



## **TESIS de DOCTORADO**

**Programa de Investigación Biomédica (PRO. IN. BIO)**

# **Estudio morfológico de las mitocondrias espermáticas como fundamento de la fisiología espermática normal y de la infertilidad en el varón**

**María Fernanda Skowronek**

**Dra. en Medicina**

**Orientadora: D. Sc Rossana Sapiro**

**Co-orientadora: D. Sc Adriana Cassina**

**Tribunal: D. Sc Rosana Rodríguez Casuriaga, D. Sc Jorge Gil, D. Sc Alvaro Gómez**

**Unidad Académica de Histología y Embriología**

**Facultad de Medicina - Universidad de la República**

**Montevideo - Uruguay**

**2025**

## AGRADECIMIENTOS

*“Gracias, muchas y a muchos... en particular a todos aquellos, que de una forma u otra, han colaborado para que alcance mis logros”...*

- ❖ A los pacientes en particular, sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible. Gracias porque en su “afán de concebir” ceden generosamente, muchas veces aún sin saberlo, aquello que para nosotros es simplemente un objeto de estudio.
- ❖ A mis tutoras, Rossana y Adriana, por enseñarme, acompañarme y guiarme en este trabajo. Gracias por la paciencia y por tolerar mis tiempos muchas veces muy diferentes a lo que ellas hubiesen deseado.
- ❖ A Santiago, “Santi”, co-primer autor en uno de los trabajos que sustenta esta tesis, por su compañerismo, su constancia, por los tiempos y el trabajo compartido.
- ❖ A los ingenieros: en especial a Mauricio y Gabriel, gracias por su expertise, por todo el trabajo conjunto, gracias por los “scripts”, sin los cuales nada de esto hubiera salido. Pero sobre todo gracias por el tiempo compartido y por convencerme de que siempre vale la pena conocer gente nueva. Gracias a Federico por el padrinazgo en todo esto.
- ❖ A la Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Facultad de Ciencias (UMET) y a mis queridas compañeras y amigas, en particular a Gaby y Mage. Gracias por la disposición, por el apoyo, por los consejos y acompañamiento de siempre.
- ❖ A todos mis compañeros del laboratorio, “las sperm girls” y los “sperm boys” por su buena onda y empuje constante.
- ❖ A mi querida “Histología”, la que alguna vez, muchos años atrás, hizo que me enamorara de la docencia y de la morfología, dejando de lado la clínica y otros menesteres.
- ❖ A todos mis compañeros del Departamento de Histología, desde los más “viejos” quienes me dieron las primeras “herramientas”, me formaron y enseñaron el “gusto por la morfología”, hasta los más nuevos. Gracias a todos por la buena onda, por el empuje constante, por el ánimo, no imaginan lo importante que es eso.

- ❖ A Fertilab, actualmente Reprovitas, y todos sus integrantes, quienes muy gentilmente han colaborado en mi recolección de muestras y de datos.
- ❖ A los integrantes del tribunal por acceder y dedicar su tiempo a evaluar esta tesis. Gracias por los aportes, son siempre más que bienvenidos.
- ❖ A mis queridas hijas, a mi “Rita bonita” y a mi “Nuria hermosa”... por haber cedido generosamente mucho “tiempo de compartir juntas”... el cual yo, egoístamente, se los he quitado.

## ÍNDICE

<b>PRÓLOGO</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>1. - El espermatozoide</b>	
Estructura, desarrollo y función .....	9
<b>2. - La mitocondria</b>	
Origen, morfología y función .....	14
Producción de energía en forma de ATP .....	16
Generación de especies reactivas .....	17
Apoptosis o muerte celular programada .....	18
Dinámica mitocondrial .....	19
Rol de la mitocondria en el espermatozoide .....	21
<b>3. - Infertilidad</b>	
Infertilidad masculina .....	23
Estudio del hombre infértil .....	25
Rol de la mitocondria en la infertilidad masculina .....	28
Morfología espermática y rol de la morfología mitocondrial en la infertilidad masculina .....	29
<b>4. - Procesamiento de Imágenes</b>	
Análisis morfométrico mitocondrial .....	30
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	33
Objetivo general .....	33
Objetivos específicos .....	33

<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	34
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	35
Objetivo 1 .....	35
Estrategia del objetivo 1 .....	35
Software utilizado .....	35
Obtención de imágenes .....	36
Almacenamiento de las imágenes .....	37
Obtención de la herramienta de análisis y aplicación de la misma .....	37
Scripts generados .....	39
Procesamiento de las imágenes .....	44
Segmentación y generación de regiones de interés .....	45
Validación de las regiones de interés .....	47
Generación de un script de validación .....	48
Obtención de los parámetros morfométricos .....	49
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	51
Objetivo 2 .....	51
<b>MATERIALES y MÉTODOS</b> .....	51
Animales, obtención y preparación de los espermatozoides .....	51
Evaluación de la reacción acrosómica con azul de Coomassie (Coomassie Blue) .....	52
Fertilización in vitro (FIV) .....	53
Microscopía de fluorescencia (preparación de los espermatozoides para el análisis de la pieza media y de la reacción acrosómica) .....	53
Microscopía de Epifluorescencia .....	54
Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) .....	54
Procesamiento de imágenes .....	55

Análisis estadístico .....	55
<b>RESULTADOS</b> .....	55
Eventos asociados a la capacitación tras la incubación de los espermatozoides en un medio capacitante .....	55
Reducción del área de la pieza media espermática bajo condiciones capacitantes .....	57
Reducción del área de la pieza media espermática en espermatozoides que sufrieron la reacción acrosómica .....	58
Análisis del valor medio de fluorescencia a nivel de la pieza media espermática .....	61
Análisis ultraestructural de la pieza media espermática .....	62
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	65
Objetivo 3 .....	65
<b>MATERIALES y MÉTODOS</b> .....	65
Población de estudio y recolección de las muestras humanas .....	65
Análisis de rutina del semen .....	66
Evaluación de la morfología de la pieza media espermática mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal .....	67
Separación de espermatozoides apoptóticos y no apoptóticos .....	67
Evaluación ultraestructural de la morfología mitocondrial espermática mediante microscopía electrónica de transmisión .....	68
Evaluación de la morfología de la pieza media espermática mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal luego del tratamiento con inhibidores mitocondriales .....	68
Evaluación de la ultraestructura mitocondrial luego del tratamiento con drogas mitocondriales .....	69
Procesamiento de imágenes .....	70

Análisis estadístico .....	70
<b>RESULTADOS</b> .....	70
Datos clínicos y análisis del semen .....	70
Análisis de la pieza media espermática mediante microscopía confocal y microscopía de epifluorescencia .....	71
Análisis morfométrico de las piezas medias espermáticas .....	72
Análisis de la pieza media espermática mediante microscopía electrónica de transmisión .....	74
Análisis morfométrico ultraestructural .....	75
Morfología mitocondrial en espermatozoides apoptóticos .....	76
Análisis de la pieza media espermática mediante microscopía confocal y microscopía de epifluorescencia luego del tratamiento con drogas mitocondriales .....	79
Análisis de la pieza media espermática mediante microscopía electrónica luego del tratamiento con drogas mitocondriales .....	81
<b>DISCUSIÓN</b> .....	83
<b>CONCLUSIONES</b> .....	89
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	90
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	91

## **PRÓLOGO**

Esta tesis y los resultados que se presentan a continuación tienen como principal objeto de estudio el espermatozoide. Los distintos experimentos realizados así como los algoritmos generados para el estudio, comprensión y análisis de los mismos tienen como eje central a las mitocondrias espermáticas y su particular organización y morfología. La generación de conocimiento al respecto resulta esencial, no solo para lograr una mejor comprensión de la fisiología espermática en distintos procesos, como por ejemplo la capacitación, sino también para dar pautas que permitan entender procesos patológicos, como los mecanismos que subyacen a la infertilidad en el varón.

## **RESUMEN**

El espermatozoide es una célula haploide, muy especializada que se encuentra tanto morfológica como funcionalmente diseñada para cumplir su función de fertilización. Consta de una cabeza donde se encuentra el material genético que permitirá reconstituir la diploidía al fusionarse con el núcleo del ovocito y una cola o flagelo que le permitirá alcanzarlo y fecundarlo. Durante la espermatogénesis, los espermatozoides pierden la mayoría de sus organelos junto con gran parte del contenido citoplasmático, pero conservan las mitocondrias. Las mitocondrias espermáticas se encuentran localizadas en la primera parte del flagelo, la pieza media, y se disponen siguiendo un patrón helicoidal, dando giros en torno al axonema. Se conectan entre sí a través de puentes disulfuro y al citoesqueleto subyacente a través de complejos proteicos, generando una estructura relativamente rígida. Además, fallas en el preciso ordenamiento mitocondrial podrían conducir a alteraciones en la motilidad, a la producción de espermatozoides defectuosos y a problemas para la fertilización. Los espermatozoides adquieren su potencial fecundante luego de permanecer en el tracto genital femenino a través de la capacitación. La capacitación consiste en una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales que ocurren en el tracto genital femenino y lo preparan para la fecundación. Durante la capacitación, el espermatozoide sufre la reacción acrosómica y un cambio en el patrón de movimiento espermático denominado hiperactivación. Planteamos que cambios morfológicos en las mitocondrias pueden acompañar estos cambios funcionales del espermatozoide. Nos propusimos generar herramientas informáticas capaces de reconocer, medir y cuantificar cambios morfométricos a nivel de la pieza media espermática y de la propia mitocondria y aplicarlas al estudio de los

espermatozoides. Postulamos que la función mitocondrial en los espermatozoides se refleja en cambios morfológicos de la pieza media y en particular de las mitocondrias durante la capacitación y, además, que dichos cambios morfológicos pueden ser indicadores de alteraciones de los espermatozoides en pacientes infértiles. Utilizamos imágenes de espermatozoides obtenidas por microscopía de epifluorescencia o por microscopía electrónica, las procesamos con softwares libres adaptándolos a la forma y tamaño de las mitocondrias en la pieza media, generando datos que nos permitieron describir y cuantificar cambios morfométricos.

Como resultados: 1- Generamos scripts y algoritmos que ajustamos a las diferentes necesidades experimentales.

2- Evidenciamos, una reducción del área y ancho de la pieza media en espermatozoides de ratón que sufrieron la reacción acrosómica durante la capacitación.

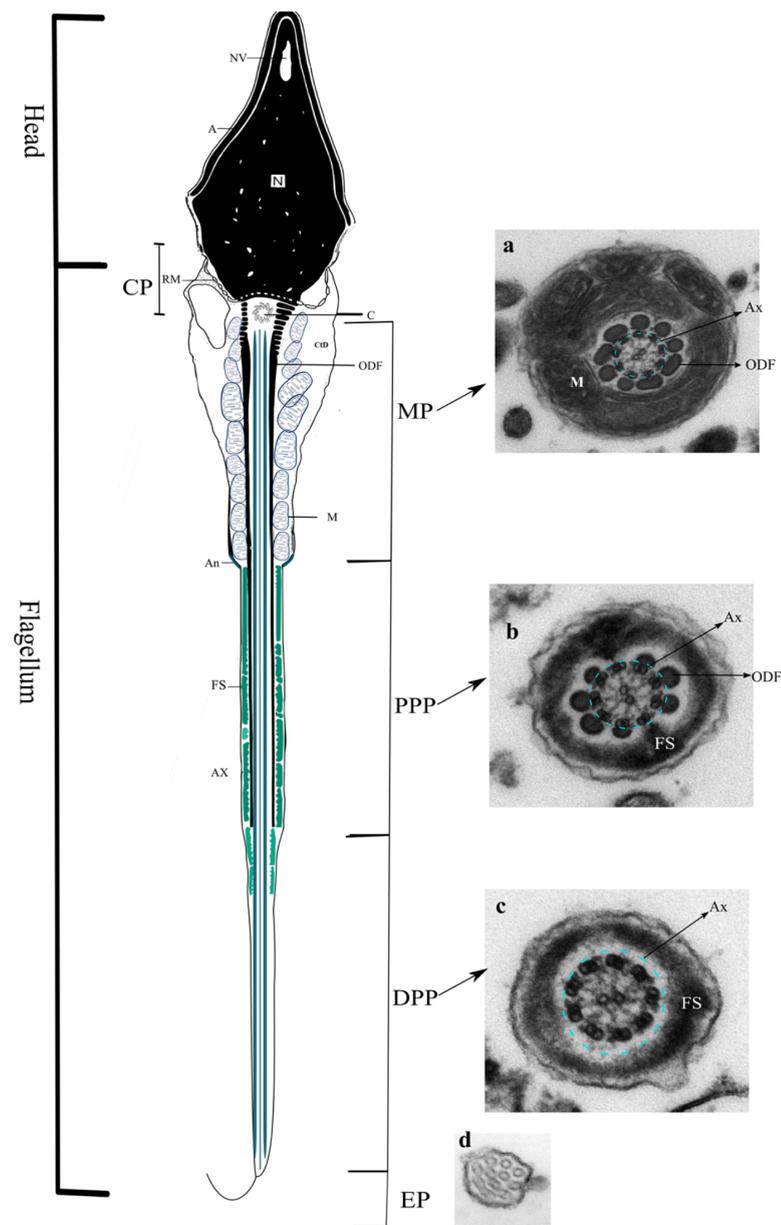
3- En espermatozoides humanos, las piezas medias fueron más cortas y anchas en muestras de semen con alteraciones en el espermiograma que con espermiograma normal. El análisis ultraestructural en hombres infértiles, mostró mitocondrias grandes y ensambladas de forma irregular con mayor área y menor circularidad en el análisis morfométrico, similares a las mitocondrias de espermatozoides apoptóticos.

