 24 horas post fertilización. B y C) embriones en estadio de blastocisto, 4,5 días post fertilización.

Objetivo 2

5.2 Análisis del rol de la mitocondria en la capacitación

5.2.1 La reacción acrosómica no se ve afectada cuando se inhibe la función mitocondrial

El porcentaje de reacción acrosómica se midió utilizando la tinción de Coomassie Blue, contando como mínimo 200 espermatozoides por condición. Se realizaron extendidos de espermatozoides no capacitados, capacitados control, capacitados en presencia de antimicina A, capacitados inducidos con progesterona (100 μ M) y capacitados inducidos con progesterona en presencia de AA (figura 21). La diferencia entre el porcentaje de espermatozoides reaccionados no capacitados y capacitados control es significativa, siendo el $p=0,0003$ en el análisis estadístico *t student* pareado. La media $\pm$ SEM del porcentaje de espermatozoides reaccionados de los no capacitados es de $6,53\pm0,15$ y la de los capacitados control es $28,30\pm2,53$. Sin embargo, al comparar el efecto de la AA sobre la reacción acrosómica, no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de espermatozoides capacitados control y los capacitados en presencia del inhibidor mitocondrial tanto en RA espontánea como en inducida con progesterona.

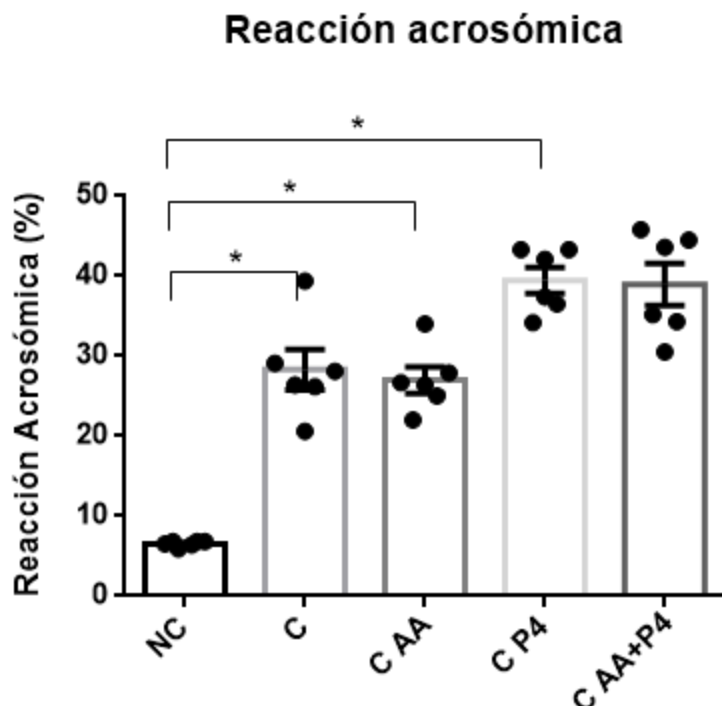


Figura 21: Porcentaje de reacción acrosómica en espermatozoides no capacitados, capacitados, capacitados en presencia de AA, capacitados inducidos con progesterona y capacitados inducidos con progesterona en presencia de AA. La diferencia entre el %RA de espermatozoides no capacitados y capacitados control es significativa ($p=0,0003$). La media $\pm$ SEM NC=6,53 $\pm$ 0,15 y Cap Ctl=28,30 $\pm$ 2,53. No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de espermatozoides capacitados control y los capacitados en presencia del inhibidor mitocondrial tanto en RA espontánea como en inducida con progesterona ($p=0,66$ y $p=0,85$, respectivamente).

5.2.2 El porcentaje de hiperactivación y la VCL disminuyen en los espermatozoides cuando se afecta la función mitocondrial

Se utilizó un sistema de análisis computarizado (CASA) para el estudio de la motilidad. Se analizaron al menos 500 espermatozoides por condición en cada experimento. En cada campo el sistema captura 25 imágenes por segundo, lo que permite reconstruir la trayectoria de cada espermatozoide y clasificarlo de acuerdo a su tipo de motilidad: tipo a progresivo rápido, tipo b progresivo lento, tipo c no progresivo y tipo d inmóvil. Además, este sistema cuantifica los valores cinéticos del movimiento espermático y los expresa como la media de la población

estudiada. Se obtuvieron los valores de la velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), es decir, la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo. Este parámetro aumenta durante la capacitación pero se observó que la VCL es menor en los espermatozoides capacitados en presencia de AA (figura 22). Esta diferencia es significativa con un $p=0,0030$ siendo la media $\pm$ error estándar de la VCL control $69,33\pm7,94$ y la de capacitados con AA $39,28\pm6,37$.

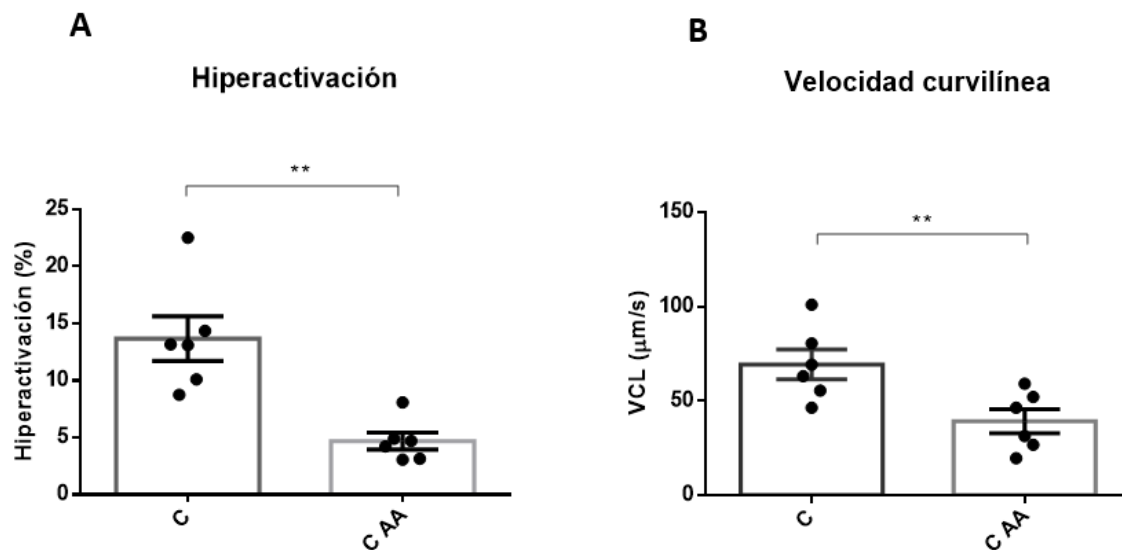


Figura 22: A) Porcentaje de hiperactivación es menor en espermatozoides capacitados en presencia de AA. B) La VCL es menor en los espermatozoides cuando se afecta la función mitocondrial. Esta diferencia es significativa con un $p=0,0030$ en prueba *t Student* pareado siendo la media $\pm$ error estándar de la VCL control $69,33\pm7,94$ y la de capacitados con AA $39,28\pm6,37$

5.2.3 La fosforilación en tirosina no se ve afectada en espermatozoides capacitados en presencia de antimicina A

Al capacitar los espermatozoides en presencia de AA no se observan diferencias en el patrón de fosforilación en tirosina con los espermatozoides capacitados control.

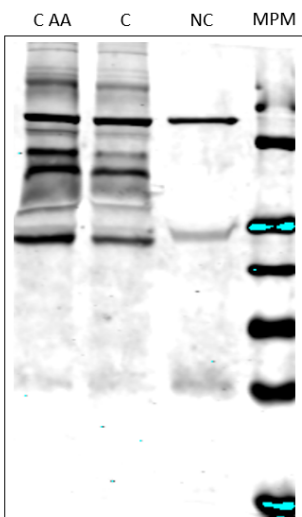


Figura 23: *Western Blot* representativo de los análisis de fosforilación en residuos de tirosina en proteínas de espermatozoides no capacitados, capacitados control y capacitados en presencia de AA. No se observan diferencias entre espermatozoides capacitados control y AA.

5.2.4 El porcentaje de fecundación disminuye con espermatozoides capacitados en presencia de antimicina A

Se realizaron 8 experimentos de fecundación *in vitro* con espermatozoides capacitados en presencia de AA y control. Los ovocitos fueron obtenidos mediante superovulación secuencial de ratones hembra. Se colocaron al menos 30 ovocitos por condición y se añadió la suspensión de espermatozoides capacitados, con o sin AA, a su respectiva placa de fertilización. Los embriones se cultivaron *in vitro* durante 24 horas hasta la etapa de dos células y se contaron para calcular la tasa de fecundación: $\text{Nro. embriones en 2 células} / \text{Nro. ovocitos totales} \times 100$.

Los resultados mostraron disminución en la tasa de fecundación cuando esta se realiza con espermatozoides capacitados en presencia de AA, es decir, cuando se inhibe la función mitocondrial (figura 24). Esta diferencia es significativa siendo el $p=0,0056$. La media $\pm$ error estándar del porcentaje de FIV control es de $38,88 \pm 7,08$ mientras que la de FIV con espermatozoides capacitados en presencia de AA es de $15,25 \pm 5,79$.

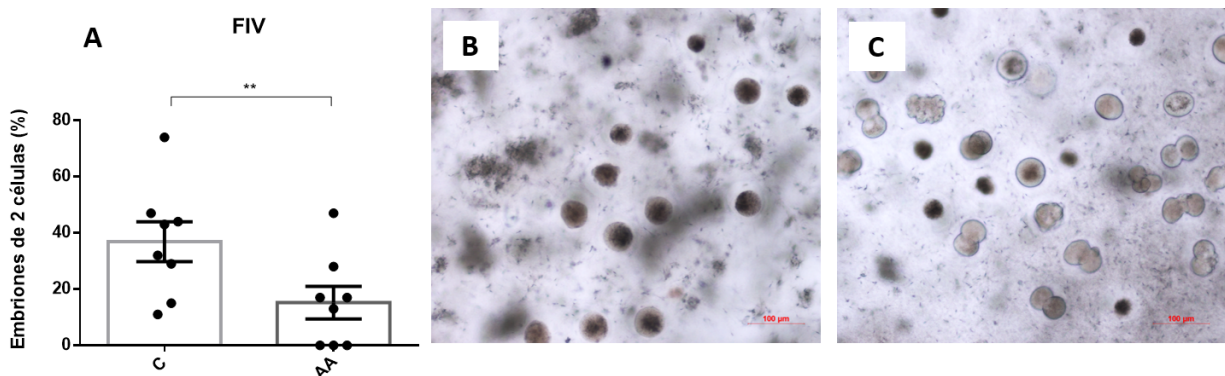


Figura 24: Efecto de la Antimicina A (AA) en la fecundación in vitro (FIV). A) Porcentaje de fecundación en ovocitos fertilizados con espermatozoides control y espermatozoides capacitados en presencia de AA. $p=0,005$, prueba t de Student. B) Ovocitos incubados con espermatozoides tratados con AA. C) Ovocitos incubados con espermatozoides control.

Teniendo en cuenta que algunos parámetros de la capacitación y la FIV disminuyen en presencia de inhibidores mitocondriales, decidimos analizar la función mitocondrial en espermatozoides capacitados y compararlos con los no capacitados.

5.2.5 Los espermatozoides capacitados presentan mejor función mitocondrial respecto a los no capacitados

Se analizó la función mitocondrial estudiando el consumo de oxígeno mediante respirometría de alta resolución en el equipo Oroboros Oxygraph 2k, en un total de 18 muestras de espermatozoides intactos no capacitados y capacitados *in vitro*. A partir del análisis de los registros de flujo de oxígeno (figura 25), se obtuvieron los parámetros: respiración basal, consumo de oxígeno no dependiente de ATP (en presencia de oligomicina), respiración máxima (en presencia de FCCP) y respiración no mitocondrial (en presencia de AA). Y se calcularon los índices RCR, eficiencia de acople y capacidad de reserva (Tabla 1).

Se observa un aumento del RCR en los espermatozoides capacitados con un $p=0,048$ siendo la media $\pm$ error estándar de los NC= $3,19\pm0,33$ y la de los C= $5,02\pm0,95$. La eficiencia de acople también es mayor en espermatozoides capacitados, $p=0,01$. No se observaron diferencias en la capacidad de reserva (figura 25)

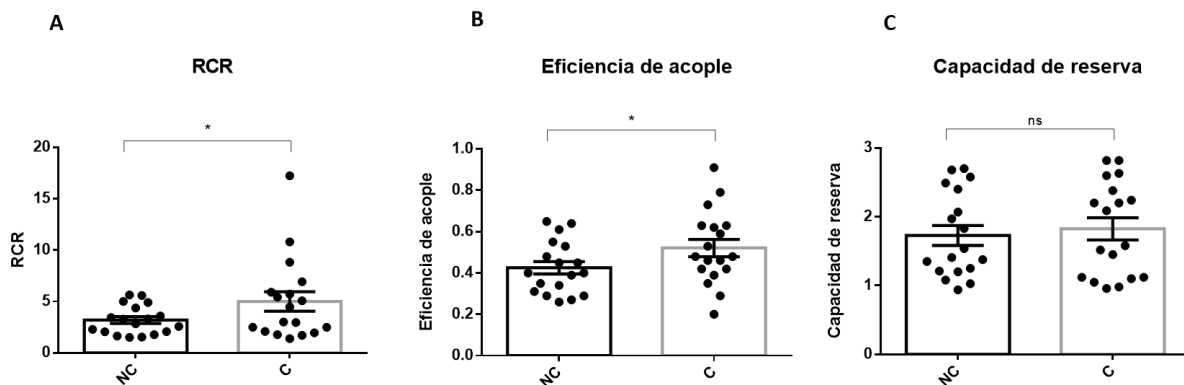


Figura 25: Análisis de la función mitocondrial en espermatozoides de ratón. El RCR y la eficiencia de acople son significativamente mayores en espermatozoides capacitados pero no hay diferencias en la capacidad de reserva. A) Media $\pm$ error estándar de RCR en espermatozoides no capacitados (NC) y capacitados (C), $p=0,049$. B) Media $\pm$ error estándar de eficiencia de acople en NC y C, $p=0,01$. C) Media $\pm$ error estándar de capacidad de reserva en NC y C, $p=0,33$.