4- En sujetos sin alteraciones en los parámetros espermáticos, constatamos un aumento del área de la pieza media espermática luego de la incubación de los espermatozoides con drogas dirigidas a la mitocondria.

A través de este trabajo logramos desarrollar herramientas informáticas para analizar la morfología mitocondrial en el espermatozoide, tanto a nivel celular como subcelular. Los resultados obtenidos revelan cambios en la morfología y organización mitocondrial en espermatozoides maduros de ratón y humanos en diversas condiciones. Dichos hallazgos sugieren que existen cambios en la morfología mitocondrial espermática que podrían ser base para el entendimiento de la etiopatogenia de la infertilidad. Los datos obtenidos destacan el potencial del algoritmo como una herramienta robusta para el análisis cuantitativo de la morfología mitocondrial y para su aplicación en diversos contextos para evaluar la calidad espermática y con potencial diagnóstico en el estudio del hombre infértil.

## 1. - El espermatozoide Estructura, desarrollo y función

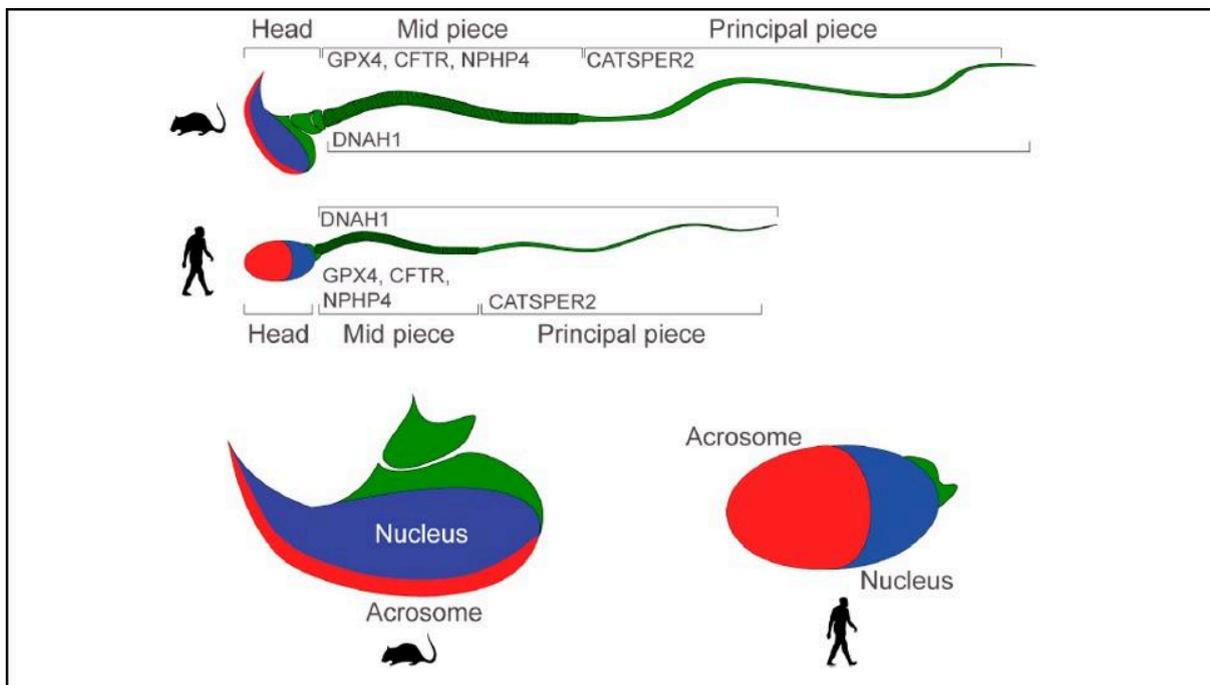
El espermatozoide, tiene como principal objetivo encontrarse con el ovocito y fecundarlo. Durante dicho proceso, además de suministrar al ovocito el material genético paterno, aporta algunas proteínas necesarias para la fertilización [1]. Se encuentra tanto morfológica como funcionalmente diseñado con el fin de cumplir dicho objetivo (Figura 1).



**Figura 2. Esquema ilustrativo de un espermatozoide humano.** A la derecha se observan las características ultraestructurales del flagelo espermático y sus envolturas. Extraído de Pereira et al. [2]

Si bien la morfología espermática varía según la especie [3], en general el espermatozoide maduro consta de dos partes principales: una cabeza, donde se localiza el núcleo que contiene el material genético altamente compactado y el acrosoma, y una cola que permite el desplazamiento [4]. La cola o flagelo espermático se puede considerar un cilio especializado, con una estructura compleja que involucra más de mil proteínas implicadas en su función [2] [5]. Se le describen clásicamente cuatro porciones: una pieza de conexión o cuello, que lo une a la cabeza y contiene al centriolo además de otras estructuras proteicas, una pieza intermedia, una pieza principal y la pieza terminal. Cada una de dichas piezas tiene como eje central al axonema, una estructura microtubular formada por nueve dobletes periféricos y un par central de microtúbulos, unidos entre sí por proteínas radiales y dineína (entre otras), y una envoltura que lo caracteriza, a excepción de la pieza terminal, que está desprovista de estructuras periaxonemales (Figura 1) [2].

La pieza media espermática (PME), mide alrededor de 5-7  $\mu\text{m}$  de longitud en el espermatozoide humano, es más larga en el ratón (aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ ), y se caracteriza por la presencia de la vaina mitocondrial (ver esquema de la Figura 2).



**Figura 2. Esquema comparativo.** Se observan las principales diferencias morfológicas y de tamaño entre los espermatozoides humanos y de ratón. Se representa también la expresión diferencial de algunas proteínas implicadas en la regulación de la motilidad y habilidad para interactuar con el ovocito. Extraído y adaptado de Linn et al. [6]

Allí las mitocondrias se disponen siguiendo un patrón helicoidal, dando giros en torno al axonema, cuyo número varía según la especie. Si bien en los espermatozoides humanos hay una gran variabilidad, se describen aproximadamente 10-12 giros mitocondriales mientras que en el ratón se han reportado alrededor de 90 giros [3], [7]. Esas mitocondrias de características únicas, se interconectan con sus vecinas a través de enlaces inter-mitocondriales y al citoesqueleto subyacente a través de complejos proteicos conservados en la membrana mitocondrial externa [8], constituyendo una estructura similar a una cápsula que proporciona estabilidad mecánica, protección y resistencia a los cambios osmóticos [9].

La pieza principal, porción más larga del flagelo, se caracteriza por la presencia de las fibras densas externas y de la vaina fibrosa, la cual consiste en dos columnas longitudinales conectadas por costillas semicirculares muy próximas entre sí [10], [11]. Esta estructura estaría implicada en la flexibilidad del espermatozoide, el plano de movimiento y forma del batido flagelar, a la vez que, dada su composición proteica y su asociación con proteínas vinculadas a distintas vías de señalización, podría estar involucrada en la regulación de los distintos procesos que sufre el espermatozoide y que hacen posible la fertilización del ovocito (maduración, motilidad, capacitación, hiperactivación y/o reacción acrosómica) [12]. Por otro lado, numerosos trabajos la asocian con patología espermática e infertilidad en el varón [13] [14], [15], [16], [17].

El espermatozoide, es una célula completamente diferenciada y terminal, se genera como producto del proceso denominado espermatogénesis. Dicho proceso de división y diferenciación celular determina la formación de células haploides, los gametos masculinos. La espermatogénesis comienza durante la pubertad, bajo el efecto de hormonas hipotálamo - hipofisarias, y se perpetúa durante prácticamente toda la vida adulta. Se lleva a cabo en el testículo, particularmente en la pared del túbulo seminífero. Allí las espermatogonias, células precursoras de los gametos masculinos, sufren reiteradas divisiones mitóticas para dar luego inicio a la meiosis, responsable de la reducción cromosómica de los gametos. Una vez culminada la meiosis y como fase final de la espermatogénesis se produce la espermiogénesis. Durante el proceso de espermiogénesis las espermátidas redondas modelan sus características anatómo-funcionales a través de un complicado proceso hormonodependiente y regulado por miles de genes [18], conservando solamente aquellas estructuras necesarias para la fecundación. Durante dicho proceso además de los fenómenos que determinan la compactación de la cromatina y generación del acrosoma, se produce la formación del flagelo y el desarrollo de las distintas envolturas antes mencionadas, las cuales

caracterizan cada una de las regiones de la cola espermática [19]. Por ejemplo, las mitocondrias, que se encuentran originalmente en el citoplasma periférico, migran y se acumulan alrededor de la porción proximal del filamento axial. El movimiento de las mitocondrias se asocia con la pérdida de una gran proporción de citoplasma como cuerpo residual [20], [21]. Los mecanismos que generan y mantienen la disposición organizada de las mitocondrias en la pieza media son poco conocidos. Éstas se disponen formando una vaina compacta en donde las mitocondrias permanecen unidas mediante puentes disulfuro [22], [23] siguiendo, como se mencionó anteriormente, una disposición helicoidal [24]. Fallas en este preciso ordenamiento mitocondrial podrían conducir a alteraciones en la motilidad y a problemas de infertilidad como se planteará más adelante.

Luego de la espermiogénesis y tras el proceso de espermiación, se libera a la luz del túbulo seminífero, una célula pequeña (60  $\mu\text{m}$  de longitud en el humano y 124  $\mu\text{m}$  en el ratón), de cabeza aplanada y piriforme ocupada casi exclusivamente por un núcleo muy heterocromático debido a la alta compactación de la cromatina y con una cola con las características ya descritas. Rodeando los dos tercios anteriores del núcleo encontramos el acrosoma, una vesícula que contiene enzimas líticas necesarias para la fecundación [25]. En el ratón, en cambio, la cabeza del espermatozoide, de mayores dimensiones, tiene una forma de hoz o de gancho característica, aplanada y curva, con un núcleo compacto y el acrosoma, que cubre parcialmente la región anterior, con aspecto de casquete o “coma” [26] (ver Figura 2).

El espermatozoide deberá encontrar al ovocito y fecundarlo [27]. Sin embargo, una vez liberado en la luz del túbulo seminífero, el espermatozoide es inmóvil, aún “no fecundante”, debiendo sufrir una serie de modificaciones que le posibilitarán cumplir con su función. En los mamíferos, es necesario que el espermatozoide adquiera movilidad para poder alcanzar al ovocito, deberá madurar y capacitarse [27], [28]. La maduración espermática se produce en el epidídimo y consiste en una serie de cambios que involucran la adquisición de movilidad, un aumento en la compactación de la cromatina y la adquisición de factores “decapacitantes” (colesterol, glicoconjugados, distintos factores decapacitantes contenidos en los epididimosomas o exosomas liberados a la luz del epidídimo por el epitelio epididimario) que aseguran que el espermatozoide sea “incapaz” de sufrir la reacción acrosómica o de fusionarse con el ovocito antes de tiempo [27], [29], [30]. Esto inhibe de manera temporal y reversible la capacidad fecundante del espermatozoide.

La capacitación espermática se produce en el tracto reproductor femenino [31]. Dicho proceso consiste en una serie de cambios bioquímicos y funcionales que tienen lugar tanto en la

cabeza como en la cola del espermatozoide e implican la remoción de los factores decapacitantes adquiridos durante la maduración en el epidídimo [27], [28], [31].

Durante la capacitación se describen: cambios en la membrana plasmática, determinados por un aumento en la fluidez de misma, vinculados a una pérdida de colesterol, y cambios en la permeabilidad iónica, que resultan en un aumento del pH intracelular y en una hiperpolarización de la membrana plasmática [32], [33]. Los cambios moleculares tempranos incluyen el aumento intracelular del AMPc así como la liberación de calcio, necesarios para que se produzcan modificaciones proteicas postraduccionales como la fosforilación en tirosina de determinadas proteínas espermáticas [34], [35], [36]. Esto es seguido por cambios funcionales como la hiperactivación y la reacción acrosómica [27], [28], [34], [35]. La hiperactivación se caracteriza por la adquisición, por el espermatozoide, de un movimiento flagelar más dinámico y vigoroso y con un patrón de batido asimétrico, de alta amplitud y velocidad, que determina un movimiento enérgico, no progresivo, con las fuerzas propulsivas necesarias para que el espermatozoide alcance al ovocito, penetre y atraviese sus envolturas [34], [37]. La reacción acrosómica, un proceso calcio dependiente, se caracteriza por la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del espermatozoide [36]. Durante este particular proceso de exocitosis, el acrosoma, generado durante la espermiogénesis y derivado del aparato de Golgi, libera las enzimas proteolíticas contenidas en él [34], [38].

Los procesos que tienen lugar durante la capacitación se encuentran específicamente regulados por distintas vías de señalización intracelular que involucran aumento en el AMPc, movimiento de iones a través de canales específicos, modificaciones en el pH, cambios en el potencial de membrana, etc. [34], [36], [39], [40]. El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) actúa como un segundo mensajero crucial en la modulación de varios de los procesos fisiológicos mencionados, los cuales forman parte de la capacitación, como la hiperactivación y la reacción acrosómica [41]. La reacción acrosómica en sí misma involucra numerosas vías de señalización intracelular mediadas por calcio que son comunes a otros tipos celulares [42]. Este proceso estaría determinado por un aumento brusco inicial de las concentraciones de calcio en la cabeza del espermatozoide, seguido de una fase de relajación en la que la concentración de calcio tiende hacia un nivel constante y elevado [36], [42]. El  $\text{Ca}^{2+}$  y también el  $\text{K}^{+}$ , son esenciales para la fertilidad masculina, tanto durante la capacitación como durante la espermiogénesis y la maduración epididimaria [43]. Se describen varios canales de calcio específicos de los espermatozoides, entre ellos CatSper, implicados en la regulación de la señalización de dicho ión en los espermatozoides de mamíferos [41]. SLO3 es el principal canal implicado en la

corriente de  $K^+$  durante la capacitación espermática en roedores, aunque se describen diferentes canales en otras especies [39], [40], [43].

Del mismo modo, distintos factores externos como ser el pH del medio, la concentración de progesterona, óxido nítrico, interleucinas o incluso el GABA, a nivel del tracto reproductor femenino, estimulan, determinan o regulan, entre otros, y a través de la activación de distintas vías de señalización intracelular, los eventos de capacitación descritos previamente [44], [45]. Todos estos hallazgos han sido fundamentales para conocer el comportamiento espermático y los fenómenos que subyacen el proceso de fecundación. Han permitido reproducir in vitro las condiciones necesarias para que se produzca la fertilización, recrear condiciones experimentales que repliquen las condiciones in vivo, e incluso modular el éxito de las terapias de reproducción asistida [46]. Frente a condiciones experimentales, in vitro, es posible, incubando los espermatozoides durante 1-2 hs en ratón o 4-12 hs en humanos, en medios que contengan la composición de iones y metabolitos presentes en el tracto reproductor femenino, lograr la capacitación. Para ello se requieren medios que contengan  $Ca^{2+}$ , bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), una fuente de proteína y una fuente de energía (piruvato, glucosa, lactato) [47]. 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  $HCO_3^-$  [33], [35], [48].

Si bien mucho se ha estudiado y existen varios trabajos publicados sobre los cambios bioquímicos y moleculares que subyacen en los fenómenos de capacitación espermática, poco se conoce sobre la existencia de cambios morfológicos que acompañen dicho proceso. Los primeros estudios de microscopía electrónica que se realizaron al respecto, planteaban la no existencia de modificaciones morfológicas durante la capacitación, más allá de la pérdida del acrosoma [49]. Sin embargo, trabajos posteriores, utilizando microscopía de Rayos-X, mostraron que la morfología mitocondrial en espermatozoides humanos podría modificarse durante la capacitación, traduciéndose en un probable aumento o distensión del tamaño mitocondrial [50].

## **2. - La mitocondria**

### **Origen, morfología y función**

Se cree que las mitocondrias se originaron a partir de bacterias aeróbicas parásitas, durante la evolución de las células eucariotas, por un proceso de endosimbiosis. Esto explicaría su morfología y la presencia del ADN mitocondrial, el cual se transmite de generación en

generación solo por vía materna (dado que las mitocondrias espermáticas no ingresan al ovocito durante la fecundación) [51].

Se describen como organelos celulares dinámicos, de doble membrana, con funciones muy diversas [52], [53]. En ellas se produce la mayor parte de la energía necesaria para las funciones celulares. Esta energía se produce en forma de ATP (trifosfato de adenosina), a través del proceso conocido como respiración celular. Además, las mitocondrias cumplen otras funciones vitales para las células: son capaces de proporcionar intermediarios metabólicos para la biosíntesis de macromoléculas, señalar las vías apoptóticas que conducen a la “muerte celular programada”, producir especies reactivas del oxígeno (ROS) y regular la concentración intracelular de calcio [54].

Desde el punto de vista estructural las mitocondrias se caracterizan por presentar una doble membrana, la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI), no contiguas. Dichas membranas delimitan dos compartimentos diferentes: un compartimento interno, de mayor tamaño, denominado matriz mitocondrial y un espacio menor, localizado entre la MME y la MMI denominado espacio intermembranoso [55].

La MME rodea todo el organelo, actúa como una barrera entre la mitocondria y el citoplasma y participa en el intercambio de pequeñas moléculas y de información entre la mitocondria y el citosol, siendo altamente permeable [55], [56]. Además de sus funciones estructurales y de transporte, la MME también está involucrada en una variedad de vías de señalización intracelular, como por ejemplo la vía intrínseca de la apoptosis y contiene las proteínas y moléculas involucradas en los fenómenos de dinámica mitocondrial [57].

La MMI es selectivamente permeable. Presenta invaginaciones denominadas crestas que aumentan su superficie y contiene numerosas proteínas involucradas en el transporte de electrones y síntesis de ATP (fosforilación oxidativa), así como otros transportadores específicos como los transportadores mitocondriales de piruvato y las translocasas de ATP/ADP, que permiten la movilización de moléculas hacia y desde la mitocondria [55], [56].

La MMI también es crítica para la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  [57]. Contiene varios transportadores de calcio, incluyendo el uniportador mitocondrial de calcio (MCU) y el intercambiador mitocondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX). Estos transportadores regulan el flujo de iones de calcio hacia dentro y fuera de la mitocondria, manteniendo los niveles apropiados del mismo dentro del organelo [57]. Contiene varias enzimas que controlan la producción de ROS, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX) [57]. Finalmente, la MMI también desempeña un papel importante en la regulación de la apoptosis, a través del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), un canal ensamblado por un gran complejo

proteico ubicado en dicha membrana. La apertura del mPTP conduce a la liberación de citocromo C y otras moléculas apoptóticas desde la mitocondria hacia el citoplasma, desencadenando dicho fenómeno [57].

El espacio intermembrana es la parte más pequeña y más estrecha de la mitocondria [51], [56]. Posee una amplia variedad de vías de importación de proteínas, lo que permite la incorporación de diversas proteínas esenciales para el mantenimiento del ADN mitocondrial. También posee enzimas responsables de catalizar la formación de enlaces disulfuro, fundamentales para el correcto plegamiento y la estabilidad de muchas proteínas mitocondriales y de secreción [57]. Cualquier alteración en la homeostasis del espacio intermembrana puede conducir a disfunción mitocondrial, y por ende a patologías tales como trastornos metabólicos, disfunción del sistema inmunológico y enfermedades neurodegenerativas [57], [58].

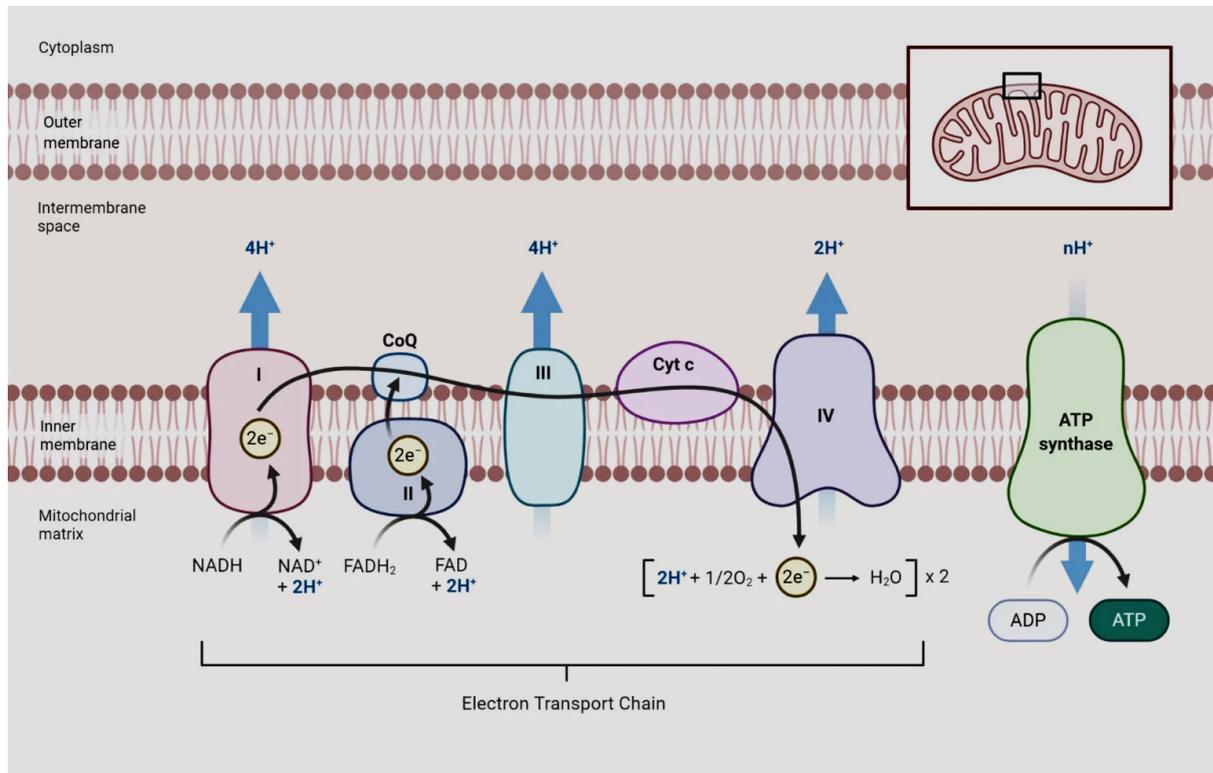
La matriz mitocondrial contiene ribosomas, el ADN mitocondrial, moléculas transportadas selectivamente y enzimas encargadas de los procesos del metabolismo intermediario [55], [56]. En dicha matriz se produce el ciclo de Krebs, ruta final común del catabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (TCA) y la degradación de ácidos grasos ( $\beta$  oxidación) [51], [56].