Los datos obtenidos hasta el momento, en los que observamos que la actividad mitocondrial aumenta durante la capacitación y que el porcentaje de hiperactivación y la tasa de fecundación disminuyen en espermatozoides que fueron capacitados en presencia de inhibidores mitocondriales, sugieren que la hiperactivación puede depender de la actividad mitocondrial. La hiperactivación depende de la entrada de calcio mediante CatSper. Por lo tanto, hipotetizamos que la entrada de calcio por CatSper podría influir en el estado mitocondrial, explicando los resultados obtenidos.

5.2.6 Calcio intracelular con Fluo-4

Realizamos un experimento preliminar en el que mostramos que la entrada de calcio a la mitocondria disminuye cuando se incubaba a los espermatozoides con inhibidores mitocondriales.

Para analizar el calcio intracelular en espermatozoides de ratones WT durante la capacitación se utilizó el método de célula única. Se obtuvieron espermatozoides de ratones WT y se capacitaron en presencia de inhibidores mitocondriales (AA 2,5 μ M y FCCP 3 μ M) o control. Durante la capacitación también se incubaron con la sonda fluorescente Fluo-4. Las células fueron inmovilizadas durante el ensayo sobre un portaobjetos y se obtuvieron imágenes que luego se procesaron con ImageJ.

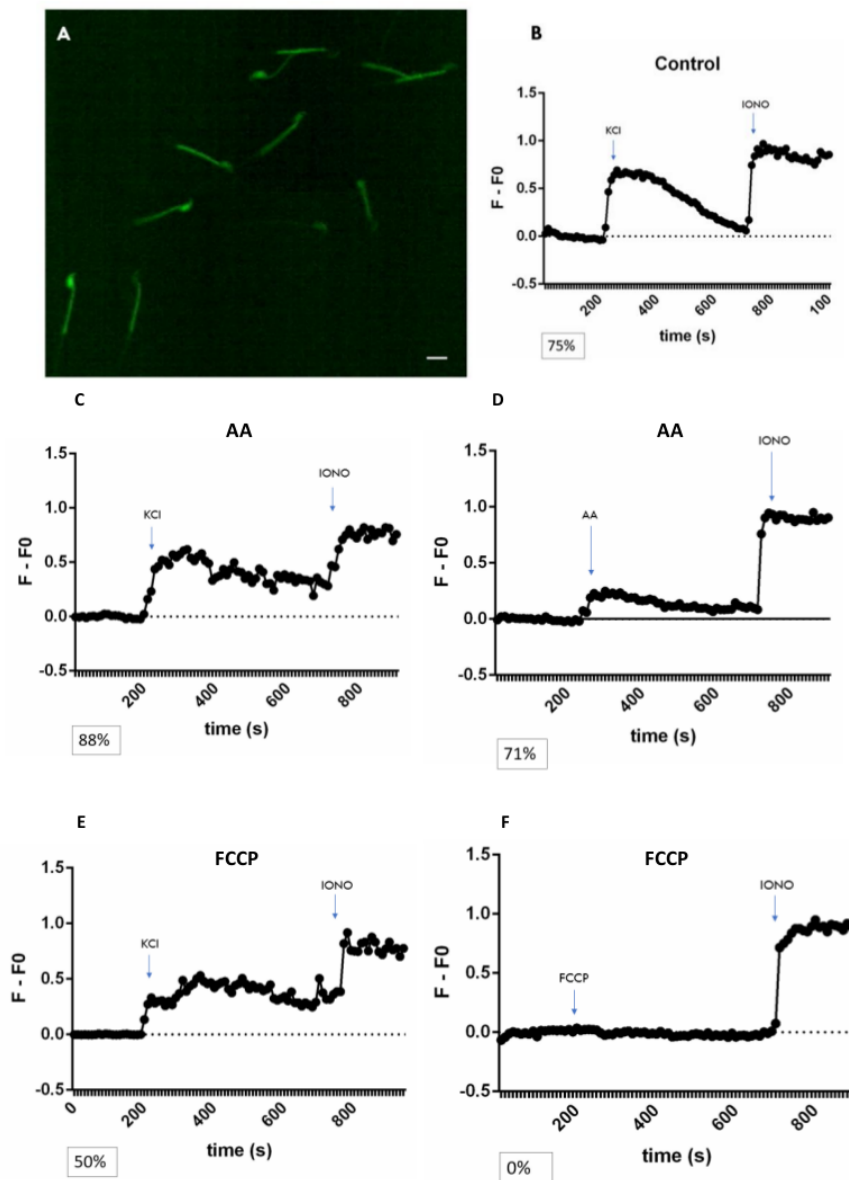


Figura 26: A) Espermatozoides de ratón incubados con Fluo-4 e inmovilizados en portaobjetos con laminina para su adhesión durante los registros. La barra corresponde a 10µm. B) Gráfico representativo de la intensidad de fluorescencia de Fluo-4 en espermatozoides capacitados control, estimulados con KCl y ionomicina. 75% de los espermatozoides analizados en esta condición responden frente al estímulo con KCl. C y E) Análisis de calcio intracelular con Fluo-4 en espermatozoides WT capacitados en presencia de inhibidores mitocondriales. Se midió la intensidad basal, luego se agregaron 50mM KCl y finalmente control con ionomicina 2µM. El porcentaje de respuesta fue de 88% con AA y 50% con FCCP. D y F) Análisis en espermatozoides capacitados control con agregado directo de inhibidores mitocondriales y ionomicina durante el análisis. El porcentaje de respuesta fue de 71% con AA y 0% con FCCP.

Se estudiaron cambios en la concentración de calcio intracelular frente a inhibidores mitocondriales y control en dos modalidades diferentes. Una de ellas con los espermatozoides capacitados en presencia del inhibidor y la otra añadiendo el inhibidor directamente sobre las células inmovilizadas. Para el control se añadió 50 mM KCl pH 7,4 y ionomicina 2µM (figura 27 B).

Los gráficos representan los cambios en la fluorescencia luego de la sustracción de la fluorescencia basal de las células que respondieron al estímulo. El porcentaje de células que responden se indica en cada gráfico. En espermatozoides WT capacitados en presencia de inhibidores mitocondriales el porcentaje de respuesta fue de 88% con AA y 50% con FCCP. Por otro lado, en espermatozoides capacitados control con agregado directo de inhibidores mitocondriales durante el análisis el porcentaje de respuesta fue de 71% con AA y 0% con FCCP (figura 26).

La sonda Fluo-4 se distribuye a lo largo de todo el espermatozoide, no exclusivamente en la pieza intermedia. La fluorescencia medida correspondiente a cada pieza intermedia se determina seleccionando la región de interés durante el análisis posterior con el software ImageJ.

En estos experimentos se observó menor entrada de calcio en la pieza intermedia ante la despolarización de la membrana con KCl cuando los espermatozoides se capacitaban junto con los inhibidores mitocondriales y que al agregar inhibidores directamente sobre espermatozoides capacitados fijados, la entrada de calcio con AA fue menor y no hubo respuesta con el desacoplante FCCP.

Continuando con la hipótesis de que la entrada de calcio podría explicar el aumento de la

actividad mitocondrial en la capacitación analizamos: 1) la función mitocondrial por oximetría en un medio sin calcio y 2) la función mitocondrial en ratones con modificaciones genéticas que carecen de canales para entrada de calcio.

5.2.7 No se observa un aumento significativo del RCR en espermatozoides capacitados en un medio sin calcio

Utilizando respirometría de alta resolución, se analizó la función mitocondrial espermática en las condiciones capacitado y no capacitado en un medio sin calcio + EGTA (TYH 0 Ca^{2+}). No se observó un aumento significativo en el RCR de los espermatozoides capacitados. En el *t-student* pareado se obtuvo un $p=0,28$, la media $\pm$ error estándar de los espermatozoides NC= $5,57 \pm 1,05$ y la de los C= $8,22 \pm 2,15$ (figura 27).

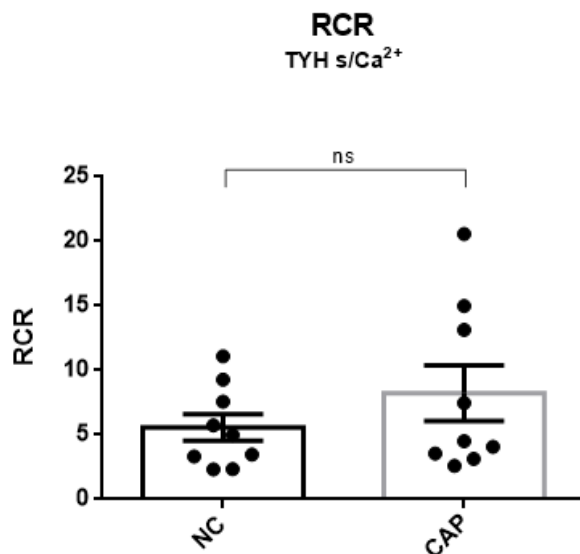


Figura 27: En el análisis de respirometría de alta resolución en medio TYH 0 Ca^{2+} no se observó un aumento significativo en el RCR de los espermatozoides capacitados. En el *t-student* pareado se obtuvo un $p=0,28$, con una media $\pm$ error estándar de los espermatozoides NC= $5,57 \pm 1,05$ y C= $8,22 \pm 2,15$.

5.2.8 No se observan diferencias significativas entre el RCR de los espermatozoides capacitados y no capacitados de ratones Catsper KO y Slo3 KO

Mediante respirometría de alta resolución, se analizó la función mitocondrial espermática de 5 ratones Catsper KO, en las condiciones capacitado y no capacitado. Utilizamos nuevamente el equipo Oroboros oxygraph 2k y obtuvimos los valores e índices que se muestran en la Tabla 1. En el *t Student* pareado se obtuvo un $p=0,84$, la media $\pm$ error estándar de los espermatozoides NC= $2,12\pm0,22$ y la de los C= $2,05\pm0,31$. No se observó un aumento significativo en el RCR de los espermatozoides capacitados como si se observó en los espermatozoides wild type (figura 30). Se analizaron 8 muestras de ratones Slo3 KO por respirometría de alta resolución y se obtuvieron los valores e índices que se muestran en la Tabla 1. En el *t Student* pareado de los RCR se obtuvo un $p=0,19$, la media $\pm$ error estándar de los espermatozoides NC= $3,066\pm0,21$ y la de los C= $3,81\pm0,41$. No aumentó significativamente el RCR de los espermatozoides capacitados (figura 28).

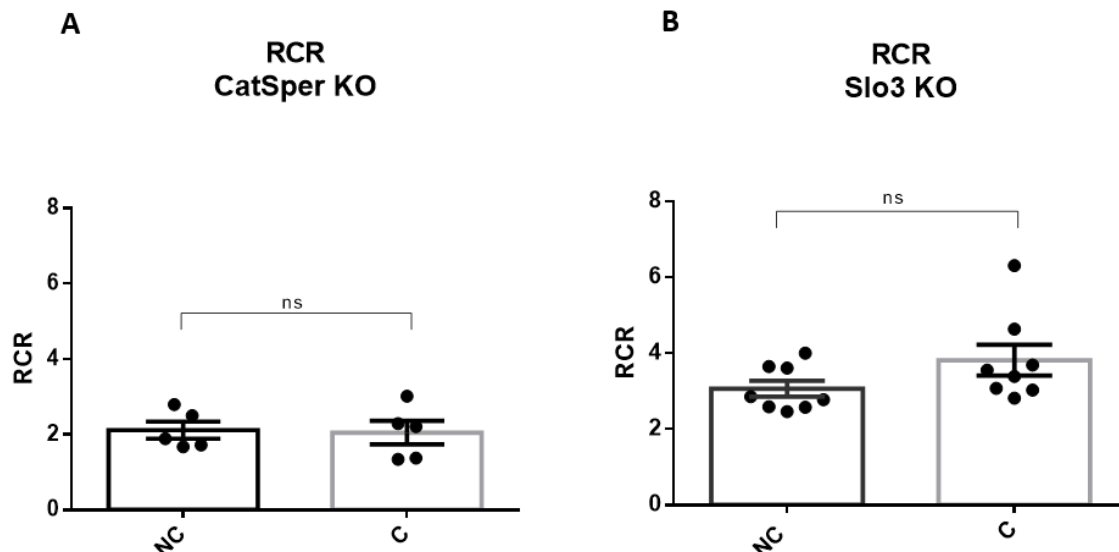


Figura 28: A) Análisis de la función mitocondrial en espermatozoides de ratón KO para Catsper. Media $\pm$ error estándar de RCR en espermatozoides NC y C. *t student* pareado arrojó un $p=0,84$, no significativo. B) Análisis de la función mitocondrial en espermatozoides de ratón KO para Slo3. Media $\pm$ error estándar de RCR en

espermatozoides NC y *C. t student* pareado arrojó un $p=0,19$, no significativo.

Por otro lado, la media de los valores de RCR en espermatozoides capacitados KO es menor a la media de los WT con valores de Catsper KO= $2,05\pm0,31$ y WT= $5,02\pm0,95$. (Figura 29).

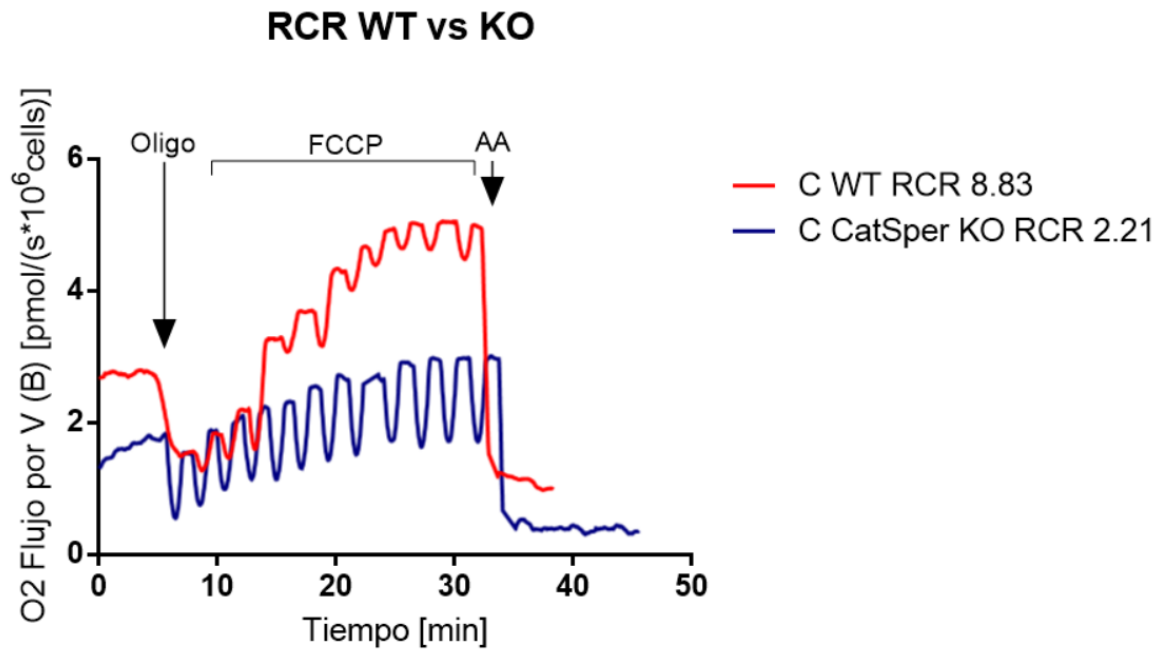


Figura 29: Gráfica representativa de registros de consumo de oxígeno de espermatozoides capacitados WT (rojo) y Catsper KO (azul). Se mide el consumo de oxígeno luego de la adición de diferentes inhibidores y desacoplantes mitocondriales: Oligomicina (Oligo), Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) y Antimicina A (AA). El RCR de los espermatozoides CatSper KO es menor a los WT.

Tabla 1: Índices y parámetros de respirometría de alta resolución de espermatozoides capacitados y no capacitados de ratones WT, Catsper KO y Slo3 KO.

	WT			CatSper KO			Slo3 KO		
INDICES	NC	C	p-valor	NC	C	p-valor	NC	C	p-valor
Eficiencia de acople	0,43 ±0,03	0,52 ±0,04	0,01	0,37 ±0,03	0,32 ±0,05	0,1	0,36 ±0,04	0,34 ±0,06	0,80
RCR	3,20 ±0,33	5,00 ±0,95	0,048	2,12 ±0,23	2,05 ±0,31	0,84	3,07 ±0,21	3,82 ±0,41	0,19
Capacidad de reserva	1,7± 0,15	1,8± 0,16	0,33	1,34 ±0,16	1,43 ±0,27	0,72	1,94 ±0,14	2,39 ±0,21	0,12

Objetivo 3

5.3 Análisis morfológico de las mitocondrias en la capacitación. Automatización de cuantificación de parámetros morfológicos en la pieza intermedia

Para poder analizar si la capacitación se acompaña de modificaciones en la morfología mitocondrial, se incubaron los espermatozoides de ratón con Mitotracker en condiciones

capacitantes y no capacitantes. Al observar en microscopio de fluorescencia, distinguimos claramente el acrosoma marcado con la sonda PNA con su característica forma de gancho, posicionado en la zona anterior de la cabeza del espermatozoide. Por otro lado, la mayoría de los espermatozoides presentaron marcada su pieza intermedia con rojo de la sonda MitoTracker Red. Sin embargo, no todos los espermatozoides presentaban el mismo patrón de intensidad y/o distribución de MitoTracker en la pieza intermedia.

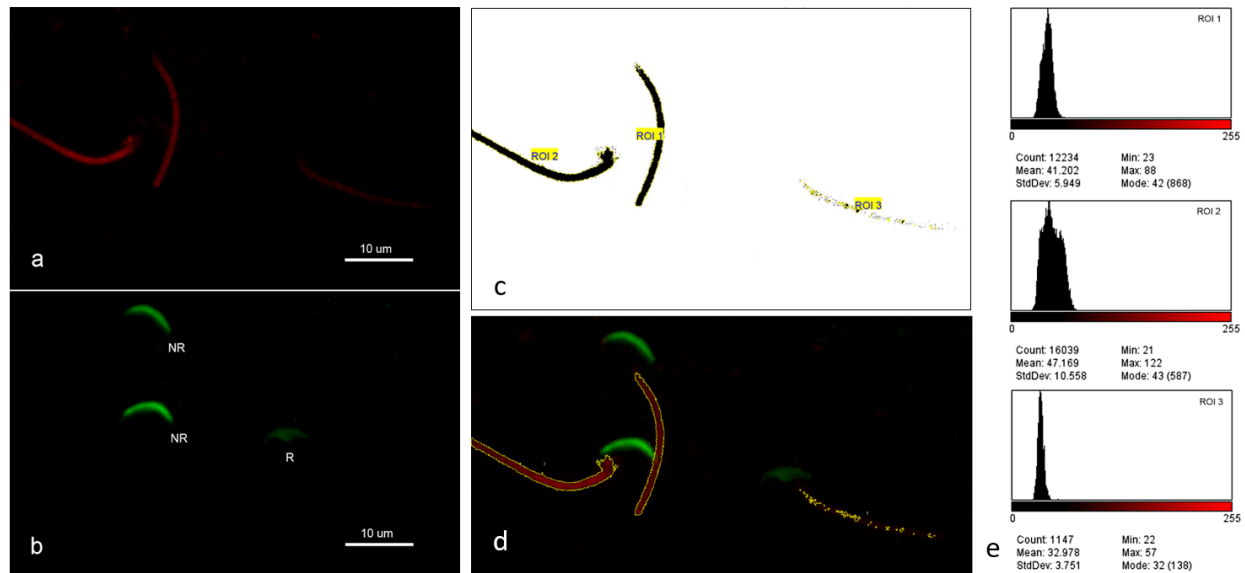


Figura 30: Esquema de obtención de ROIs e histogramas de la pieza intermedia de espermatozoides de ratón utilizando la sonda fluorescente Mitotracker Red y lectina PNA para visualización de la reacción acrosómica. a) Se observan en rojo (Mitotracker Red) las piezas intermedias donde se localizan las mitocondrias. b) Los espermatozoides no reaccionados muestran el acrosoma intacto (fluorescencia verde intensa) mientras que en los espermatozoides reaccionados no se observa dicha marca. c) Las ROIs se detectan umbralizando la imagen y analizando las partículas. d) Merge de las imágenes a y b con sus ROIs. e) Histogramas correspondientes a cada una de las piezas intermedias medidas.

Inicialmente se seleccionaron las regiones de interés (ROIs, por sus siglas en inglés) para las piezas intermedias de forma manual en el programa de uso libre ImageJ-FIJI con las herramientas de umbralización y analizar partículas. Las ROIs se listan en el ROI manager pudiendo renombrarlas, organizarlas e incluso añadir algún punto que no queda incluido en la ROI. Se obtienen datos morfológicos y de intensidad de fluorescencia de cada ROI. Además, se obtuvieron los histogramas individuales de cada ROI (figura 30).

A medida que avanzamos en la obtención de imágenes surgió la necesidad de automatizar este proceso y con esto lograr agilizar y eliminar errores técnico-dependiente en el momento de seleccionar la ROI manualmente. Para esto se trabajó en conjunto con el grupo de ingenieros del núcleo IMAGINA. Se desarrolló un *plug in* que renombra las imágenes, segmenta las piezas intermedias y las mide obteniendo parámetros morfológicos y de intensidad de fluorescencia, entre otros. También fue posible obtener ROIs más uniformes y acordes a la pieza intermedia analizada (figura 31), sin necesidad corregir ni unir manualmente los puntos que no se lograban detectar umbralizando manualmente.

Los scripts se detallan en el apéndice A y se pueden cargar en el software de uso libre ImageJ FIJI desde Plugins/Macros/Run.

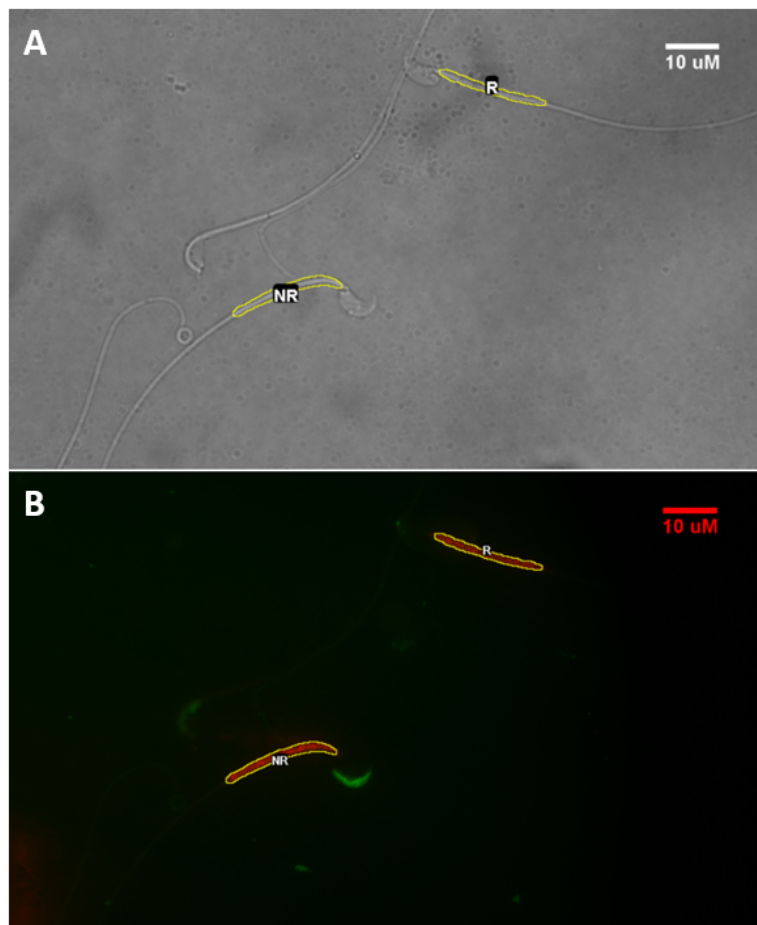


Figura 31: ROIs detectadas automáticamente utilizando el módulo segmentation del *plug in*. A) Imagen de campo claro de dos espermatozoides de ratón con su ROI correspondiente. B) Merge de imágenes de Mitotracker Red y Lectina PNA. Según el estado del acrosoma los espermatozoides son clasificados como reaccionado o no reaccionado.

Se estudiaron las diferencias entre las piezas intermedias de espermatozoides capacitados y no capacitados en 3 ratones. Se analizaron 70 piezas intermedias en total, de las cuales 21 pertenecen a espermatozoides no capacitados y 49 a espermatozoides capacitados. Se observa que la media del área (en píxeles, sin calibrar a μm) de las piezas intermedias de espermatozoides capacitados es significativamente menor que la de los no capacitados con un $p=0,0001$ (figura 32 A). Para analizar si esto podía depender de cambios que se producen en espermatozoides durante la capacitación, los espermatozoides se analizaron discriminando entre los que habían sufrido o no la RA. Los datos obtenidos a partir de las ROIs se agruparon según acrosoma no reaccionado o reaccionado. Se analizaron un total de 101 piezas intermedias de 3 ratones diferentes de las cuales 42 pertenecen a espermatozoides capacitados no reaccionados y 59 a espermatozoides capacitados reaccionados. De manera preliminar, podemos observar que el área disminuye en espermatozoides reaccionados (figuras 32 B y C). Cabe destacar que estos últimos datos pertenecen solamente a espermatozoides capacitados espontáneamente. Actualmente continuamos realizando experimentos en nuevas condiciones de no capacitados y capacitados inducidos.

Área de piezas intermedias

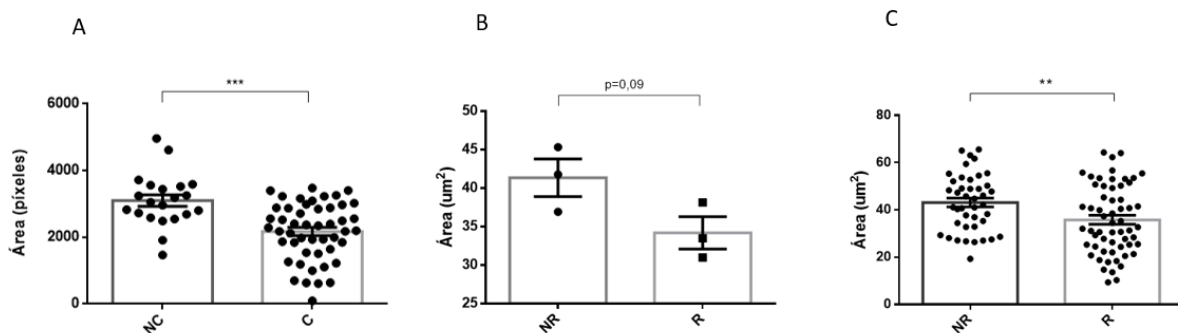


Figura 32: Análisis preliminar de piezas intermedias medidas con el software Imagej, prueba *t student* no pareado. A) Media de las áreas de las piezas intermedias seleccionadas manualmente (en píxeles, sin calibrar a μm) en espermatozoides no capacitados y capacitados. El área de los espermatozoides capacitados es significativamente menor que la de los no capacitados, $p=0,0001$. B) Media por ratón de las áreas de las piezas intermedias medidas automáticamente con el *plug in* en espermatozoides capacitados. El área de los espermatozoides R es menor a la

de NR, $p=0,09$. C) Áreas de las piezas intermedias de espermatozoides capacitados. El área de los espermatozoides R es menor a la de NR, $p=0,009$.

Los espermatozoides que habían sufrido reacción acrosómica, mostraron menor intensidad de fluorescencia en sus piezas intermedias (figura 33).