La estructura mitocondrial descrita y las propiedades de sus componentes permiten a la mitocondria realizar sus múltiples funciones. A continuación nos enfocaremos en aquellas funciones vinculadas con el desarrollo de la tesis y sus particularidades en el espermatozoide.

### **Producción de energía en forma de ATP**

A través de transportadores específicos localizados en la MMI, distintas moléculas derivadas de los alimentos, como el piruvato, los ácidos grasos y aminoácidos, ingresan a la matriz mitocondrial, desde el citosol, donde son convertidos en Acetil CoA. La metabolización de dicha molécula intermediaria, en el ciclo de Krebs, genera NADH y FADH<sub>2</sub>, coenzimas de oxido reducción que ceden sus electrones a la cadena respiratoria. Los electrones pasan a lo largo de la cadena de transporte de electrones para ser finalmente entregados al oxígeno, último aceptor, reduciéndose y formando agua [51], [56]. Dicho transporte se produce a lo largo de cuatro complejos (denominados del I al IV), la coenzima Q y el citocromo C, localizados en la MMI. Este transporte de electrones permite la salida de protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana, formándose un gradiente electro-químico. Cuando los protones reingresan a la matriz a través de la ATP sintasa (complejo V) se produce la síntesis

de ATP. La producción de ATP a nivel de la cadena respiratoria se denomina fosforilación oxidativa. Dicho ATP es liberado al exterior, al mismo tiempo que el ADP y fosfato reingresan al interior de la matriz mitocondrial [51], [56].



**Figura 3. Esquema ilustrativo.** Se representa la cadena de transporte de electrones a nivel de la membrana mitocondrial interna. Extraído y adaptado de: <https://microbenotes.com/oxidative-phosphorylation>

### Generación de especies reactivas

El 90% de las especies reactivas del oxígeno (ROS = Reactive Oxygen Species, por sus siglas en inglés), se forman durante la respiración mitocondrial [51], [59]. El principal sitio de producción de ROS en la mitocondria son fundamentalmente los complejos I y III, formando anión superóxido [60]. La formación del radical libre superóxido aumenta frente a un daño o en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria como la Rotenona (inhibidor del complejo I) o la Antimicina A (AA) (inhibidor del complejo III) [61], [62]. Los radicales libres determinan peroxidación lipídica, pérdida de integridad de la membrana con aumento de permeabilidad, daño estructural del ADN y finalmente apoptosis, conduciendo a la muerte celular [51], [63]. Las propias proteínas mitocondriales son un blanco clave para estos daños lo que perpetúa la producción de ROS y la generación de más daño [64]. Es fundamental que se produzca un delicado balance entre los efectos perjudiciales y beneficiosos de los radicales

libres mediante mecanismos denominados de “regulación redox” [65]. En células somáticas se estima que un 0.2% del oxígeno es convertido en anión superóxido a nivel de la cadena respiratoria y que puede llegar al 2% durante la disfunción mitocondrial [59], [66]. El radical superóxido y el óxido nítrico reaccionan formando peroxinitrito, un potente agente oxidante y nitrante [66], [67], [68]. La acumulación de moléculas nitradas refleja un desbalance entre la formación de oxidantes y defensas antioxidantes denominado estrés nitro-oxidativo [60], [69]. El estrés nitro-oxidativo produce disfunción mitocondrial en enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares [63], [70], [71], [72], [73], [74] se lo ha asociado también a cáncer [75] y diabetes [76] y podría estar vinculado a la etiopatogenia de la infertilidad masculina [64], [77].

### **Apoptosis o muerte celular programada**

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada, controlado y fisiológico, mediante el cual una célula se autodestruye, sin generar inflamación, cuando ya no es necesaria o está dañada [56]. Desempeña un papel central en la homeostasis normal de células y tejidos, teniendo además un rol central en algunas patologías [78], [79], [80].

Las mitocondrias también juegan un rol central en este proceso y participan en lo que se conoce como la vía intrínseca de la apoptosis [56]. Actúan principalmente como centros de señalización y liberación de proteínas que desencadenan la cascada apoptótica [81], [82]. Múltiples ensayos se han implementado para tratar de identificar apoptosis, buscando evidenciar aspectos característicos del proceso [82]. La microscopía electrónica es considerada la técnica de elección para confirmar la apoptosis y en particular para identificar las modificaciones citomorfológicas que ésta conlleva [82], [83]. La categorización de una célula somática como apoptótica es irrefutable si la célula contiene ciertas características morfológicas ultraestructurales como: (1) núcleo electrón-denso (marginalización de la cromatina en la fase temprana); (2) fragmentación nuclear; (3) membrana celular intacta incluso en la fase tardía de desintegración celular; (4) orgánulos citoplasmáticos desorganizados; (5) grandes vacuolas claras; y (6) vesiculaciones en la superficie celular, posterior pérdida de las adhesiones con células vecinas, y finalmente fragmentación en cuerpos apoptóticos con membranas celulares intactas, orgánulos citoplasmáticos, con o sin fragmentos nucleares [83], características más difíciles de constatar en el espermatozoide. La fragmentación del ADN, alteración estructural distintiva de este proceso, puede evidenciarse también mediante microscopía electrónica, técnica de TUNEL o electroforesis en gel de

agarosa [82]. Por otro lado, las primeras alteraciones durante la apoptosis incluyen la pérdida de asimetría de la bicapa lipídica, que lleva a la exposición externa de fosfatidilserina [81]. Esto puede detectarse mediante marcaje con anexina V, que se une específicamente a la fosfatidilserina [82], otro evento señalizador de apoptosis.

La mitocondria, si bien participa en los procesos que determinan la apoptosis, también sufre cambios bioquímicos y morfológicos que acompañan el propio proceso apoptótico [81], [84]. Se producen cambios en el potencial de membrana y también cambios en la morfología mitocondrial [84]. Se describen cambios ultraestructurales, en la organización y disposición de las crestas mitocondriales, con un aumento en la conectividad intra-crestal y la formación de una red de crestas más densamente interconectadas [84], así como cambios en la organización y disposición de la red mitocondrial dentro de la célula en vías de apoptosis. Esto es caracterizado por la transición de una red mitocondrial, con mitocondrias alargadas y tubulares, hacia mitocondrias vesiculares y puntiformes, lo que se observa ya desde etapas muy tempranas de la cascada de muerte celular [81], [84], [85]. Esto sugiere la participación de la maquinaria de fisión mitocondrial, lo que determinaría la fragmentación de las mismas como parte de los fenómenos que caracterizan a la apoptosis de las células en general [81], [84], discutido o con escasa probabilidad de suceder en el espermatozoide.

### **Dinámica mitocondrial**

Las mitocondrias tienen la capacidad de modificar su forma y características estructurales. La estructura mitocondrial se adapta en cada célula y en cada tejido para optimizar la función mitocondrial y satisfacer demandas celulares específicas [86]. Las mitocondrias individuales pueden variar enormemente su morfología, apareciendo como pequeñas esferas, túbulos cortos o largos, o túbulos interconectados. Dicha morfología está controlada por los procesos de fusión y fisión, responsables de la alternancia en la morfología mitocondrial [87]. Por lo tanto, las mitocondrias de las células somáticas, experimentan continuamente cambios en su número y en su forma mediante los eventos de fusión y fisión [87], [88]. La expresión “dinámica mitocondrial” describe colectivamente la capacidad de las mitocondrias para: (1) ser transportadas a lo largo del citoesqueleto, (2) interactuar con otras estructuras subcelulares, y (3) moldear su membrana interna y externa mediante dichos eventos [89]. La fusión representa el proceso de unir dos o más mitocondrias para generar un organelo más grande, incluso mitocondrias gigantes o “megamitocondrias” características de algunos procesos celulares vinculados con estrés [52]. La fisión es el proceso de constricción y

fragmentación de una mitocondria para generar orgánulos más pequeños [57], [89]. Esta “dinámica mitocondrial” ayuda a mantener el conjunto de mitocondrias dentro de una célula y una actividad óptima de sus funciones, al permitir un transporte y distribución eficientes del “capital mitocondrial”. La dinámica mitocondrial está relacionada con varios procesos celulares, incluyendo el ciclo celular, la apoptosis, la migración celular, la mitofagia y la producción de especies reactivas del oxígeno. Por lo tanto, un equilibrio preciso entre la fusión y la fisión mitocondrial es crucial para la supervivencia celular y el funcionamiento óptimo [52], [86], [89]. Los defectos en la dinámica mitocondrial están relacionados con muchas condiciones patológicas, incluyendo el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades cardiovasculares [58], [87], [88].

Se han descrito numerosos genes y proteínas específicas vinculadas a los procesos de fisión - fusión en células somáticas [57], [88]. Los principales y mejor estudiados mediadores proteicos de la dinámica mitocondrial son miembros de la gran familia de Dinaminas-GTPasas: mitofusinas (MFN) 1 y 2, atrofina óptica 1 (OPA1) y proteína relacionada a la dinamina 1 (DRP1), las primeras se localizan en las membranas mitocondrial externa e interna respectivamente, mientras que DRP1 se localiza mayoritariamente a nivel citosólico hasta ser reclutada para unirse a receptores específicos de la MME [88], [90].

Las crestas mitocondriales también poseen naturaleza dinámica [52], [86], [89]. Esta dinámica permite responder a las distintas demandas metabólicas y bioenergéticas celulares, mediante el control de la formación y estabilidad de los complejos respiratorios y los oligómeros de ATP sintasa de la cadena respiratoria. La disposición de las crestas varía, en forma reversible, entre estados en los cuales las crestas se disponen en forma más compacta hacia estados en donde el espacio entre las crestas aumenta notablemente [52], [86], [89]. La dinámica descrita tanto en la morfología mitocondrial como en la ultraestructura de las crestas se hace evidente al comparar distintos órganos y tejidos cuyas células deben adaptarse a distintos requerimientos metabólicos y energéticos, organización estructural y funciones específicas, tal como es el caso de las neuronas del tejido nervioso, los hepatocitos del hígado, las células epiteliales secretoras de hormonas esteroideas o las células musculares esqueléticas o cardíacas [52], [86].

También se produce reordenamiento o modelado de las crestas mitocondriales durante la apoptosis. Esta induce un ensanchamiento de las crestas para maximizar la liberación del citocromo C, confinado en el espacio entre las mismas al tiempo que provoca alteraciones bioenergéticas debidas a la desestabilización de los complejos respiratorios y de la ATP sintasa mitocondrial [89].

Otros componentes celulares pueden influir también en la estructura mitocondrial. Esto se logra a través de la generación de sitios de contacto entre distintos organelos y las propias mitocondrias, modulando así las propiedades bioquímicas, la capacidad funcional y la dinámica mitocondrial [52]. El uso de técnicas de microscopía y análisis de imagen celular permitieron reconocer “interactomas” de orgánulos, en los cuales las mitocondrias forman sitios de contacto dinámicos y funcionales con múltiples orgánulos, incluidos el retículo endoplásmico, las gotas lipídicas, la membrana plasmática, los microtúbulos, los lisosomas y los endosomas [52], [86]. Además de la interacción de las mitocondrias con los microtúbulos, se describe la interacción de las mismas con otros componentes del citoesqueleto como los filamentos de actina, los cuales estarían vinculados también a los procesos de dinámica mitocondrial [52], [88].

### **Rol de la mitocondria en el espermatozoide**

Como ya se mencionó, los espermatozoides son células terminales y extremadamente especializadas para cumplir su función de fertilización. Son células móviles, que deberán sobrevivir en el aparato reproductor femenino, todo lo cual hace que posean una estructura altamente diferenciada con una organización mitocondrial sumamente particular, lo que sugiere que las mitocondrias son esenciales para la funcionalidad de los mismos [91]. Sin embargo éstas se diferencian, morfológica, bioquímica y funcionalmente, en algunos de los aspectos descritos para las mitocondrias de las células somáticas [92].