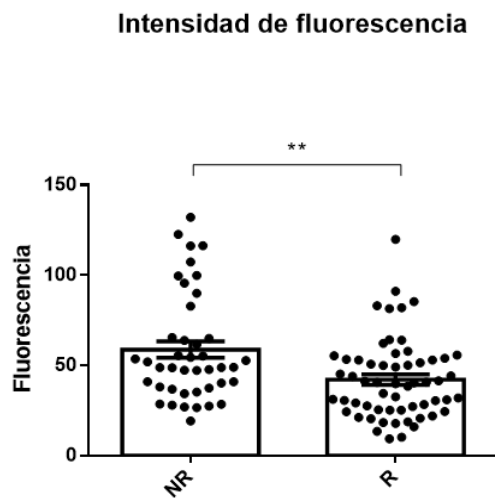


Figura 33: Análisis preliminar de piezas intermedias seleccionadas y medidas automáticamente con el *plug in* en el software Imagej. Intensidad de fluorescencia de las piezas intermedias en espermatozoides capacitados. La fluorescencia de los espermatozoides R es significativamente menor a la de NR, $p=0,0017$.

Finalmente, la incubación de los espermatozoides de ratón con Mitotracker Red no impidió la interacción de los espermatozoides con el ovocito ni la formación de embriones saludables en las FIV realizadas (figura 34).

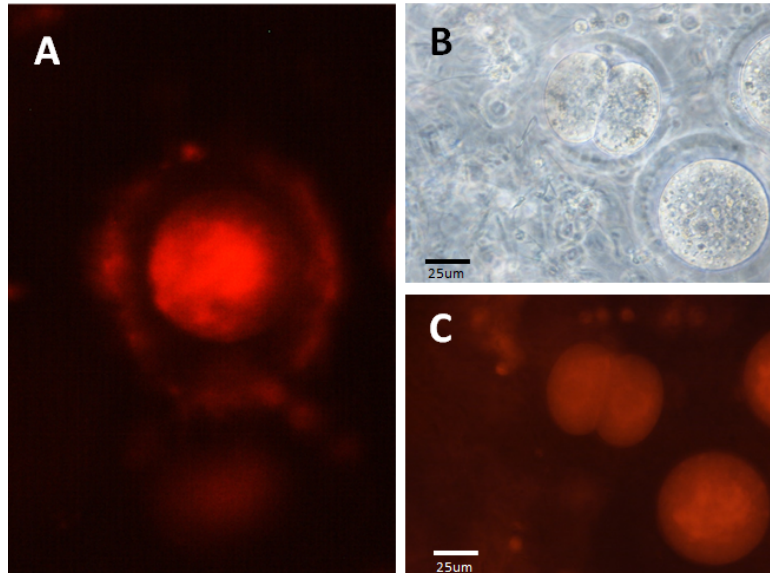


Figura 34: FIV con espermatozoides capacitados en presencia de Mitotracker red. A) Ovocito en contacto con espermatozoides. B,C) Embrión de dos células y ovocito no fecundado 24hs post-fertilización. Microscopía de campo claro y fluorescencia, respectivamente.

6. Discusión

En este trabajo nos propusimos estudiar el rol de la mitocondria en la capacitación espermática en un modelo de ratón. Los espermatozoides recién eyaculados son incapaces de fertilizar al ovocito. Para poder hacerlo deben residir cierto tiempo en el tracto genital femenino donde sufren una serie de cambios bioquímicos y funcionales conocidos como capacitación (Chang 1951). Luego de la capacitación los espermatozoides adquieren su capacidad fecundante y esto se debe principalmente a la adquisición de un patrón de motilidad conocido como hiperactivación, la capacidad de llevar a cabo la reacción acrosómica inducida y la adquisición de un patrón característico de fosforilación en tirosina (P. E. Visconti et al. 1999) (Suarez 2008). La capacitación se puede desarrollar *in vitro* incubando a los espermatozoides en un medio que contenga las concentraciones adecuadas de al menos tres elementos: Ca^{2+} , HCO_3^- y albúmina (P. E. Visconti et al. 1995).

En primera instancia, fue necesario estandarizar el estudio de indicadores que nos permitieran comprobar que las muestras se encuentran capacitadas. Debido a la complejidad que presenta el proceso de capacitación y el hecho de que tiene lugar en el interior del tracto femenino, se ha

recorrido a estudiarlo, principalmente, en condiciones *in vitro*. Aunque la técnica de capacitación *in vitro* está bien establecida, existen variaciones entre los laboratorios que llevan a cabo este proceso. Por ejemplo; se han reportado diferencias en los valores de hiperactivación que se obtienen según los medios capacitantes utilizados (Benon and Linet 2005) como: TYH (Toyoda 1971) (Navarrete et al. 2016), (Navarrete et al. 2019), HTF (Behringer et al. 2014) (Nakagata 1996) (La Spina et al. 2016) y medios comerciales como Fertiup CARD (Wigger, Tröder, and Zevnik 2021) . En cuanto al estudio de la motilidad, los equipos y sistemas de software de análisis SCA (Microptics) y CASAnova (Hamilton-Thorne) son los más utilizados (Goodson et al. 2011) (Goodson et al. 2017) (Mortimer, van der Horst, and Mortimer 2015), pero existen diferencias entre ellos así como en la selección de parámetros que permiten obtener porcentajes de hiperactivación, variando principalmente en la VCL, ALH y LIN. Un estudio realizado con tres sistemas CASA distintos pero utilizando las mismas grabaciones reportó diferencias en los parámetros de motilidad obtenidos (Boryshpolets et al. 2013). Es importante destacar que la mayoría de los sistemas CASA operan siguiendo los movimientos de la cabeza, es decir, que miden el movimiento flagelar sólo indirectamente (H. C. Ho and Suarez 2001). En cuanto a la inducción de RA e hiperactivación, se utilizan diferentes reactivos: ZP (Jin et al. 2011) (Rankin et al. 1996), progesterona (Pérez-Cerezales, López-Cardona, and Gutiérrez-Adán 2016) (Ryu et al. 2014) (Balestrini et al. 2021), A23187 (Sanchez-Cardenas and Montoya, n.d.) (Navarrete et al. 2016), y en concentraciones variables. En nuestro laboratorio se logró estandarizar técnicas para corroborar la efectividad de la capacitación *in vitro* en espermatozoides de ratón. Antes y después de la capacitación, se evaluó la motilidad espermática en el sistema CASA Microptic SCA, se realizaron extendidos para cuantificar el porcentaje de reacción acrosómica, western blot para fosforilación en tirosina y fecundación *in vitro*. En nuestros experimentos, se observó un aumento de espermatozoides que sufrieron RA luego de la capacitación y un aumento de los espermatozoides hiperactivados en un porcentaje similar a lo previamente reportado (Lybaert et al. 2009) (Sansegundo, Tourmente, and Roldan 2022). Además, se logró poner a punto la técnica de FIV en ratones. Las tasas de ovocitos obtenidos por hembra mediante superovulación y de fecundación también fueron similares a las reportadas por otros laboratorios (Longenecker et al. 2021). Los embriones se llegaron a cultivar exitosamente hasta estadio de blastocisto.

Obtenido un modelo de capacitación objetivable por métodos que mostraron resultados similares a otros laboratorios, procedimos a analizar la función mitocondrial en espermatozoides capacitados y no capacitados.

Para intentar comprender cuál es el papel de la mitocondria en la capacitación se comenzó estudiando el consumo de oxígeno mediante respirometría de alta resolución en espermatozoides no capacitados y capacitados. La importancia de la mitocondria en la función espermática ha sido demostrada en diferentes estudios que la consideran la principal fuente de ATP para motilidad y homeostasis celular (St John 2002; Travis et al. 1998). Sin embargo, el rol de la mitocondria en el metabolismo espermático continúa siendo un tema controversial (Losano et al. 2017). También la glucólisis tiene un rol importante en la producción energética en el espermatozoide de ratón (Mukai and Okuno 2004). Más recientemente, utilizando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe96 se estudiaron cambios en el metabolismo durante la capacitación en tiempo real (Balbach et al. 2020). Con esto se pudo monitorear simultáneamente la glucólisis y fosforilación oxidativa en espermatozoides vivos y en movimiento midiendo el flujo de protones y consumo de oxígeno en tiempo real (Balbach, Buck, and Levin 2020). Se observó que tanto la glucólisis como la fosforilación oxidativa aumentan durante la capacitación espermática (Balbach et al. 2020). Esto es concordante con lo que demostramos en este trabajo mediante respirometría de alta resolución en oroboros, observándose que la función mitocondrial es mayor en los espermatozoides capacitados (donde los índices aumentan: eficiencia de acople y el RCR). En un estudio reciente se ha revelado que el espermatozoide de ratón exhibe un cambio en el uso de su vía metabólica principal, de fosforilación oxidativa a glucolítica, como consecuencia de la capacitación (Tourmente et al. 2022). Es probable que esto sea, no para aumentar la producción total de ATP, sino para sostener los niveles de ATP, asegurando así la provisión localizada de ATP en las regiones flagelares con demandas energéticas específicas que surgen durante la capacitación (Tourmente et al. 2022). Nuestros resultados no excluyen que la vía glicolítica pueda jugar un rol en la capacitación pero sí subrayan la necesidad de un aumento de la actividad mitocondrial durante la misma.

Este aumento en la actividad mitocondrial es importante para que se produzca la hiperactivación y la fecundación. Esto está en concordancia con datos recientes de otros autores, (Giaccagli et al. 2021) quienes observan un aumento del potencial de membrana mitocondrial durante la capacitación de espermatozoides de ratón. Estos autores encuentran disminución en el porcentaje de espermatozoides hiperactivados cuando las muestras son

tratadas con desacoplantes mitocondriales así como asociación positiva de los espermatozoides móviles y el potencial de membrana mitocondrial (Giaccagli et al. 2021).

La motilidad es uno de los parámetros más relevantes de la función espermática ya que la célula debe recorrer un largo trayecto en el tracto reproductor masculino y femenino para lograr el encuentro con el ovocito. El cambio de tipo de movimiento progresivo al de hiperactivación es un marcador de la capacitación y es necesario para que la fecundación ocurra. Más aún, la hiperactivación se considera un buen indicador de la fertilidad del espermatozoide *in vivo* (S. Y. Chan et al. 1989) y se correlacionan con altas tasas de fecundación *in vitro* (Liu, Clarke, and Baker, n.d.). En ese sentido, el hecho de que el porcentaje de hiperactivación y la tasa de FIV bajan significativamente cuando los espermatozoides se incuban con AA sugiere que la mitocondria juega un papel importante en la fecundación y que esto ocurre a través de los cambios de motilidad del espermatozoide, coincidiendo con lo mostrado por otros autores (Giaccagli et al. 2021).

Contrariamente, no observamos cambios en la fosforilación en tirosina ni en el porcentaje de RA en presencia de inhibidores mitocondriales. Como se indicó, los cambios iónicos del espermatozoide se acompañan de aumento del cAMP, fosforilación de *protein kinasa A* y fosforilación en tirosina (P. E. Visconti et al. 1995) (P. E. Visconti and Kopf 1998) (Sansegundo, Tourmente, and Roldan 2022). Nuestros resultados no mostraron diferencias en el patrón de fosforilación en tirosina cuando fueron capacitados en presencia de inhibidores mitocondriales sugiriendo que este organelo no participa en dicho mecanismo. Similares resultados fueron reportados recientemente (Giaccagli et al. 2021), en línea con reportes previos (Travis et al., 2001; Goodson et al., 2012; Balbach et al., 2020). Tomados en conjunto, estos resultados indican que la función mitocondrial podría no ser esencial para sostener la fosforilación de las proteínas espermáticas. Podríamos concluir que existen otras rutas metabólicas que serían suficientes para mantener la fosforilación.

Una hipótesis similar se puede plantear para explicar el hecho de que el porcentaje de RA no se modifica con la inhibición de la función mitocondrial. Es posible que la fuente de ATP necesaria para el proceso de exocitosis no sea dependiente de la mitocondria. También es posible que puedan existir eventos de la capacitación que se produzcan en diferentes momentos y que el aumento de la actividad mitocondrial necesite más tiempo que otros de los fenómenos descritos de la capacitación (Giaccagli et al. 2021)

En el espermatozoide, el calcio tiene un rol central en los eventos que preceden a la fertilización, específicamente en la motilidad, quimiotaxis y reacción acrosómica. La relevancia del calcio en la fisiología de las células eucariotas se refleja en varias enzimas dependientes de calcio, reservorios de calcio intracelular y canales de calcio (Freitas, Vijayaraghavan, and Fardilha 2017). El aumento de la concentración de calcio intracelular es un punto importante en el control de la capacitación (Correia, Michelangeli, and Publicover 2015) y esto está mediado por el canal de calcio CatSper, espermático específico (Lishko and Mannowetz 2018) (Ren et al. 2001). Los ratones CatSper knockout (KO) son infértiles porque sus espermatozoides no logran hiperactivarse y por lo tanto no fecundan los ovocitos. Slo3 es un canal de potasio específico del espermatozoide que controla la entrada de calcio al espermatozoide mediante CatSper (Chávez et al. 2014). Los ratones KO para este canal son infértiles porque sus espermatozoides no se hiperactivan ni realizan RA (Santi et al. 2010) (Zeng et al. 2011). Mediante respirometría de alta resolución se analizó la función mitocondrial en estos mutantes infértiles y no se observaron diferencias significativas entre el RCR de los ratones KO capacitados y no capacitados. Además, la media de los valores de RCR en espermatozoides capacitados CatSper KO es menor a la media de los capacitados WT. Esto sugiere que el aumento de la actividad mitocondrial durante la capacitación es dependiente de la entrada de calcio por Catsper.

Las mitocondrias son organelos dinámicos que pueden variar su tamaño y forma dependiendo de su estado metabólico (D. C. Chan 2020). La función mitocondrial se puede monitorear utilizando sondas fluorescentes catiónicas tales como MitoTracker y JC-1 (Amaral and Ramalho-Santos 2010). Este tipo de sondas permiten visualizar selectivamente la mitocondria en la pieza intermedia dependiendo del potencial de membrana mitocondrial y por lo tanto, según algunos autores, se pueden utilizar para discriminar células con mitocondrias activas (Moscatelli et al. 2017). MitoTracker Red difunde pasivamente a través de la membrana mitocondrial y se acumula en las mitocondrias activas. No existe mucha bibliografía previa respecto a la medición automatizada de la pieza intermedia pero si hay registros sobre el uso de MitoTracker como monitoreo para potencial de membrana mitocondrial (Moscatelli et al. 2017) (Sousa et al. 2011) (Skinner et al. 2022). En este trabajo se logró automatizar la selección de región de interés (pieza intermedia) reduciendo considerablemente el error técnico dependiente, además de realizar el análisis de manera más rápida y eficazmente. Con ello se observaron cambios en la pieza intermedia durante la capacitación que podrían indicar un remodelamiento de las mismas durante este proceso. Sin embargo si este evento tiene

implicancias funcionales, tanto en el metabolismo mitocondrial como del propio espermatozoide deberá ser objeto de futuros estudios.

Parte de estos resultados se publicaron recientemente en un artículo en colaboración con el laboratorio de la Dra. Santi de la Universidad Washington de Saint Louis (Ferreira et al. 2021). En este se analiza la actividad mitocondrial ligada a la activación de CatSper en la capacitación de espermatozoides de ratón, concluyendo que la actividad mitocondrial aumenta durante la capacitación y contribuye a la hiperactivación y fertilización. También se encontró que el aumento en la eficiencia de acople es consistente con la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio CatSper (Ferreira et al. 2021).

7. Conclusiones

En suma:

- Nuestros datos apoyan la idea de que las mitocondrias son necesarias para que el espermatozoide adquiera su capacidad fecundante.
- Observamos que la actividad mitocondrial aumenta en la capacitación y esto depende de la entrada de calcio por catsper.
- Los resultados sugieren que las mitocondrias podrían actuar corriente abajo de la entrada de calcio al flagelo

8. Perspectivas

A pesar de los avances en investigación que se han reportado en este último tiempo, el rol de la mitocondria en la capacitación espermática continúa siendo un tema controversial. El hecho de contar con la capacitación *in vitro* estandarizada en nuestro laboratorio nos permitirá ahondar en estos estudios.

En particular, haber logrado la puesta a punto de la técnica de FIV en ratones puede abrir nuevos caminos para estudiar la evolución de los embriones en los diferentes estadios y eventualmente en crías nacidas vivas mediante la implantación de estos embriones.

Por otro lado, se destaca el desarrollo del *plug in* para medir de manera automatizada características de la pieza intermedia en el software libre ImageJ. En un futuro sería interesante lograr estandarizarlo para utilizar con diferentes sondas fluorescentes dirigidas a la mitocondria así como también extenderlo a espermatozoides de otras especies, en particular del humano.

9. Agradecimientos

A mis orientadoras Rossana Sapiro y Adriana Cassina.

A mis compañeros de laboratorio Pilar, Fernanda, Santiago y Lucía.

A todo el Dpto. de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, UdelaR.

A Celia Santi, Juan Ferreira y Pascale Lybaert, Washington University in Saint Louis.

A Federico Lecumberry y colaboradores, Facultad de Ingeniería - Imagina.

A los miembros del tribunal.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por su financiación.

En lo personal, a mi familia y amigas por su apoyo y ánimo constante.

A Juan, Emilia y Alfonso.

10. Bibliografía

- Adamson, G. David, and Valerie L. Baker. 2003. "Subfertility: Causes, Treatment and Outcome." *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology* 17 (2): 169–85.
- Ailshul, Mark D. 1975. "Energy Balance and Obesity in Man." *Nutrition Today* 10 (5): 29.
- Aitken, R. John, and R. John Aitken. 2004. "Founders' Lecture. Human Spermatozoa: Fruits of Creation, Seeds of Doubt." *Reproduction, Fertility and Development*.
<https://doi.org/10.1071/rd04083>.
- Aitken, Robert J. 2017. "Reactive Oxygen Species as Mediators of Sperm Capacitation and Pathological Damage." *Molecular Reproduction and Development* 84 (10): 1039–52.
- Albrechtová, Jana, Tomáš Albrecht, Ludovít Ďureje, Vincent A. Pallazola, and Jaroslav Piálek. 2014. "Sperm Morphology in Two House Mouse Subspecies: Do Wild-Derived Strains and Wild Mice Tell the Same Story?" *PloS One* 9 (12): e115669.
- Amaral, A., and J. Ramalho-Santos. 2010. "Assessment of Mitochondrial Potential: Implications for the Correct Monitoring of Human Sperm Function." *International Journal of Andrology* 33 (1): e180–86.
- Arcelay, Alvarez, and Storey. n.d. "Assessment of Sperm Function for IVF." *Human Reproduction*.
- Austin, C. R., and M. W. Bishop. 1958. "Capacitation of Mammalian Spermatozoa." *Nature* 181 (4612): 851.
- Balbach, Melanie, Jochen Buck, and Lonny R. Levin. 2020. "Using an Extracellular Flux Analyzer to Measure Changes in Glycolysis and Oxidative Phosphorylation during Mouse Sperm Capacitation." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 155 (January).
<https://doi.org/10.3791/60815>.
- Balbach, Melanie, Maria Gracia Gervasi, David Martin Hidalgo, Pablo E. Visconti, Lonny R. Levin, and Jochen Buck. 2020. "Metabolic Changes in Mouse Sperm during Capacitation†." *Biology of Reproduction* 103 (4): 791–801.
- Balestrini, Paula A., Claudia Sanchez-Cardenas, Guillermina M. Luque, Carolina Baro Graf, Jessica M. Sierra, Arturo Hernández-Cruz, Pablo E. Visconti, Dario Krapf, Alberto Darszon, and Mariano G. Buffone. 2021. "Membrane Hyperpolarization Abolishes Calcium

- Oscillations That Prevent Induced Acrosomal Exocytosis in Human Sperm." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (6): e21478.
- Bartoov, B., and G. Y. Messer. 1976. "Isolation of Mitochondria from Ejaculated Ram Spermatozoa." *Journal of Ultrastructure Research* 57 (1): 68–76.
- Behringer, Richard, Marina Gertsenstein, Kristina Vintersten Nagy, and Andras Nagy. 2014. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Benavides, F. J., and J. L. Guénet. 2003. "Manual de Genética de Roedores de Laboratorio: Principios Básicos Y Aplicaciones."
- Benon, M., and T. Linet. 2005. "Sperm Hyperactivated Motility: Influence of the Capacitation Medium." *Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de La Reproduction* 34 (5): 488–92.
- Berridge, Michael J., Martin D. Bootman, and H. Llewelyn Roderick. 2003. "Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (7): 517–29.
- Boell, E. J. 1985. "Oxygen Consumption of Mouse Sperm and Its Relationship to Capacitation." *The Journal of Experimental Zoology* 234 (1): 105–16.
- Boryshpolets, S., R. K. Kowalski, G. J. Dietrich, B. Dzyuba, and A. Ciereszko. 2013. "Different Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) Systems Highly Influence Sperm Motility Parameters." *Theriogenology* 80 (7): 758–65.
- Brand, Martin D., and David G. Nicholls. 2011. "Assessing Mitochondrial Dysfunction in Cells." *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj20110162>.
- Breitbart, Haim. 2002. "Intracellular Calcium Regulation in Sperm Capacitation and Acrosomal Reaction." *Molecular and Cellular Endocrinology* 187 (1-2): 139–44.
- Brugo-Olmedo, Santiago, Claudio Chillik, and Susana Kopelman. 2001. "Definition and Causes of Infertility." *Reproductive Biomedicine Online* 2 (1): 41–53.
- Burkman, L. J. 1984. "Characterization of Hyperactivated Motility by Human Spermatozoa during Capacitation: Comparison of Fertile and Oligozoospermic Sperm Populations." *Archives of Andrology* 13 (2-3): 153–65.
- Byers, Shannon L., Suzan J. Payson, and Rob A. Taft. 2006. "Performance of Ten Inbred Mouse Strains Following Assisted Reproductive Technologies (ARTs)." *Theriogenology* 65 (9): 1716–26.
- Cannarella, Rossella, Rosita A. Condorelli, Laura M. Mongioì, Sandro La Vignera, and Aldo E. Calogero. 2020. "Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051728>.
- Cardullo, R. A., and J. M. Baltz. 1991. "Metabolic Regulation in Mammalian Sperm: Mitochondrial Volume Determines Sperm Length and Flagellar Beat Frequency." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 19 (3): 180–88.
- Cassina, Adriana, Patricia Silveira, Lidia Cantu, Jose Maria Montes, Rafael Radi, and Rossana Sapiro. 2015. "Defective Human Sperm Cells Are Associated with Mitochondrial Dysfunction and Oxidant Production." *Biology of Reproduction* 93 (5): 119.
- Cassina, A. M., R. Hodara, J. M. Souza, L. Thomson, L. Castro, H. Ischiropoulos, B. A. Freeman, and R. Radi. 2000. "Cytochrome c Nitration by Peroxynitrite." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (28): 21409–15.
- Cassina, A., and R. Radi. 1996. "Differential Inhibitory Action of Nitric Oxide and Peroxynitrite on Mitochondrial Electron Transport." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 328 (2):

309–16.

- Chan, David C. 2020. "Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease." *Annual Review of Pathology* 15 (January): 235–59.
- Chang, M. C. 1951. "Fertilizing Capacity of Spermatozoa Deposited into the Fallopian Tubes." *Nature* 168 (4277): 697–98.
- Chan, S. Y., C. Wang, S. T. Chan, P. C. Ho, W. W. So, Y. F. Chan, and H. K. Ma. 1989. "Predictive Value of Sperm Morphology and Movement Characteristics in the Outcome of In Vitro Fertilization of Human Oocytes." *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer: IVF* 6 (3): 142–48.
- Chávez, Julio César, Juan José Ferreira, Alice Butler, José Luis De La Vega Beltrán, Claudia L. Treviño, Alberto Darszon, Lawrence Salkoff, and Celia M. Santi. 2014. "SLO3 K⁺ Channels Control Calcium Entry through CATSPER Channels in Sperm." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (46): 32266–75.
- Church, Deanna M., Leo Goodstadt, Ladeana W. Hillier, Michael C. Zody, Steve Goldstein, Xinwe She, Carol J. Bult, et al. 2009. "Lineage-Specific Biology Revealed by a Finished Genome Assembly of the Mouse." *PLoS Biology* 7 (5): e1000112.
- Contreras, Laura, Ilaria Drago, Enrico Zampese, and Tullio Pozzan. 2010. "Mitochondria: The Calcium Connection." *Biochimica et Biophysica Acta* 1797 (6–7): 607–18.
- Correia, Joao, Francesco Michelangeli, and Stephen Publicover. 2015. "Regulation and Roles of Ca²⁺ Stores in Human Sperm." *Reproduction* 150 (2): R65–76.
- Costello, Sarah, Francesco Michelangeli, Katherine Nash, Linda Lefievre, Jennifer Morris, Gisela Machado-Oliveira, Christopher Barratt, Jackson Kirkman-Brown, and Stephen Publicover. 2009. "Ca²⁺ -Stores in Sperm: Their Identities and Functions." *REPRODUCTION*. <https://doi.org/10.1530/rep-09-0134>.
- Danshina, Polina V., Christopher B. Geyer, Qunsheng Dai, Eugenia H. Goulding, William D. Willis, G. Barrie Kitto, John R. McCarrey, E. M. Eddy, and Deborah A. O'Brien. 2010. "Phosphoglycerate Kinase 2 (PGK2) Is Essential for Sperm Function and Male Fertility in Mice." *Biology of Reproduction* 82 (1): 136–45.
- Darszon, Alberto, Takuya Nishigaki, Carmen Beltran, and Claudia L. Treviño. 2011. "Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa." *Physiological Reviews* 91 (4): 1305–55.
- Darszon, Alberto, Takuya Nishigaki, Chris Wood, Claudia L. Treviño, Ricardo Felix, and Carmen Beltrán. 2005. "Calcium Channels and Ca²⁺ Fluctuations in Sperm Physiology." *International Review of Cytology* 243: 79–172.
- De Jonge, C., and C. L. R. Barratt. 2019. "The Present Crisis in Male Reproductive Health: An Urgent Need for a Political, Social, and Research Roadmap." *Andrology* 7 (6): 762–68.
- Denton, Richard M. 2009. "Regulation of Mitochondrial Dehydrogenases by Calcium Ions." *Biochimica et Biophysica Acta* 1787 (11): 1309–16.
- Elustondo, Pia A., Matthew Nichols, George S. Robertson, and Evgeny V. Pavlov. 2017. "Mitochondrial Ca²⁺ Uptake Pathways." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 49 (1): 113–19.
- Ferramosca, Alessandra, and Vincenzo Zara. 2014. "Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation." *BioMed Research International* 2014 (March): 902953.
- Ferreira, Juan J., Adriana Cassina, Pilar Irigoyen, Mariana Ford, Santiago Pietroroia, Nikita Peramsetty, Rafael Radi, Celia M. Santi, and Rossana Sapiro. 2021. "Increased Mitochondrial Activity upon CatSper Channel Activation Is Required for Mouse Sperm Capacitation." *Redox Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102176>.
- Florman, H. M. 1994. "Sequential Focal and Global Elevations of Sperm Intracellular Ca²⁺ Are