En el espermatozoide, las mitocondrias desarrollan funciones vinculadas a la producción de ATP, la homeostasis del calcio, la generación de ROS y la apoptosis [93], [94]. Un potencial de membrana mitocondrial normal, junto con un rendimiento mitocondrial óptimo, es esencial para la motilidad espermática, la capacitación, la reacción acrosómica, la hiperactivación y la integridad del ADN espermático [92], [93], [94]. En el espermatozoide, la vaina mitocondrial produce, a través de la fosforilación oxidativa, el ATP necesario para sus funciones. Dicho ATP producido a nivel de la pieza media del espermatozoide, es transportado luego al axonema de la pieza principal, lo que genera la fuerza motriz del flagelo [91]. Por lo tanto, las longitudes de la pieza media y principal del espermatozoide pueden ser fundamentales para determinar la velocidad de nado del mismo y la tasa de fertilización [4], [95]. Además de la producción de ATP necesaria para la motilidad espermática, las mitocondrias del espermatozoide llevan a cabo otras funciones celulares críticas vinculadas al desarrollo de las células germinales y la fertilización [92]. Si bien los mecanismos precisos, y

específicamente, el papel de las mitocondrias en la capacitación espermática sigue sin estar completamente dilucidado, nuestro grupo de trabajo reveló en trabajos previos, llevados a cabo en espermatozoides de ratón, que la actividad mitocondrial, en particular: el consumo de oxígeno, el potencial de membrana, el intercambio de ATP/ADP y el Ca<sup>2+</sup> mitocondrial aumentan durante la capacitación [96].

Los espermatozoides también producen, al igual que las células somáticas, especies reactivas del oxígeno durante la respiración celular a nivel de la membrana mitocondrial interna [97], [98]. Dichos gametos son especialmente vulnerables a las ROS dado que contienen en su membrana plasmática altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados [99], [100], [101]. Además, su pequeño espacio citoplasmático y la ausencia de maquinaria de síntesis proteica, limita la posibilidad de contener enzimas antioxidantes [102], [103]. Esta vulnerabilidad es exacerbada por la tendencia inherente de espermatozoides defectuosos, presentes en el eyaculado, a producir cantidades anormales de ROS, [104] [105]. Si bien, en bajas concentraciones, las ROS modularían mecanismos fisiológicos, tales como la capacitación e hiperactivación del espermatozoide [64], [106] en concentraciones elevadas podrían reducir su potencial fecundante tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” y vincularse a fenómenos de infertilidad en el varón [107], [108], [109].

La apoptosis, donde la mitocondria en células somáticas juega un rol central, es cuestionada en el espermatozoide y se considera que esta célula sufre una forma “trunca” de la misma [110], [111]. El estrés oxidativo, la excesiva producción de ROS mencionada anteriormente, y la peroxidación lipídica, desencadenarían la cascada apoptótica, activando la generación mitocondrial de más especies reactivas del oxígeno, en un ciclo redox auto-perpetuante. Los aldehídos electrofílicos generados como resultado de la peroxidación lipídica también conducen a una rápida pérdida de la motilidad espermática, seguida por la activación de caspasas y la exposición de fosfatidilserina en la superficie del espermatozoide [110], [112]. Si bien el ADN nuclear sufre daño oxidativo durante este proceso, no se produciría una fragmentación inmediata del ADN por endonucleasas y la traducción morfológica de dicha fragmentación es controvertida [110], [113], [114]. La morfología y estructura particular de los espermatozoides, ausencia de ribosomas y escaso ARNm, al igual que una limitada capacidad enzimática para la reparación del ADN, determinarían esta desviación del patrón habitual de apoptosis [110], [111]. Si bien se han realizado numerosos estudios en pos de describir las manifestaciones morfológicas de la apoptosis en el espermatozoide, incluso a través de la inducción de la misma, no se han encontrado características estructurales patognomónicas de la misma. Estudios meramente descriptivos, mediante microscopía electrónica, analizan

algunas de las alteraciones ultraestructurales que caracterizarían a los espermatozoides, y a sus mitocondrias en particular, durante dicho proceso [111], [115], [116], [117], [118], sin demasiada sistematización.

Por último, estructuralmente, las mitocondrias espermáticas también difieren notoriamente de las mitocondrias somáticas, disponiéndose en forma altamente organizada y compacta en torno al axonema de la cola del espermatozoide. Las mitocondrias de la pieza media espermática se unen a estructuras vecinas (fibras densas y el axonema) por medio de una red de filamentos que aseguran su organización [8], [119]. La superficie de la MME está cubierta por una estructura queratínica formada por enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína de las selenoproteínas y, en particular, de la fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPx) mitocondrial [120], [121], todo lo cual haría a las mitocondrias espermáticas muy poco pasibles de cierta dinámica. Si bien es poco probable que en las mitocondrias del espermatozoide se produzcan fenómenos de fusión y fisión debido a la organización y alta compactación mencionada, en realidad los posibles cambios de la forma mitocondrial espermática han sido poco explorados.

### **3. - Infertilidad**

#### **Infertilidad masculina**

El estudio del espermatozoide, su morfología y función, es la base para tratar de comprender la etiopatogenia de la infertilidad en el varón, objetivo que motiva a nuestro grupo de trabajo desde hace varios años.

La infertilidad masculina se define como la incapacidad o dificultad del varón, para lograr el embarazo en su pareja, cuando lo intenta por un período de doce meses, con una frecuencia coital de al menos dos veces semanales [122], [123]. Dado que la infertilidad es un problema de pareja, donde influyen tanto el factor masculino como el femenino, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad conyugal, como la dificultad para lograr el embarazo cuando se lo busca por dicho período de tiempo y con esa misma frecuencia coital, sin éxito [122], [124]. La infertilidad, o la incapacidad de concebir un hijo, es una condición que afecta a millones de individuos cada año y tiene un profundo impacto en la autoestima, las relaciones personales, el sentido de valor y el sentido de propósito de una persona, sin mencionar la salud y la economía [125], [126]. Durante las últimas décadas, la infertilidad ha sido objeto de una importante atención mediática y de debate público, especialmente a la luz de los nuevos avances tecnológicos en el tratamiento. Los problemas relacionados con la

infertilidad tienen un impacto significativo no solo en la salud y el bienestar del individuo o la pareja afectada, sino en la sociedad en su conjunto, motivo por el cual se la considera como un problema de salud pública [125].

La prevalencia de la infertilidad ha sido calculada entre un 10 y un 15% de las parejas en edad reproductiva, o sea aproximadamente una de cada seis parejas. Se estima que este porcentaje irá en aumento con el pasar de los años, a medida que las parejas decidan tener hijos cada vez a mayor edad, como consecuencia directa del aumento en la expectativa de vida y la postergación de la maternidad frente a otras prioridades. Sumado a esto, diversos estudios muestran una disminución significativa en la calidad espermática durante los últimos 10 años [127], hallazgo que se correlaciona con un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo, donde se refiere una disminución de la calidad del semen en nuestro país, durante los últimos 30 años [128]. La prevalencia de la infertilidad se vería afectada también por cambios en el estilo de vida, incidencia de factores ambientales, así como por la incidencia de nuevos factores que atenten contra la fertilidad humana.

Al evaluar los posibles orígenes de la infertilidad conyugal, se estima que un 30% de las causas corresponden al factor masculino por sí solo, mientras que en un 20% adicional, los factores masculinos se combinan con causas de origen femenino. Teniendo en cuenta estos datos, la importancia del factor masculino en la infertilidad conyugal asciende a 50% o más [129].

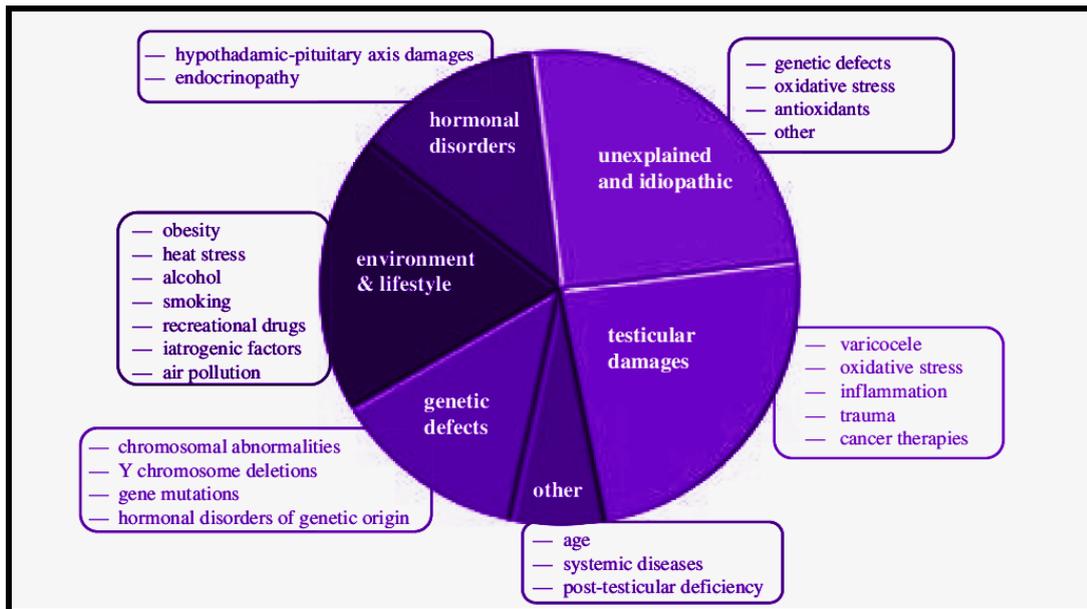
En Uruguay, si bien las cifras de prevalencia de esta patología, rondan las descritas para la población general, se suman como problemas adicionales una muy baja tasa de natalidad y una demografía prácticamente inamovible desde hace varias décadas en el país. Esto ha llevado en los últimos años a la generación de políticas de estado con respecto a la infertilidad que tratan de afrontar dicho problema de salud pública. A través de estas políticas y en particular de la Ley N° 19.167 de Reproducción Humana Asistida aprobada en el año 2013, el Fondo Nacional de Recursos (FNR) financia tratamientos de terapia de reproducción asistida (TRA) de baja y alta complejidad. A esto se suma una nueva norma, aprobada recientemente en el año 2022, que permite, a pacientes oncológicos, acceder a métodos de conservación de la fertilidad. Todas estas políticas no solo otorgan a esta patología la importancia que merece, sino que homogeneizan la accesibilidad a los distintos servicios de salud (públicos y privados) y contemplan a todas las parejas infértiles, aún a aquellas parejas de bajos recursos, que de otra manera quedarían excluidas, dado el alto costo de estas terapias. Si bien, en los últimos años, el FNR ha dado respuesta a numerosas parejas, menos de la mitad de las mismas han alcanzado la paternidad. Esto sugiere que a pesar del éxito de

estas técnicas, en más de la mitad de las parejas infértiles dichas TRA poseen una baja efectividad y por tanto una baja relación costo/beneficio [130], [131]. Probablemente esto se deba a que la eficacia de algunos de los tratamientos implementados no parece correlacionarse o estar influenciada por la causa de la infertilidad [131]. Si bien las terapias de reproducción asistida son capaces de paliar el problema, no aportan una solución al trastorno de fondo, ni permiten aclarar los mecanismos fisiopatológicos en juego. De esto se desprende la importancia de esclarecer los mecanismos que determinan la infertilidad y en particular el estudio de los gametos y los mecanismos de interacción entre ambos. Una mejor comprensión de la morfología y función del espermatozoide, es de fundamental importancia para esclarecer las bases de la infertilidad y para desarrollar estrategias terapéuticas acertadas, adaptadas a cada paciente y a cada pareja en particular, e incapaces de transmitir a la progenie el factor determinante de la misma.