- Initiated by the Zona Pellucida during Acrosomal Exocytosis." *Developmental Biology* 165 (1): 152–64.
- Freitas, Maria João, Srinivasan Vijayaraghavan, and Margarida Fardilha. 2017. "Signaling Mechanisms in Mammalian Sperm Motility." *Biology of Reproduction* 96 (1): 2–12.
- Garret, R. H., and C. M. Grisham. 1999. "Biochemistry 2 Nd Edition. Thomson Learning." *Inc Thomson Learning, USA*, 154–55.
- Gervasi, Maria Gracia, and Pablo E. Visconti. 2016. "Chang's Meaning of Capacitation: A Molecular Perspective." *Molecular Reproduction and Development* 83 (10): 860–74.
- Giaccagli, María Milagros, Matías Daniel Gómez-Elías, Jael Dafne Herzfeld, Clara Isabel Marín-Briggiler, Patricia Sara Cuasnicú, Débora Juana Cohen, and Vanina Gabriela Da Ros. 2021. "Capacitation-Induced Mitochondrial Activity Is Required for Sperm Fertilizing Ability in Mice by Modulating Hyperactivation." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (October): 767161.
- Gilbert, S. F. 2010. "Developmental Biology." https://repository.vnu.edu.vn/handle/VNU_123/32696.
- Glancy, Brian, and Robert S. Balaban. 2012. "Role of Mitochondrial Ca²⁺ in the Regulation of Cellular Energetics." *Biochemistry* 51 (14): 2959–73.
- Goodson, Summer G., Sarah White, Alicia M. Stevans, Sanjana Bhat, Chia-Yu Kao, Scott Jaworski, Tamara R. Marlowe, et al. 2017. "CASAnova: A Multiclass Support Vector Machine Model for the Classification of Human Sperm Motility Patterns." *Biology of Reproduction* 97 (5): 698–708.
- Goodson, Summer G., Zhaojun Zhang, James K. Tsuruta, Wei Wang, and Deborah A. O'Brien. 2011. "Classification of Mouse Sperm Motility Patterns Using an Automated Multiclass Support Vector Machines Model." *Biology of Reproduction* 84 (6): 1207–15.
- Hammerstedt, R. H., and H. A. Lardy. 1983. "The Effect of Substrate Cycling on the ATP Yield of Sperm Glycolysis." *The Journal of Biological Chemistry* 258 (14): 8759–68.
- Hernández-González, Enrique O., Julian Sosnik, Jennifer Edwards, Juan José Acevedo, Irene Mendoza-Lujambio, Ignacio López-González, Ignacio Demarco, Eva Wertheimer, Alberto Darszon, and Pablo E. Visconti. 2006. "Sodium and Epithelial Sodium Channels Participate in the Regulation of the Capacitation-Associated Hyperpolarization in Mouse Sperm." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (9): 5623–33.
- Hidalgo, David M., Ana Romarowski, María G. Gervasi, Felipe Navarrete, Melanie Balbach, Ana M. Salicioni, Lonny R. Levin, Jochen Buck, and Pablo E. Visconti. 2020. "Capacitation Increases Glucose Consumption in Murine Sperm." *Molecular Reproduction and Development* 87 (10): 1037–47.
- Ho, Han-Chen, and Shiuan Wey. 2007. "Three Dimensional Rendering of the Mitochondrial Sheath Morphogenesis during Mouse Spermiogenesis." *Microscopy Research and Technique* 70 (8): 719–23.
- Ho, H. C., and S. S. Suarez. 2001. "Hyperactivation of Mammalian Spermatozoa: Function and Regulation." *Reproduction* 122 (4): 519–26.
- Holstein, A. F. 1976. "Ultrastructural Observations on the Differentiation of Spermatids in Man." *Andrologia* 8 (2): 157–65.
- Ikawa, Masahito, Naokazu Inoue, Adam M. Benham, and Masaru Okabe. 2010. "Fertilization: A Sperm's Journey to and Interaction with the Oocyte." *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/jci41585>.
- Jamsai, Duangporn, and Moira K. O'Bryan. 2011. "Mouse Models in Male Fertility Research." *Asian Journal of Andrology* 13 (1): 139–51.
- Jin, Mayuko, Eiji Fujiwara, Yasutaka Kakiuchi, Masaru Okabe, Yuhkoh Satouh, Shoji A. Baba,

- Kazuyoshi Chiba, and Noritaka Hirohashi. 2011. "Most Fertilizing Mouse Spermatozoa Begin Their Acrosome Reaction before Contact with the Zona Pellucida during in Vitro Fertilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (12): 4892–96.
- Knobil, Ernst. 2006. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Gulf Professional Publishing.
- Kozlovsky, Pavel, and Amit Gefen. 2012. "The Relative Contributions of Propulsive Forces and Receptor–ligand Binding Forces during Early Contact between Spermatozoa and Zona Pellucida of Oocytes." *Journal of Theoretical Biology* 294 (February): 139–43.
- Krapf, Dario, Enid Arcelay, Eva V. Wertheimer, Archana Sanjay, Stephen H. Pilder, Ana M. Salicioni, and Pablo E. Visconti. 2010. "Inhibition of Ser/Thr Phosphatases Induces Capacitation-Associated Signaling in the Presence of Src Kinase Inhibitors." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (11): 7977–85.
- La Spina, Florenza A., Lis C. Puga Molina, Ana Romarowski, Alejandra M. Vitale, Tomas L. Falzone, Dario Krapf, Noritaka Hirohashi, and Mariano G. Buffone. 2016. "Mouse Sperm Begin to Undergo Acrosomal Exocytosis in the Upper Isthmus of the Oviduct." *Developmental Biology* 411 (2): 172–82.
- Lenhinger, A. L. 2005. "Principles of Biochemistry" 4th Edn., H." Freeman and Company. New York.
- Linck, Richard W., Hector Chemes, and David F. Albertini. 2016. "The Axoneme: The Propulsive Engine of Spermatozoa and Cilia and Associated Ciliopathies Leading to Infertility." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 33 (2): 141–56.
- Lishko, Polina V., and Nadja Mannowetz. 2018. "CatSper: A Unique Calcium Channel of the Sperm Flagellum." *Current Opinion in Physiology* 2 (April): 109–13.
- Liu, Clarke, and Baker. n.d. "Relationship Between Sperm Motility Assessed with the Hamilton-Thorn Motility Analyzer and Fertilization Rates In Vitro." *Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1991.tb00258.x>.
- Longenecker, Glenn, Kyoungin Cho, Jaspal S. Khillan, and Ashok B. Kulkarni. 2021. "Cryopreservation Protocols for Genetically Engineered Mice." *Current Protocols* 1 (5): e138.
- Losano, Jda, Dsr Angrimani, A. Dalmazzo, B. R. Rui, M. M. Brito, C. M. Mendes, Gkv Kawai, et al. 2017. "Effect of Mitochondrial Uncoupling and Glycolysis Inhibition on Ram Sperm Functionality." *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 52 (2): 289–97.
- Luo, Shi-Ming, Heide Schatten, and Qing-Yuan Sun. 2013. "Sperm Mitochondria in Reproduction: Good or Bad and Where Do They Go?" *Journal of Genetics and Genomics*. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.08.004>.
- Lybaert, Pascale, André Danguy, Fabienne Leleux, Sylvain Meuris, and Philippe Lebrun. 2009. "Improved Methodology for the Detection and Quantification of the Acrosome Reaction in Mouse Spermatozoa." *Histology and Histopathology* 24 (8): 999–1007.
- Marín-Briggiler, Clara I., Guillermina M. Luque, María G. Gervasi, Natalia Oscoz-Susino, Jessica M. Sierra, Carolina Mondillo, Ana M. Salicioni, Darío Krapf, Pablo E. Visconti, and Mariano G. Buffone. 2021. "Human Sperm Remain Motile after a Temporary Energy Restriction but Do Not Undergo Capacitation-Related Events." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (November): 777086.
- McCormack, J. G., A. P. Halestrap, and R. M. Denton. 1990. "Role of Calcium Ions in Regulation of Mammalian Intramitochondrial Metabolism." *Physiological Reviews* 70 (2): 391–425.
- Michelangeli, Francesco, Oluseye A. Ogunbayo, and Laura L. Wootton. 2005. "A Plethora of Interacting Organellar Ca²⁺ Stores." *Current Opinion in Cell Biology* 17 (2): 135–40.
- Miki, Kiyoshi, Weidong Qu, Eugenia H. Goulding, William D. Willis, Donna O. Bunch, Lillian F.

- Strader, Sally D. Perreault, Edward M. Eddy, and Deborah A. O'Brien. 2004. "Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase-S, a Sperm-Specific Glycolytic Enzyme, Is Required for Sperm Motility and Male Fertility." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (47): 16501–6.
- Mohanty, Gayatri, and Luna Samanta. 2018. "Redox Regulation & Sperm Function: A Proteomic Insight." *The Indian Journal of Medical Research* 148 (Suppl): S84–91.
- Moraes, Christa R., and Stuart Meyers. 2018. "The Sperm Mitochondrion: Organelle of Many Functions." *Animal Reproduction Science* 194 (July): 71–80.
- Mortimer, Sharon T., Gerhard van der Horst, and David Mortimer. 2015. "The Future of Computer-Aided Sperm Analysis." *Asian Journal of Andrology* 17 (4): 545–53.
- Moscatelli, Natalina, Barbara Spagnolo, Marco Pisanello, Enrico Domenico Lemma, Massimo De Vittorio, Vincenzo Zara, Ferruccio Pisanello, and Alessandra Ferramosca. 2017. "Single-Cell-Based Evaluation of Sperm Progressive Motility via Fluorescent Assessment of Mitochondria Membrane Potential." *Scientific Reports* 7 (1): 17931.
- Mukai, Chinatsu, and Makoto Okuno. 2004. "Glycolysis Plays a Major Role for Adenosine Triphosphate Supplementation in Mouse Sperm Flagellar Movement." *Biology of Reproduction* 71 (2): 540–47.
- Mundy, A. J., T. A. Ryder, and D. K. Edmonds. 1995. "Asthenozoospermia and the Human Sperm Mid-Piece." *Human Reproduction* 10 (1): 116–19.
- Nakagata, N. 1996. "Use of Cryopreservation Techniques of Embryos and Spermatozoa for Production of Transgenic (Tg) Mice and for Maintenance of Tg Mouse Lines." *Laboratory Animal Science* 46: 236–38.
- Narisawa, Sonoko, Norman B. Hecht, Erwin Goldberg, Kelly M. Boatright, John C. Reed, and José Luis Millán. 2002. "Testis-Specific Cytochrome c-Null Mice Produce Functional Sperm but Undergo Early Testicular Atrophy." *Molecular and Cellular Biology* 22 (15): 5554–62.
- Nascimento, Jaclyn M., Linda Z. Shi, James Tam, Charlie Chandsawangbhuwana, Barbara Durrant, Elliot L. Botvinick, and Michael W. Berns. 2008. "Comparison of Glycolysis and Oxidative Phosphorylation as Energy Sources for Mammalian Sperm Motility, Using the Combination of Fluorescence Imaging, Laser Tweezers, and Real-Time Automated Tracking and Trapping." *Journal of Cellular Physiology* 217 (3): 745–51.
- Navarrete, Felipe A., Luis Aguila, David Martin-Hidalgo, Darya A. Tourzani, Guillermina M. Luque, Goli Ardestani, Francisco A. Garcia-Vazquez, et al. 2019. "Transient Sperm Starvation Improves the Outcome of Assisted Reproductive Technologies." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7 (November): 262.
- Navarrete, Felipe A., Antonio Alvau, Hoi Chang Lee, Lonny R. Levin, Jochen Buck, Patricia Martin-De Leon, Celia M. Santi, et al. 2016. "Transient Exposure to Calcium Ionophore Enables in Vitro Fertilization in Sterile Mouse Models." *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep33589>.
- Neill, Knobil And. 2006. "Knobil and Neill's Physiology of Reproduction." *Physiology of the GnRH Neuronal Network* 3: 1415–82.
- Nevo, A. C., and R. Rikmenspoel. 1970. "Diffusion of ATP in Sperm Flagella." *Journal of Theoretical Biology* 26 (1): 11–18.
- Nozawa, Yoko Inès, Erica Yao, Rhodora Gacayan, Shan-Mei Xu, and Pao-Tien Chuang. 2014. "Mammalian Fused Is Essential for Sperm Head Shaping and Periaxonemal Structure Formation during Spermatogenesis." *Developmental Biology* 388 (2): 170–80.
- Odet, Fanny, Scott Gabel, Robert E. London, Erwin Goldberg, and Edward M. Eddy. 2013. "Glycolysis and Mitochondrial Respiration in Mouse LDHC-Null Sperm." *Biology of Reproduction* 88 (4): 95.

- Olson, Gary E., and Virginia P. Winfrey. 1990. "Mitochondria-Cytoskeleton Interactions in the Sperm Midpiece." *Journal of Structural Biology*.
[https://doi.org/10.1016/1047-8477\(90\)90081-m](https://doi.org/10.1016/1047-8477(90)90081-m).
- Otani, H., O. Tanaka, K. Kasai, and T. Yoshioka. 1988. "Development of Mitochondrial Helical Sheath in the Middle Piece of the Mouse Spermatid Tail: Regular Dispositions and Synchronized Changes." *The Anatomical Record* 222 (1): 26–33.
- O-Uchi, Jin, Bong Sook Jhun, Stephen Hurst, Sara Bisetto, Polina Gross, Ming Chen, Sarah Kettlewell, et al. 2013. "Overexpression of Ryanodine Receptor Type 1 Enhances Mitochondrial Fragmentation and Ca²⁺-Induced ATP Production in Cardiac H9c2 Myoblasts." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 305 (12): H1736–51.
- Pelliccione, Fiore, Alessandro Micillo, Giuliana Cordeschi, Anatolia D'Angeli, Stefano Necozone, Loredana Gandini, Andrea Lenzi, Felice Francavilla, and Sandro Francavilla. 2011. "Altered Ultrastructure of Mitochondrial Membranes Is Strongly Associated with Unexplained Asthenozoospermia." *Fertility and Sterility* 95 (2): 641–46.
- Pérez-Cerezales, S., A. P. López-Cardona, and A. Gutiérrez-Adán. 2016. "Progesterone Effects on Mouse Sperm Kinetics in Conditions of Viscosity." *Reproduction* 151 (5): 501–7.
- Radi, Rafael. 2013. "Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (37): 26464–72.
- Rankin, T., M. Familiar, E. Lee, A. Ginsberg, N. Dwyer, J. Blanchette-Mackie, J. Drago, H. Westphal, and J. Dean. 1996. "Mice Homozygous for an Insertional Mutation in the Zp3 Gene Lack a Zona Pellucida and Are Infertile." *Development* 122 (9): 2903–10.
- Ren, D., B. Navarro, G. Perez, A. C. Jackson, S. Hsu, Q. Shi, J. L. Tilly, and D. E. Clapham. 2001. "A Sperm Ion Channel Required for Sperm Motility and Male Fertility." *Nature* 413 (6856): 603–9.
- Richter, Christoph, and Matthias Schweizer. 2002. "Introduction to Serial Reviews on Nitric Oxide in Mitochondria." *Free Radical Biology and Medicine*.
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01110-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01110-3).
- Ryu, Do-Yeal, Ye-Ji Kim, June-Sub Lee, Md Saidur Rahman, Woo-Sung Kwon, Sung-Jae Yoon, and Myung-Geol Pang. 2014. "Capacitation and Acrosome Reaction Differences of Bovine, Mouse and Porcine Spermatozoa in Responsiveness to Estrogenic Compounds." *Hanguk Tongmul Chawon Kwahakhoe Chi = Journal of Animal Science and Technology* 56 (November): 26.
- Salicioni, A. M., M. D. Platt, E. V. Wertheimer, E. Arcelay, A. Allaire, J. Sosnik, and P. E. Visconti. 2007. "Signalling Pathways Involved in Sperm Capacitation." *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 65: 245–59.
- Sanchez-Cardenas, and Montoya. n.d. "Intracellular Ca²⁺ Threshold Reversibly Switches Flagellar Beat off and on." *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*.
<https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/99/5/1010/5034946>.
- Sansegundo, Ester, Maximiliano Tourmente, and Eduardo R. S. Roldan. 2022. "Energy Metabolism and Hyperactivation of Spermatozoa from Three Mouse Species under Capacitating Conditions." *Cells* 11 (2). <https://doi.org/10.3390/cells11020220>.
- Santi, Celia M., Pablo Martínez-López, José Luis de la Vega-Beltrán, Alice Butler, Arturo Alisio, Alberto Darszon, and Lawrence Salkoff. 2010. "The SLO3 Sperm-Specific Potassium Channel Plays a Vital Role in Male Fertility." *FEBS Letters* 584 (5): 1041–46.
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. "Fiji: An Open-Source Platform for