### **Estudio del hombre infértil**

Como toda enfermedad compleja, las causas de infertilidad en el hombre son heterogéneas y difíciles de dilucidar [126], [129], [132]. Independientemente de la causa, en los hombres infértiles existe en general, alteración en la calidad, cantidad y/o función de los espermatozoides en el eyaculado, lo cual conduce a una disminución de su capacidad fecundante [132]. Varias afecciones en el hombre pueden producir alteraciones en la calidad y cantidad de los espermatozoides provocando infertilidad. Se describen causas espermáticas (congénitas o adquiridas) y causas no espermáticas. Por otro lado, los determinantes de la infertilidad en el varón pueden ser genéticos o no, siendo éstos últimos los de mayor incidencia [128], [130],[131]. En el esquema de la Figura 2 se observa la distribución de los diferentes desórdenes que pueden determinar la infertilidad en el varón [133].

En un alto porcentaje de los casos no se encuentra una causa que explique la infertilidad, por lo cual se la considera indeterminada. Se incluyen dos categorías en la infertilidad masculina indeterminada, o de causas desconocidas: (i) infertilidad masculina idiopática: varones infértiles con análisis de semen anormales que no presentan una causa conocida para estas anomalías, y (ii) infertilidad masculina inexplicada: varones con análisis de semen “normales” que no logran fecundar debido a causas desconocidas [131], [133]. En el 23% de los casos, la infertilidad masculina es idiopática [131].



**Figura 2.** Distribución de diferentes desórdenes masculinos como causantes de infertilidad en el varón. Extraído y adaptado de Tamaiuolo y col. 2022 [133].

Esto se traduce en que prácticamente una cuarta parte de los hombres infértiles poseen una causa desconocida que explique las alteraciones en sus análisis de semen y por ende la infertilidad. Esto hace prioritario implementar nuevas estrategias diagnósticas y de investigación que nos ayuden a dilucidar el porqué de la infertilidad con vistas no solo a comprender la etiopatogenia de la misma, sino para poder orientar a estas parejas, que habitualmente son las que no logran concebir, a pesar de incurrir a complejos y costosos procedimientos de reproducción asistida.

La valoración del hombre infértil incluye una historia clínica y examen físico detallado, conjuntamente con el análisis del semen, agregándose en algunos casos, la evaluación hormonal y cariotípica del paciente [126], [134].

A pesar de sus múltiples y reconocidas limitaciones el espermograma sigue siendo el principal método diagnóstico para el hombre infértil. Dicho estudio, si bien correctamente analizado e interpretado, aporta información inicial útil, carece de alta confiabilidad clínica, producto de su alta variabilidad técnica y de la gran variabilidad biológica del semen. Por otro lado, el espermograma, por sí solo y salvo excepciones, no es diagnóstico de fertilidad ni de infertilidad y sus resultados deberían ser interpretados en términos de probabilidad, en conjunto con la historia clínica, datos de la pareja y demás exámenes pertinentes [135], [136], [137], [138].

El espermiograma comprende el análisis físico-químico del semen donde se evalúan las características macroscópicas del eyaculado (volumen, pH, viscosidad, color, olor) y el estudio cito-morfo-dinámico que incluye la valoración de la concentración, motilidad, vitalidad y morfología de los espermatozoides, así como la presencia de otras células en el eyaculado. Los resultados del espermiograma son evaluados en función de valores de referencia estandarizados por la Organización Mundial de la Salud [122], [123] los cuales se muestran en la tabla adjunta.

<b>Variables Espermáticas</b>	<b>Cut-off 2010</b>	<b>Cut-off 2021</b>
Volumen Seminal (ml)	≥ 1,5	≥ 1,4
pH	7,2 - 8,2	6,0 - 10,0
Concentración Espermática (mill/ml)	≥ 15	≥ 15
Motilidad Espermática Progresiva (a+b) (%)	≥ 32	≥ 30
Morfología Espermática (%)	≥ 4	≥ 4
Vitalidad Espermática (%)	≥ 58	≥ 54
Células Redondas (mill/ml)	<1	<1

**Tabla 1.** Valores de referencia para los principales parámetros seminales del espermiograma según la OMS. Se tabula el límite del intervalo de referencia según criterios establecidos por la OMS 2010 y 2021 para la fertilidad natural. Nivel de confianza 95% [122], [139].

En función a dichos puntos de corte: el recuento de espermatozoides por debajo de valores de referencia se denomina *oligozoospermia* y la ausencia de espermatozoides en el eyaculado consiste en una *azoospermia*, la disminución de la motilidad se denomina *astenozoospermia*, mientras que una disminución en los valores normales de la morfología espermática recibe el nombre de *teratozoospermia*. Cada una de las alteraciones mencionadas pueden aparecer como un hallazgo aislado en el espermiograma o acompañarse de las otras alteraciones, en varias combinaciones posibles. Nos referimos a una *oligo-asteno-teratozoospermia* cuando los tres parámetros espermáticos se encuentran alterados [122].

El espermiograma no nos brinda información sobre la capacidad del espermatozoide para concebir un hijo sano, y lejos de ser un examen predictivo absoluto solo consiste en una valoración indirecta de la fertilidad, proporcionando indicios diagnósticos y poca información funcional [131]. Si bien se examinan algunas características esenciales del espermatozoide (recuento, motilidad y morfología), no se analizan en forma sistemática componentes intracelulares del mismo, como el ADN, los centriolos o las mitocondrias, etc. Por lo tanto, muchos varones infértiles pueden pasar desapercibidos si sus análisis de semen son “normales” y se les diagnostica con infertilidad inexplicada. O incluso aún poniendo de

manifiesto alteraciones en los parámetros espermáticos poco ahonda en las causas de la infertilidad, quedando al descubierto los pacientes con infertilidad idiopática [131], [133]. Si bien la OMS plantea la realización de pruebas funcionales complementarias, no siempre son suficientes y debieran implementarse nuevos abordajes para un diagnóstico más asertivo, adecuado a cada paciente y capaz de brindar datos que ahonden en el análisis del factor masculino. Se plantean nuevos blancos diagnósticos como el análisis del ADN y del ARN espermático, el estudio de los centriolos, la habilidad de unión del espermatozoide a estructuras específicas como el ácido hialurónico, el análisis de receptores espermáticos, el estudio de mecanismos apoptóticos en el espermatozoide y la dosificación de la producción de ROS [131]. En este mismo sentido cobran importancia los estudios morfológicos, el análisis morfométrico de estructuras espermáticas y el análisis ultraestructural de componentes subcelulares como las mitocondrias.

### **Rol de la mitocondria en la infertilidad masculina**

Si bien las mitocondrias intervienen en varias funciones del espermatozoide, el papel preciso de las mismas aún debe ser completamente explorado. Una actividad mitocondrial óptima es crucial para la función espermática y la calidad del semen [140]. Defectos en la función mitocondrial deterioran el mantenimiento de la producción de energía necesaria para la motilidad del espermatozoide y pueden ser causa de astenozoospermia [140]. Trabajos previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado, estudiando la función mitocondrial a través de espirometría de alta resolución, en espermatozoides humanos, una correlación positiva entre la función mitocondrial y la motilidad espermática progresiva [141].

Por otro lado, la disfunción de las mitocondrias espermáticas determina un aumento en la producción de ROS, estrés oxidativo y disminución en la producción de energía, todo lo cual conduce a daño en el ADN espermático, alteraciones en la motilidad y parámetros seminales comprometidos, con una reducción de la fertilidad masculina [94]. Distintos trabajos plantean que, si bien una producción controlada de ROS, y en particular de  $H_2O_2$ , por la mitocondria durante la capacitación espermática, serían necesarios para que la misma ocurra con normalidad y desencade una fecundación exitosa [142], [143], su producción en exceso sería nociva en cuanto a la calidad espermática, aparición de espermatozoides defectuosos en el eyaculado y al potencial fecundante de los mismos [91], [107], [108].

Por último, si bien el ADN mitocondrial paterno no se transmite a la progenie [91], el ADN de las mitocondrias espermáticas es susceptible al daño oxidativo y a mutaciones que podrían

comprometer la función del esperma, conduciendo a infertilidad. Los varones con parámetros seminales anormales presentan un mayor número de copias de ADNmt y una integridad reducida del ADNmt [140], [144]. Se han reportado mutaciones puntuales, deleciones y mutaciones sin sentido en el ADNmt vinculadas con infertilidad masculina [94].

### **Morfología espermática y rol de la morfología mitocondrial en la infertilidad masculina**

Los parámetros seminales estándar son útiles para la evaluación del eyaculado y de la salud reproductiva del varón [122], [123], [145]. Aunque actualmente existe controversia, la morfología espermática es un buen indicador de la fertilidad masculina. Muchos autores afirman que la morfología espermática refleja la competencia funcional de los espermatozoides [146], [147]. Según criterios estrictos, la morfología espermática es el parámetro que mejor se correlaciona con la capacidad fecundante del espermatozoide "*in vitro*" [148], [149]. Con respecto a la morfología ultraestructural del gameto masculino, la funcionalidad espermática parece estar directamente relacionada con la integridad de la morfología del gameto [136], [150]. Aunque se han hecho intentos por vincular alteraciones en componentes subcelulares como la cabeza del espermatozoide [151], [152], [153], [154], el acrosoma [152], [155] y el citoesqueleto flagelar [13], [156], [157], [158] con la infertilidad, los resultados obtenidos no fueron convincentes. En trabajos anteriores de nuestro grupo, comparando pacientes infértiles con controles sanos, observamos una mayor prevalencia en los hombres infértiles, de groseras alteraciones de la cabeza, (en particular en la disposición de la cromatina), y del cuello y grandes desorganizaciones del axonema [159], [160], [161]. Si bien muchos fenotipos ultraestructurales han sido asociados con fallas en la función espermática y con infertilidad, las anomalías ultraestructurales de las mitocondrias espermáticas han recibido relativamente poca atención [162].

Como ya mencionamos, en condiciones normales las mitocondrias se enrollan en forma compacta en torno al axonema, unidas fuertemente entre sí. Sin embargo, alteraciones en esta disposición precisa de las mismas, podrían conducir a cambios en la motilidad espermática en pacientes con astenozoospermia [92], [163], [164]. De manera similar, la organización, el volumen y los cambios en la ultraestructura de la membrana mitocondrial también han sido reportados como determinantes del movimiento y del batido flagelar, y por lo tanto asociados con astenozoospermia e infertilidad [165] [166], [167], especialmente en casos que involucran modificaciones a nivel de la pieza media espermática de probable origen genético [168],

[169], [170]. Se postula que la longitud del flagelo del espermatozoide, especialmente la longitud de la pieza media, es un factor crítico que influye en el metabolismo y la velocidad del espermatozoide. En éste sentido, se ha descrito recientemente que la velocidad del espermatozoide está correlacionada con el número de mitocondrias y la producción de ATP por éstas [171], lo que nuevamente llevaría a pensar que fallas o modificaciones a dicho nivel, también se traducirían en astenozoospermia e infertilidad.

Por último, si bien las mitocondrias son pasibles de sufrir cambios morfológicos asociados a fenómenos de fusión y fisión y a apoptosis [172], en las mitocondrias espermáticas es poco probable que se produzcan estas modificaciones debido a la alta compactación de las mismas. Además se desconoce la posibilidad de que estos cambios a nivel mitocondrial estén vinculados con procesos de infertilidad. En concreto, existen muchas dudas sobre la etiopatogenia de la infertilidad masculina y los posibles cambios de la forma mitocondrial espermática relacionados a la misma, no han sido aún explorados en profundidad.

De todo esto se desprende, como una táctica más en el estudio de hombre infértil, teniendo en cuenta la importancia de la morfología espermática y el posible rol de la mitocondria en la fisiopatología de la infertilidad, la necesidad de implementar nuevas estrategias que ayuden a abordar la relación entre la estructura y dinámica mitocondrial, con la función mitocondrial en el espermatozoide y en particular en el hombre infértil.