- Biological-Image Analysis." *Nature Methods* 9 (7): 676–82.
- Simons, Julie, and Lisa Fauci. 2018. "A Model for the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm." *Bulletin of Mathematical Biology* 80 (9): 2481–2501.
- Simpson, P. B., and J. T. Russell. 1998. "Role of Mitochondrial Ca²⁺ Regulation in Neuronal and Glial Cell Signalling." *Brain Research. Brain Research Reviews* 26 (1): 72–81.
- Skinner, Will M., Natalie T. Petersen, Bret Unger, Shaogeng Tang, Emiliano Tabarsi, Julianna Lamm, Liza Jalalian, et al. 2022. "Mitochondrial Uncouplers Impair Human Sperm Motility without Altering ATP Content." *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.08.04.502752>.
- Sousa, Ana Paula, Alexandra Amaral, Marta Baptista, Renata Tavares, Pedro Caballero Campo, Pedro Caballero Peregrín, Albertina Freitas, Artur Paiva, Teresa Almeida-Santos, and João Ramalho-Santos. 2011. "Not All Sperm Are Equal: Functional Mitochondria Characterize a Subpopulation of Human Sperm with Better Fertilization Potential." *PLoS One* 6 (3): e18112.
- Stendardi, A., R. Focarelli, P. Piomboni, D. Palumberi, F. Serafini, A. Ferramosca, and V. Zara. 2011. "Evaluation of Mitochondrial Respiratory Efficiency during in Vitro Capacitation of Human Spermatozoa." *International Journal of Andrology* 34 (3): 247–55.
- Stival, Cintia, Lis del C. Puga Molina, Bidur Paudel, Mariano G. Buffone, Pablo E. Visconti, and Dario Krapf. 2016. "Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm." *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology* 220: 93–106.
- St John, J. C. 2002. "The Transmission of Mitochondrial DNA Following Assisted Reproductive Techniques." *Theriogenology* 57 (1): 109–23.
- Suarez, Susan S. 2008. "Control of Hyperactivation in Sperm." *Human Reproduction Update* 14 (6): 647–57.
- Sullivan, Robert, and Roger Mieusset. 2016. "The Human Epididymis: Its Function in Sperm Maturation." *Human Reproduction Update* 22 (5): 574–87.
- Takao, Daisuke, and Shinji Kamimura. 2008. "FRAP Analysis of Molecular Diffusion inside Sea-Urchin Spermatozoa." *The Journal of Experimental Biology* 211 (Pt 22): 3594–3600.
- Tourmente, Maximiliano, Ester Sansegundo, Eduardo Rial, and Eduardo R. S. Roldan. 2022. "Capacitation Promotes a Shift in Energy Metabolism in Murine Sperm." *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.950979>.
- Tourmente, Maximiliano, Pilar Villar-Moya, Eduardo Rial, and Eduardo R. S. Roldan. 2015. "Differences in ATP Generation Via Glycolysis and Oxidative Phosphorylation and Relationships with Sperm Motility in Mouse Species." *The Journal of Biological Chemistry* 290 (33): 20613–26.
- Toyoda, Y. 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: 147–51.
- Travis, Alexander J., James A. Foster, Nancy A. Rosenbaum, Pablo E. Visconti, George L. Gerton, Gregory S. Kopf, and Stuart B. Moss. 1998. "Targeting of a Germ Cell-Specific Type 1 Hexokinase Lacking a Porin-Binding Domain to the Mitochondria as Well as to the Head and Fibrous Sheath of Murine Spermatozoa." *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.2.263>.
- Uzman, Akif. 2003. "Molecular Biology of the Cell (4th Ed.): Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P." *Biochemistry and Molecular Biology Education*. <https://doi.org/10.1002/bmb.2003.494031049999>.
- Valez, Aicardo, Cassina, Quijano, and Radi. n.d. "Oxidative Stress in Mitochondria." *Principles of Free Radical*.
- Varuzhanyan, Grigor, and David C. Chan. 2020. "Mitochondrial Dynamics during Spermatogenesis." *Journal of Cell Science* 133 (14). <https://doi.org/10.1242/jcs.235937>.

- Visconti, Pablo E., Dario Krapf, José Luis de la Vega-Beltrán, Juan José Acevedo, and Alberto Darszon. 2011. "Ion Channels, Phosphorylation and Mammalian Sperm Capacitation." *Asian Journal of Andrology* 13 (3): 395–405.
- Visconti, P. E., J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G. S. Kopf. 1995. "Capacitation of Mouse Spermatozoa. I. Correlation between the Capacitation State and Protein Tyrosine Phosphorylation." *Development* 121 (4): 1129–37.
- Visconti, P. E., and G. S. Kopf. 1998. "Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation." *Biology of Reproduction* 59 (1): 1–6.
- Visconti, P. E., J. Stewart-Savage, A. Blasco, L. Battaglia, P. Miranda, G. S. Kopf, and J. G. Tezón. 1999. "Roles of Bicarbonate, cAMP, and Protein Tyrosine Phosphorylation on Capacitation and the Spontaneous Acrosome Reaction of Hamster Sperm." *Biology of Reproduction* 61 (1): 76–84.
- Voet, Donald, and Judith G. Voet. 2006. *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana.
- Wennemuth, Gunther, Donner F. Babcock, and Bertil Hille. 2003. "Calcium Clearance Mechanisms of Mouse Sperm." *The Journal of General Physiology* 122 (1): 115–28.
- Wigger, Magdalena, Simon E. Tröder, and Branko Zevnik. 2021. "A Simple and Economic Protocol for Efficient in Vitro Fertilization Using Cryopreserved Mouse Sperm." *PloS One* 16 (10): e0259202.
- Williams, A. C., and W. C. Ford. 2001. "The Role of Glucose in Supporting Motility and Capacitation in Human Spermatozoa." *Journal of Andrology* 22 (4): 680–95.
- Xia, Jingsheng, David Reigada, Claire H. Mitchell, and Dejian Ren. 2007. "CATSPER Channel-Mediated Ca²⁺ Entry into Mouse Sperm Triggers a Tail-to-Head Propagation." *Biology of Reproduction* 77 (3): 551–59.
- Yanagimachi, R. 1981. "Mechanisms of Fertilization in Mammals." In *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*, edited by Luigi Mastroianni and John D. Biggers, 81–182. Boston, MA: Springer US.
- Yanagimachi, R. 1994. "Mammalian Fertilization." *The Physiology of Reproduction*. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10008763555/>.
- Yanagimachi, Ryuzo, and David M. Phillips. 1984. "The Status of Acrosomal Caps of Hamster Spermatozoa Immediately before Fertilization in Vivo." *Gamete Research* 9 (1): 1–19.
- Yang, Ming, Yan Ge, Jiayan Wu, Jingfa Xiao, and Jun Yu. 2011. "Coevolution Study of Mitochondria Respiratory Chain Proteins: Toward the Understanding of Protein–protein Interaction." *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* 38 (5): 201–7.
- Zaferani, Meisam, Susan S. Suarez, and Alireza Abbaspourrad. 2021. "Mammalian Sperm Hyperactivation Regulates Navigation via Physical Boundaries and Promotes Pseudo-Chemotaxis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (44). <https://doi.org/10.1073/pnas.2107500118>.
- Zeng, Xu-Hui, Chengtao Yang, Sung Tae Kim, Christopher J. Lingle, and Xiao-Ming Xia. 2011. "Deletion of the Slo3 Gene Abolishes Alkalization-Activated K⁺ Current in Mouse Spermatozoa." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (14): 5879–84.
- Zitanski, Nele, Heike Borth, Frauke Ackermann, Dorke Meyer, Laura Vieweg, Andreas Breit, Thomas Gudermann, and Ingrid Boekhoff. 2010. "The 'Acrosomal Synapse': Subcellular Organization by Lipid Rafts and Scaffolding Proteins Exhibits High Similarities in Neurons and Mammalian Spermatozoa." *Communicative & Integrative Biology* 3 (6): 513–21.

11. Apéndices

Apendice A

Scripts utilizados en el software libre FIJI - ImageJ

Rename.py

```
from ij import IJ, ImagePlus, ImageStack, CompositeImage

import os

import shutil

import math

from ij.io import FileSaver

from ij.plugin import ContrastEnhancer

from ij.plugin.frame import RoiManager

from ij.plugin.filter import ParticleAnalyzer as PA, GaussianBlur as GB,
Analyzer, Filler

from ij.measure import Measurements as ms, ResultsTable

from java.awt import Color

from ij.process import LUT, ImageConverter

from ij.plugin import Selection, RoiEnlarger, RoiScaler, RoiRotator,
Straightener

from ij.gui import ShapeRoi

from operator import itemgetter

threshold = 200

srcDir = IJ.getDirectory("Input_directory")

outDir = IJ.getDirectory("Output_directory")

mydict={'number':[], 'filename':[]}
```

```

filenames=os.listdir(srcDir)

subdirs = []

for filename in filenames: # loop through all the files and folders

if os.path.isdir(os.path.join(srcDir, filename)): # check whether the current
object is a folder or not subdirs.append(filename)

subdirs.sort()

print(subdirs)

for subdir in subdirs:

for fileName in os.listdir(os.path.join(srcDir,subdir)):

if fileName[-4:] == '.tif':

imp = IJ.openImage(os.path.join(srcDir,subdir,fileName))

imp2save = imp.duplicate()

IC=ImageConverter(imp)

IC.convertToRGBStack()

print(subdir,fileName)

stack=imp.getImageStack()

R=[]

for p in stack.getPixels(1):

if p != 128:

R.append(p)

R.sort()

G=[]

for p in stack.getPixels(2):

if p != 128:

G.append(p)

```

```

G.sort()

B=[]

for p in stack.getPixels(3):

    if p != 128:

        B.append(p)

B.sort()

maxR=sum(R[-20:])

maxG=sum(G[-20:])

maxB=sum(B[-20:])

print(fileName,maxR,maxG,maxB)

if maxR >= 0 and maxG >=0 and maxB >=0:

    if maxR > maxG+threshold:

        color = 'MTK'

    elif maxG > maxR+threshold:

        color = 'LEC'

    else:

        color = 'CF'

    else:

        color = 'CF'

IJ.saveAs(imp2save,'tiff',(os.path.join(outDir,color+"_"+subdir)))

```

Segmentation.py

```

from ij import IJ, ImagePlus, ImageStack, CompositeImage

import os

import shutil

import math

```

```

from ij.io import FileSaver

from ij.plugin import ContrastEnhancer

from ij.plugin.frame import RoiManager

from ij.plugin.filter import ParticleAnalyzer as PA, GaussianBlur as GB,
Analyzer, Filler

from ij.measure import Measurements as ms, ResultsTable

from java.awt import Color

from ij.process import LUT, ImageConverter

from ij.plugin import Selection, RoiEnlarger, RoiScaler, RoiRotator,
Straightener

from ij.gui import ShapeRoi

from operator import itemgetter

def findParticles(inputDir, inputImp, minSize, maxSize, minCirc, maxCirc):

#retorna una ImagePlus binaria que contienen las mascaras de las particulas
entre maxsize y minsize

options = PA.SHOW_NONE

#PA.SHOW_MASKS \

#+ PA.EXCLUDE_EDGE_PARTICLES \

#+ PA.INCLUDE_HOLES \

#+ PA.SHOW_RESULTS \

#+ PA.ADD_TO_MANAGER \

# Create a table to store the results

rt = ResultsTable()

# Create a hidden ROI manager, to store a ROI for each blob or cell

rm = RoiManager(True).getInstance()

if (rm==None):

rm = RoiManager()

```

```

        measureOptions = ms.AREA |ms.PERIMETER | ms.CIRCULARITY | ms.CENTROID
|ms.SHAPE_DESCRIPTORS

    p = PA(options, measureOptions, rt, minSize, maxSize, minCirc, maxCirc)

    p.setHideOutputImage(True)#para no mostrar la imagen de salida "Show"

    p.setRoiManager(rm) #dejo pronto para que las regiones de salida queden en el
RoiManager

    #resulta que ParticleAnalyzer busca regiones con fondo blanco

    #porlo tanto tengo que invertir inputImp

    IJ.run(inputImp,"Invert","")

    if p.analyze(inputImp):

        print "All ok"

    else:

        print "There was a problem in analyzing", inputImp

        return rm #retorna el roi manager con las regiones de interes

def findParticles(inputDir, inputImp, minSize, maxSize, minCirc, maxCirc):

    #retorna una ImagePlus binaria que contienen las mascaras de las particulas
entre maxsize y minsize

    options = PA.SHOW_NONE

        #PA.SHOW_MASKS \

        #+ PA.EXCLUDE_EDGE_PARTICLES \

        #+ PA.INCLUDE_HOLES \

        #+ PA.SHOW_RESULTS \

        #+ PA.ADD_TO_MANAGER \

    # Create a table to store the results

    rt = ResultsTable()

    # Create a hidden ROI manager, to store a ROI for each blob or cell

    rm = RoiManager(True).getInstance()

```

```

    if (rm==None):

        rm = RoiManager()

        measureOptions = ms.AREA |ms.PERIMETER | ms.CIRCULARITY | ms.CENTROID
|ms.SHAPE_DESCRIPTORS

        p = PA(options, measureOptions, rt, minSize, maxSize, minCirc, maxCirc)

        p.setHideOutputImage(True)#para no mostrar la imagen de salida "Show"

        p.setRoiManager(rm) #dejo pronto para que las regiones de salida queden
en el RoiManager

        #resulta que ParticleAnalyzer busca regiones con fondo blanco

        #porlo tanto tengo que invertir inputImp

        IJ.run(inputImp,"Invert","")

        if p.analyze(inputImp):

            print "All ok"

        else:

            print "There was a problem in analyzing", inputImp

        return rm #retorna el roi manager con las regiones de interes

srcDir = IJ.getDirectory("Input_directory")

roiDir = os.path.join(srcDir,'ROIs')

maskDir = os.path.join(srcDir,'masks')

if not os.path.exists(roiDir):

    os.makedirs(roiDir)

if not os.path.exists(maskDir):

    os.makedirs(maskDir)

fileNames=os.listdir(srcDir)

for fileName in fileNames:

    if 'MTK' in fileName:

```

```

#abro image y duplico

imp = IJ.openImage(os.path.join(srcDir, fileName))

impNormal = imp.duplicate()

#convierto a RGBStack

IC=ImageConverter(imp)

IC.convertToRGBStack()

stack=imp.getImageStack()

#separo el slice que quiero

color ='rojo'

ipColor=stack.getProcessor(1)

impColor = ImagePlus(fileName[0],ipColor)

#blur, thershold y mask

GB().blurGaussian(ipColor,3)

impMask=impColor.duplicate()

IJ.setAutoThreshold(impMask, 'MaxEntropy')

IJ.run(impMask, 'Convert to Mask','')

#IJ.saveAs(impMask, 'tiff', os.path.join(srcDir, subdir, color+'_mask'))

#abro rois

rm = RoiManager(True).getInstance()

if (rm==None):

    rm = RoiManager()

rm.reset() #dejo la lista de rois vacia

#uso el Particle Analyzer y pongo los roi en una variable

rm = findParticles(srcDir, impMask, 1000, 200000, 0, 1)

roisArray = rm.getRoisAsArray()

```

los roi

```
rm.reset()

#copio la imagen y aplico fill holes para comparar las medias de

impMaskFH=impMask.duplicate()

IJ.run(impMaskFH,'Fill Holes','')

newRois=[]

impMask.getProcessor().setValue(0)

for roi in roisArray:

    rm.addRoi(roi)

    rm.select(impMaskFH,0)

    saveMeasurements = Analyzer.getMeasurements()

    measureOptions = ms.MEAN

    Analyzer.setMeasurements(measureOptions)

    rt = rm.multiMeasure(impMaskFH)

    meanFH = rt.getValueAsDouble(0,0)

    rt.reset()

    rm.select(impMask,0)

    rt = rm.multiMeasure(impMask)

    mean = rt.getValueAsDouble(0,0)

    Analyzer.setMeasurements(saveMeasurements)

    rt.reset()

    rm.reset()

    if meanFH==mean:

        newRois.append(roi)

    else:

        impMask.getProcessor().fill(roi)
```

```

IJ.saveAs(impMask, 'tiff', os.path.join(maskDir, fileName[:-4]+'_mask'))

    for roi in newRois:

        rm.addRoi(roi)

rm.runCommand('Save', os.path.join(roiDir, 'ROI_'+fileName[:-4]+'.zip'))

rm.reset()

#uso el Particle Analyzer y pongo los roi en una variable

IJ.run(impMask, "8-bit", "")

IJ.run(impMask, "Options...", "iterations=3 count=1 do=Nothing")

IJ.run(impMask, "Open", "")

IJ.run(impMask, 'Invert','')

rm = findParticles(srcDir, impMask, 1000, 200000, 0, 1)

#impMask.show()

roisArray = rm.getRoisAsArray()

rm.reset()
IJ.saveAs(impMask, 'tiff', os.path.join(maskDir, fileName[:-4]+'_open_mask'))

    for roi in roisArray:

        rm.addRoi(roi)

rm.runCommand('Save', os.path.join(roiDir, 'ROI_'+fileName[:-4]+'_open.zip'))

```

Measurements.py

```

from ij import IJ, ImagePlus, ImageStack, CompositeImage

import os

import shutil

import math

from ij.io import FileSaver

from ij.plugin import ContrastEnhancer

```

```

from ij.plugin.frame import RoiManager

from ij.plugin.filter import ParticleAnalyzer as PA, GaussianBlur as GB,
Analyzer, Filler

from ij.measure import Measurements as ms, ResultsTable

from java.awt import Color

from ij.process import LUT, ImageConverter

from ij.plugin import Selection, RoiEnlarger, RoiScaler, RoiRotator,
Straightener

from ij.gui import ShapeRoi

mean=[]

imagen=[]

estado=[]

num=[]

area=[]

stdDev=[]

Min=[]

Max=[]

X=[]

Y=[]

XM=[]

YM=[]

perim=[]

intDen=[]

median=[]

area_fraction=[]

intDenRaw=[]

feret=[]

```

```

feretx=[]

ferety=[]

feretangle=[]

minferet=[]

major=[]

minor=[]

angle=[]

ratio=[]

srcDir = IJ.getDirectory("Input_directory")

roiDir = IJ.getDirectory("ROIs_directory")


for filename in os.listdir(srcDir):

    if 'MTK' in filename:

        imp = IJ.openImage(os.path.join(srcDir,filename))

        impNormal = imp.duplicate()

        #convierto a RGBStack

        IC=ImageConverter(imp)

        IC.convertToRGBStack()

        stack=imp.getImageStack()

        #separo el slice que quiero

        ipColor=stack.getProcessor(1)

        impColor = ImagePlus(filename,ipColor)

        #abro rois

        rm = RoiManager(True).getInstance()

        if (rm==None):

            rm = RoiManager()

```

```

rm.reset() #dejo la lista de rois vacia

rm.runCommand("Open",
os.path.join(roiDir, 'ROI_'+filename[:-4]+'.zip'))

RoisMttk = rm.getRoisAsArray()

rm.reset()

for i,roi in enumerate(RoisMttk):

    rm.addRoi(roi)

    rm.select(impColor,0)

    saveMeasurements = Analyzer.getMeasurements()

    measureOptions = ms.MEAN | ms.AREA | ms.STD_DEV
|ms.MIN_MAX| ms.CENTROID | ms.CENTER_OF_MASS | ms.PERIMETER | ms.INTEGRATED_DENSITY |
ms.MEDIAN | ms.AREA_FRACTION | ms.FERET | ms.ELLIPSE

    Analyzer.setMeasurements(measureOptions)

    #IJ.run("Set Measurements...", "area mean standard min
centroid center perimeter integrated median area_fraction redirect=None decimal=3")

    #IJ.run(impColor,"Measure","")

    rt = rm.multiMeasure(impColor)

    print(rt)

imagen.append(filename.replace('MTK_', '').replace('.tif',''))

estado.append('')

num.append(i+1)

area.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(0,0)))

mean.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(1,0)))

stdDev.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(2,0)))

Min.append(rt.getValueAsDouble(3,0))

Max.append(rt.getValueAsDouble(4,0))

X.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(5,0)))

Y.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(6,0)))

```

```

XM.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(7,0)))

YM.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(8,0)))

perim.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(9,0)))

major.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(10,0)))

minor.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(11,0)))

angle.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(12,0)))

feret.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(13,0)))

intDen.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(14,0)))

median.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(15,0)))

area_fraction.append(rt.getValueAsDouble(16,0))

intDenRaw.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(17,0)))

feretx.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(18,0)))

ferety.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(19,0)))

feretangle.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(20,0)))

minferet.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(21,0)))

ratio.append('{0:.3f}'.format(rt.getValueAsDouble(10,0)/rt.getValueAsDouble(11,
0)))

rt.reset()

rm.reset()

file = open(os.path.join(srcDir, 'data_measurements.csv'), 'w')

file.write('Imagen,Estado,Num,Area,Mean,StdDev,Min,Max,X,Y,XM,YM,Perim.,Major,M
inor,Major/Minor,Angle,Feret,IntDen,Median,%Area,IntDenRaw,Feretx,Ferety,FeretAngle,Mi
nFeret\n')

for j in range(len(mean)):

    file.write(imagen[j]+' '+estado[j]+' '+str(num[j])+' '+str(area[j])+' '+str(mea
n[j])+' '+str(stdDev[j])+' '+str(Min[j])+' '+str(Max[j])+' '+str(X[j])+' '+str(Y[j])+'
 '+str(XM[j])+' '+str(YM[j])+' '+str(perim[j])+' '+str(major[j])+' '+str(minor[j])+' '
+str(ratio[j])+' '+str(angle[j])+' '+str(feret[j])+' '+str(intDen[j])+' '+str(median[j]

```

```

])+','+str(area_fraction[j])+','+str(intDenRaw[j])+','+str(feretx[j])+','+str(ferety[j])+','+str(feretangle[j])+','+str(minferet[j])+'\n')

file.close()

'''

subdirs = []

for filename in filenames: # loop through all the files and folders

    if os.path.isdir(os.path.join(srcDir, filename)): # check whether the
current object is a folder or not

        if filename!= 'ALL':

            subdirs.append(filename)

subdirs.sort()

print(subdirs)

for subdir in subdirs:

    if subdir != 'ALL':

        NumStr = subdir

        if len(NumStr) == 1:

            NumStr = '0' + NumStr

        for fileName in os.listdir((os.path.join(srcDir,subdir))):

            if 'rojo.tif' in fileName or 'verde.tif' in fileName:

                #abro image y duplico

                imp = IJ.openImage(os.path.join(srcDir,subdir,fileName))

                impNormal = imp.duplicate()

                #convierto a RGBStack

                IC=ImageConverter(imp)

                IC.convertToRGBStack()

                stack=imp.getImageStack()

```

```

#separo el slice que quiero

if 'rojo.tif' in fileName:

    color ='rojo'

    ipColor=stack.getProcessor(1)

else:

    color ='verde'

    ipColor=stack.getProcessor(2)

impColor = ImagePlus(fileName[0],ipColor)

#blur, thershold y mask

GB().blurGaussian(ipColor,3)

impMask=impColor.duplicate()

IJ.setAutoThreshold(impMask, 'MaxEntropy')

IJ.run(impMask, 'Convert to Mask','')

#IJ.saveAs(impMask,'tiff',os.path.join(srcDir,subdir,color+'_mask'))

#abro rois

rm = RoiManager(True).getInstance()

if (rm==None):

    rm = RoiManager()

rm.reset() #dejo la lista de rois vacia

#uso el Particle Analyzer y pongo los roi en
una variable

rm = findParticles(srcDir, impMask, 5, 100000, 0, 1)

roisArray = rm.getRoisAsArray()

rm.reset()

#copio la imagen y aplico fill holes para comparar
las medias de los roi

```

```

impMaskFH=impMask.duplicate()

IJ.run(impMaskFH,'Fill Holes','')

newRois=[]

impMask.getProcessor().setValue(0)

for roi in roisArray:

    rm.addRoi(roi)

    rm.select(impMaskFH,0)

    saveMeasurements                                =

Analyzer.getMeasurements()

    measureOptions = ms.MEAN

Analyzer.setMeasurements(measureOptions)

    rt = rm.multiMeasure(impMaskFH)

    meanFH = rt.getValueAsDouble(0,0)

    rt.reset()

    rm.select(impMask,0)

    rt = rm.multiMeasure(impMask)

    mean = rt.getValueAsDouble(0,0)

Analyzer.setMeasurements(saveMeasurements)

    rt.reset()

    rm.reset()

    print(mean,meanFH)

    if meanFH==mean:

        newRois.append(roi)

    else:

        impMask.getProcessor().fill(roi)

```

```

IJ.saveAs(impMask, 'tiff', os.path.join(srcDir, subdir, color+'_mask'))

IJ.saveAs(impMask, 'tiff', os.path.join(srcDir, 'ALL', color+'_mask_'+os.path.basename(os.
path.normpath(srcDir))+'_'+subdir))

    IJ.saveAs(impNormal, 'tiff', os.path.join(srcDir, 'ALL', color+'_'+os.path.basename
(os.path.normpath(srcDir))+'_'+subdir))

        for roi in newRois:

            rm.addRoi(roi)

            rm.runCommand('Save', os.path.join(srcDir, subdir, 'ROI_'+color+'.zip'))

            rm.runCommand('Save', os.path.join(srcDir, 'ALL', 'ROI_'+color+'_'+os.path.basename
(os.path.normpath(srcDir))+'_'+subdir+'.zip'))

                rm.reset()

                #uso el Particle Analyzer y pongo los roi en una
variable

                IJ.run(impMask, "8-bit", "")

                IJ.run(impMask, "Options...", "iterations=3 count=1
do=Nothing")

                IJ.run(impMask, "Open", "")

                IJ.run(impMask, 'Invert','')

                rm = findParticles(srcDir, impMask, 5, 100000, 0, 1)

                #impMask.show()

                roisArray = rm.getRoisAsArray()

                rm.reset()

IJ.saveAs(impMask, 'tiff', os.path.join(srcDir, subdir, color+'_open_mask'))

IJ.saveAs(impMask, 'tiff', os.path.join(srcDir, 'ALL', color+'_open_mask_'+os.path.basename
(os.path.normpath(srcDir))+'_'+subdir))

        for roi in roisArray:

            rm.addRoi(roi)

```

```
rm.runCommand('Save',os.path.join(srcDir,subdir,'ROI_'+color+'_open.zip'))

rm.runCommand('Save',os.path.join(srcDir,'ALL','ROI_'+color+'_open_'+os.path.basename(os.path.normpath(srcDir))+ '_' +subdir+'.zip'))

#rm.runCommand('Save',os.path.join(srcDir,'ALL','ROI_'+NumStr+'_'+color+'.zip'))
```