## **4. - Procesamiento de Imágenes**

### **Análisis morfométrico mitocondrial**

El análisis morfológico-estructural basado en técnicas de microscopía, se ha convertido en un componente fundamental para el desarrollo de la investigación dentro del área biomédica [173], [174] [175]. El análisis morfoestructural mediante técnicas de microscopía y procesamiento digital de imágenes es fundamental para el estudio detallado de estructuras celulares complejas, cuya funcionalidad depende estrechamente de su arquitectura subcelular, como es el caso del espermatozoide. La combinación de microscopía óptica o electrónica con herramientas de análisis computacional permite una cuantificación objetiva y reproducible de parámetros estructurales que tradicionalmente eran evaluados de forma subjetiva [176]. Con el procesamiento óptico digital de imágenes de microscopía es posible desarrollar distintos algoritmos capaces de leer e interpretar diferentes características morfológicas y funcionales, así como realizar mediciones y reconstrucciones tridimensionales de las estructuras estudiadas utilizando lenguajes de programación. Este enfoque es especialmente útil en el

contexto de la biología reproductiva, y en particular del espermatozoide, donde alteraciones sutiles en la organización de organelos como las mitocondrias o el axonema pueden impactar, como ya mencionamos, en la fertilidad del varón. El advenimiento de plataformas integradas así como de nuevos softwares de procesamiento de imágenes [177], [178], [179], [180] han facilitado el acceso a estos análisis incluso para usuarios sin experiencia en programación, lo que ha contribuido a la estandarización y democratización del análisis de imágenes biológicas [181]. Así mismo, esto también ha contribuido a promover la interacción de profesionales de distintas áreas, (científicos y biólogos con ingenieros y personal experto en programación y análisis de datos), potenciando el trabajo y la formación en equipo, así como la generación de grupos interdisciplinarios abocados a la resolución en conjunto de problemas médicos o biológicos en común. El análisis morfológico del espermatozoide, centrado en el análisis morfométrico y morfodinámico de la mitocondria, a través de un encare multidisciplinario, constituyen una herramienta de gran valor como un paso más en el esclarecimiento de la etiopatogenia de la infertilidad masculina. Si bien existen publicaciones donde se analizan los cambios morfo-funcionales de la mitocondria tratando de dar respuesta a la fisiopatología de algunas enfermedades en otros tipos celulares [173], [182], [183], [184], [185], [186], [187], [188], [189], [190], [191], [192], [193] no existen trabajos en los cuales a través de éste tipo de enfoque se estudie el espermatozoide y las mitocondrias espermáticas en particular.

Por último, y retomando lo mencionado anteriormente: por un lado, el diagnóstico del hombre infértil se centra principalmente en el análisis de los parámetros estándar del semen, que rara vez determinan causas o tratamientos a seguir, por otro lado, un alto porcentaje de los casos de infertilidad en el varón son considerados idiopáticos, por no encontrarse una causa que explique la infertilidad. Esto lleva a la necesidad de inclusión en el análisis rutinario del semen de pruebas de laboratorio avanzadas que puedan ayudar en el diagnóstico preciso de la infertilidad masculina. En base a esto, y a lo ya descrito en relación al rol de la mitocondria en el espermatozoide y a las consecuencias de su disfunción, nuestro grupo de trabajo publicó recientemente, algunos índices y valores de corte de parámetros de función mitocondrial y producción de  $H_2O_2$  que reflejan los valores de referencia de los parámetros seminales establecidos por la OMS [194]. En este mismo sentido, y dada la correlación entre los parámetros del semen tanto con la función como con la morfología mitocondrial [140], [141], [163], [167], [195], [196], [197], la puesta a punto de las herramientas de procesamiento de imagen y la obtención de datos morfométricos podrían también contribuir a la generación de nuevos índices con potencialidad diagnóstica. El uso de los mismos, podría implementarse en un futuro en la clínica andrológica, como otra forma de complementar la evaluación

rutinaria del semen, representando una estrategia prometedora en el estudio del hombre infértil.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

La morfología mitocondrial espermática se modifica en espermatozoides maduros. La implementación de técnicas de procesamiento de imágenes, que nos permitan estudiar dichos cambios morfométricos, contribuirá a detectar modificaciones morfológicas mitocondriales durante la capacitación, y a dilucidar la etiopatogenia de la infertilidad.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

El espermatozoide es una célula especializada, implicada en procesos tanto fisiológicos como patológicos vinculados a la fecundación y por ende a la fertilidad en el varón. Un organelo posiblemente implicado tanto en los procesos fisiológicos como en la patogenia de la infertilidad y formación de espermatozoides defectuosos es la mitocondria. Planteamos la existencia de cambios morfológicos, que se producen en dicho organelo durante estos procesos, que pueden acompañar cambios funcionales y bioquímicos aún no dilucidados completamente. Las técnicas de obtención y procesamiento de imágenes, poco aplicadas para el estudio del espermatozoide, podrían ayudar a dilucidar la morfo-función mitocondrial, así como la etiopatogenia de la infertilidad y contribuir al diagnóstico de la misma en el hombre infértil.

Pretendemos demostrar que la función mitocondrial en los espermatozoides se refleja en cambios morfológicos de la pieza media y en particular de las mitocondrias durante la capacitación. También consideramos que estos cambios pueden ser indicadores de alteraciones de los espermatozoides en pacientes infértiles.

### Objetivos específicos

- 1) **Generar herramientas informáticas capaces de reconocer, medir y cuantificar cambios morfométricos a nivel de la pieza media espermática (PME) y de la propia mitocondria.**

Si bien existen numerosos recursos informáticos que permiten el análisis y procesamiento de imágenes de microscopía, ninguno de estos se aplica directamente al estudio del espermatozoide. Fue necesario generar un procedimiento personalizado basado en las herramientas básicas proporcionadas por plataformas de software libre. Esto fue especialmente importante en el caso de la pieza media del espermatozoide,

donde las características de la organización mitocondrial obligan a la creación de algoritmos específicos para analizar estas estructuras.

**2) Analizar cambios morfométricos de las mitocondrias espermáticas durante la capacitación.**

Como se indicó, la capacitación es necesaria para que el espermatozoide adquiera su capacidad fecundante y representa un proceso regulado por componentes del medio presente en el tracto genital femenino. Se utilizaron espermatozoides de ratón para vincular los cambios funcionales con la morfología de las mitocondrias espermáticas y de la pieza media.

**3) Estudiar cambios morfométricos de las mitocondrias espermáticas en hombres fértiles e infértiles y su asociación con la funcionalidad mitocondrial.**

A través de este objetivo proponemos generar herramientas que contribuyan al análisis de la estructura del espermatozoide humano en casos de infertilidad masculina.

## **ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

Para alcanzar nuestros objetivos se implementaron las herramientas morfométricas existentes en la plataforma Fiji y se adaptaron al análisis de la pieza media y de las mitocondrias del espermatozoide generándose scripts específicos. Estos se utilizaron para cuantificar en forma automatizada, la morfometría mitocondrial de espermatozoides de ratón capacitados y no capacitados. Se utilizaron análisis morfométricos para imágenes de microscopía de contraste de fase, de fluorescencia y de microscopía electrónica. Paralelamente se reclutaron hombres fértiles e infértiles y se analizaron los espermatozoides de muestras de semen normales y con alteraciones en el espermiograma. Se analizaron las características morfológicas de la pieza media espermática y de las mitocondrias allí presentes, a través del uso de las herramientas computacionales mencionadas previamente. Finalmente se incubaron los espermatozoides de dichas muestras con drogas mitocondriales y se realizó un análisis morfométrico comparando la pieza media antes y después del tratamiento.

### Objetivo 1

**Generar herramientas informáticas capaces de reconocer, medir y cuantificar cambios morfométricos a nivel de la pieza media espermática (PME) y de la propia mitocondria.**

Dentro de este objetivo nos propusimos:

- Generar herramientas para analizar y medir la PME en espermatozoides de ratón marcados con sondas fluorescentes.
- Crear herramientas para estudiar y cuantificar la PME en espermatozoides humanos marcados con la misma sonda fluorescente.
- Generar herramientas para analizar y medir las mitocondrias presentes en la PME a través de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión en ambas especies.

### Estrategia del objetivo 1

Para cumplir con este objetivos nos asentamos en dos pilares:

- 1- la adquisición y manejo de software libre: para eso nos basamos en ImageJ/Fiji y Python.
- 2- el trabajo multidisciplinario: para lo cual nos integramos al Núcleo Interdisciplinario IMAGINA. A través de este núcleo interdisciplinario, que forma parte de la UdelaR, y a través de la labor conjunta con un grupo de Ingenieros y Docentes del Centro de Procesamiento de Imágenes de Facultad de Ingeniería, se procuró la creación de herramientas informáticas aplicadas al análisis morfológico mitocondrial en el espermatozoide, necesarias para analizar las imágenes y obtener los datos que se presentan a posteriori en los capítulos 2 y 3 de esta tesis.

### Software utilizado

Para la generación de las herramientas mencionadas nos basamos en Fiji, un potente paquete de procesamiento de imágenes, basado en ImageJ. Los plugins preinstalados que incluye el programa, facilitaron el análisis avanzado de las imágenes obtenidas. A partir del editor de scripts (scripting) con que cuenta el programa, y su soporte en lenguaje a través de Python, se

obtuvieron los scripts que se presentan más adelante, cuya ejecución permitió el procesamiento y obtención de los descriptores morfométricos en los cuales se centra la tesis. Los algoritmos obtenidos en el contexto del procesamiento de imágenes con Fiji y Python, permitieron a partir de la definición de parámetros de entrada/salida para los scripts generados, controlar y automatizar distintas operaciones en base a la información generada en cada imagen, haciendo posible el análisis de un gran número de éstas, en forma rápida, automatizada, y sin la intervención manual del observador, aunque supeditado a la validación del mismo.

### **Obtención de imágenes**

Para la generación de los scripts se obtuvieron imágenes de microscopía de fluorescencia que permitieron analizar la PME tanto en espermatozoides de ratón como en espermatozoides humanos e imágenes de microscopía electrónica para el análisis ultraestructural de las mitocondrias en ambas especies. Las imágenes obtenidas constituyeron el punto de partida para la generación de los scripts necesarios para el análisis morfométrico. Dadas las diferencias morfológicas y dimensionales entre los espermatozoides de ambas especies, los scripts debieron adaptarse en función a dichos criterios. Para objetivar el análisis morfométrico de las imágenes se sistematizaron los parámetros para la obtención de las mismas. Para la microscopía de fluorescencia, se seleccionaron los aumentos, filtros y láseres adecuados. En el caso de la microscopía electrónica, se ajustó la alineación del filamento, se realizó la corrección de aberraciones, astigmatismo y del background correspondiente. Se seleccionó y sistematizó la magnificación adecuada en función a los objetivos de cada experimento y a la estructura a ser analizada en cada imagen. Se estandarizaron los parámetros para la obtención de las imágenes digitales: iluminación, tiempo de exposición, gama, foco, encuadre, etc., en relación a la cámara fotográfica adaptada a cada microscopio. Se colocó y verificó la barra de calibración para cada imagen. Para las imágenes de microscopía electrónica se estableció el sentido del corte de la PME. Se incluyeron, en función a los objetivos, solo secciones lo más transversales y perpendiculares al axonema posible (descartándose cortes oblicuos), y secciones longitudinales a nivel del eje medio del axonema, paralelas al mismo. Se determinó y sistematizó el número de imágenes a obtenerse en cada experimento, con un número representativo de espermatozoides a ser analizado en cada condición. Se procuró alcanzar aproximadamente 100 imágenes en cada experimento y condición establecida. El número exacto de imágenes analizadas en cada condición así como

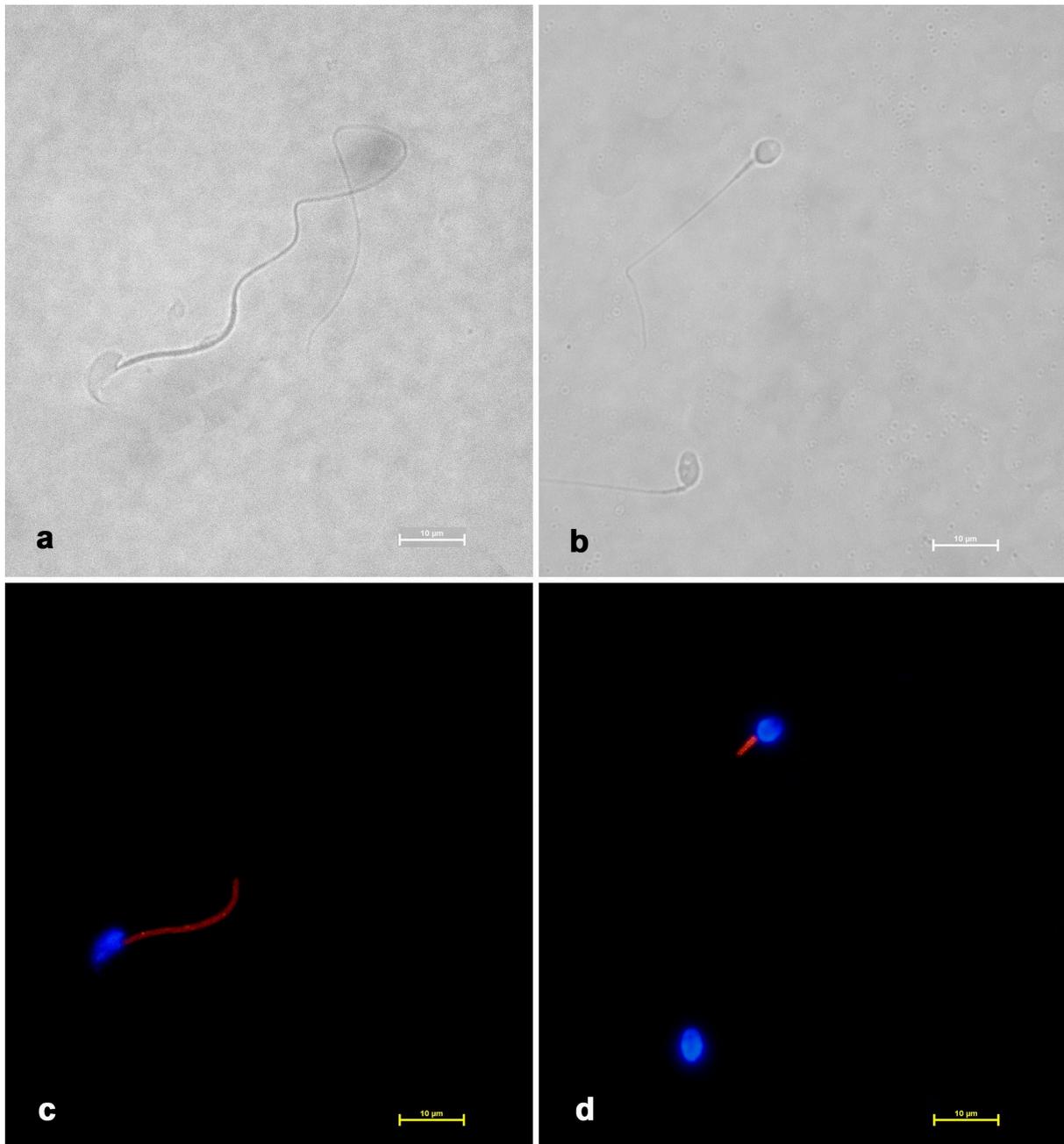
los detalles específicos en la obtención de las mismas se describen a posteriori en cada capítulo y sección correspondiente de la tesis.

### **Almacenamiento de las imágenes**

Las imágenes obtenidas se guardaron como imágenes “crudas”, en archivos TIFF (Tagged Image File Format) de modo de no perder información y preservar la alta calidad de las mismas. Dada la gran cantidad de información generada, vinculada al tamaño de estos archivos y al gran número de imágenes obtenidas fue necesario sistematizar también el almacenamiento de la información en dispositivos específicos, y la cuidadosa organización y nombrado tanto de las imágenes como de las carpetas que las contenían, para facilitar así el posterior análisis automatizado de las mismas.

### **Obtención de la herramienta de análisis y aplicación de la misma**

Nos propusimos analizar variaciones morfométricas de la pieza media espermática y de las mitocondrias en dos modelos diferentes, un modelo murino y un modelo en humanos. Teniendo en cuenta que los espermatozoides varían sus características morfológicas según la especie, debimos generar herramientas informáticas diferentes, capaces de analizar, por separado, los espermatozoides humanos y los espermatozoides de ratón. Si bien los espermatozoides de ambas especies poseen un flagelo donde las mitocondrias se localizan formando una vaina en la pieza media, dicha región es más grande y más homogénea en su morfología y dimensiones en los espermatozoides de ratón. Además, los espermatozoides de ratón son más grandes que los espermatozoides humanos, con una cabeza morfológicamente diferente (ver Figura 1). Todo esto determinó la necesidad de generar distintos scripts capaces de reconocer y medir en forma automatizada la PME en cada modelo de estudio. Por otro lado, dada la distinta complejidad de las imágenes de fluorescencia y de las imágenes de microscopía electrónica, la automatización alcanzada para el análisis de las mismas también fue diferente. Si bien el análisis se logró automatizar para las imágenes de fluorescencia, el estudio morfométrico de las mitocondrias mediante imágenes de microscopía electrónica debió realizarse en forma semiautomatizada.



**Figura 1.** Imágenes comparativas donde se observan las principales diferencias morfológicas y de tamaño entre espermatozoides humanos (b y d) y de ratón (a y c). a y b imágenes obtenidas mediante microscopía de campo claro y c y d mediante microscopía de epifluorescencia. Se marca la pieza media espermática en rojo y en azul el núcleo espermático.

A continuación, se detallan los scripts generados y se especifican los comandos seguidos por cada uno de los mismos. Cabe destacar y se detalla más adelante, la existencia de comandos en común y comandos específicos para cada uno de los scripts generados que se diferencian según el modelo en estudio. El procesamiento de imágenes y generación de los distintos scripts se realizó utilizando rutinas de ImageJ/Fiji [198] implementadas en Python [199],

como se mencionó previamente. También se utilizaron las siguientes bibliotecas: scikit-image [200], OpenCV [201] y SimpleITK [202].

## Scripts generados

Se generaron distintos scripts, es decir archivos de texto que contiene un conjunto de instrucciones o comandos escritos en un lenguaje de programación, diseñado para que una computadora los ejecute de forma secuencial, evitando los errores propios de un análisis manual y cuya aplicación “en lote” garantiza que todas las imágenes sean procesadas de una forma exactamente igual.

En base a los scripts generados, desarrollamos macros adaptadas específicamente para el análisis de la pieza media espermática en cada condición. Esto nos permitió automatizar tareas repetitivas y así poder analizar un gran número de imágenes, en forma rápida, produciendo un alto número de descriptores morfométricos y datos precisos, exentos del sesgo del observador. La programación de los mismos estuvo a cargo de docentes e ingenieros del Centro de Procesamiento de Imágenes de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la República, integrantes también del núcleo interdisciplinario IMAGINA los cuales trabajaron en combinación con nuestro grupo de trabajo.

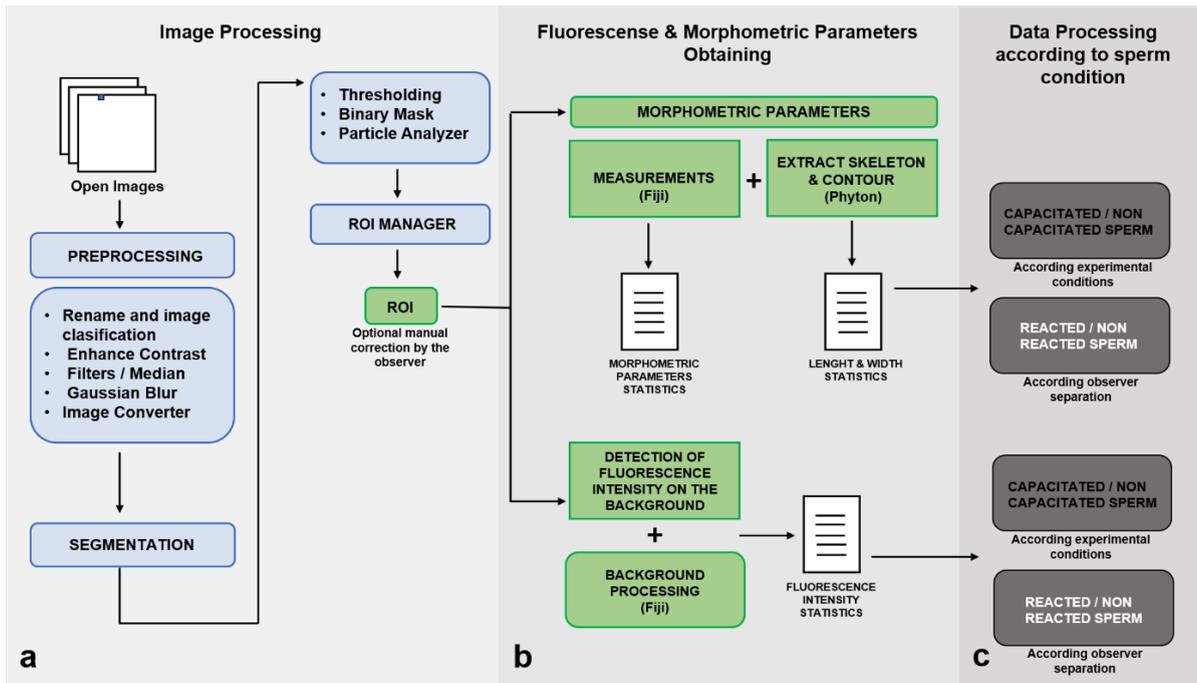
1- Para el **análisis de las imágenes de la PME, obtenidas por microscopía de fluorescencia, en el modelo de ratón**, se generaron los siguientes scripts, los cuales se ejecutan de manera secuencial:

- Un primer script: *rename.py* - que permite seleccionar desde una carpeta original que contiene todas las imágenes, imágenes específicas, renombrarlas y clasificarlas según sus características (forma de obtención, método de tinción o marcado), reubicándolas en una nueva carpeta.
- Un segundo script: *segmentation.py* - que segmenta o delimita la región específica a ser analizada, en este caso la PME, de modo de obtener las regiones de interés o ROIs a partir de las cuales se obtendrán las medidas morfométricas.
- Un tercer script: *measurements.py* - el cual es capaz, a partir de la ROI generada, de arrojar, una vez seteados los descriptores morfométricos, las medidas de las PME.

- Un cuarto script: *skeletonize.py* - implementado enteramente en Python, el cual permite obtener específicamente la medida del largo y ancho de la PME, independientemente de los otros parámetros generados a través de rutinas de Fiji.
- Un quinto script: *fluorescence.py* - el cual a través del procesamiento matemático entre imágenes permite generar un background de cada imagen y restándosele a la imagen original y a la imagen de fluorescencia de la o las PME presentes en la misma imagen, logra homogeneizar la intensidad de fluorescencia (mean gray value) y obtener así el valor real de la misma para cada PME.

En resumen y siguiendo el diagrama de flujo de la Figura 2, la ejecución de los scripts mencionados se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Una vez obtenidas las imágenes de los espermatozoides de ratón marcados con Mitotracker y lectina PSA, las mismas fueron preprocesadas, renombradas y clasificadas en base al primer script mencionado (*rename.py*).
- A continuación, y a través de la ejecución del segundo script (*segmentation.py*) se segmentaron las PME obteniéndose las regiones de interés. Luego de la revisión y corrección manual por el observador de las mismas se procedió a la obtención de los parámetros morfométricos.
- Para la obtención de dichos parámetros se ejecutaron los siguientes scripts: *measurements.py* y *skeletonize.py*.
- Conjuntamente con los descriptores de forma y tamaño, obtenidos como se mencionó previamente, se ejecutó el último script (*fluorescence.py*) de modo de obtener indicadores de la intensidad de fluorescencia de las PME.
- Los datos generados fueron procesados, como se analizará en el capítulo 2 de la tesis, en función a la condición espermática.



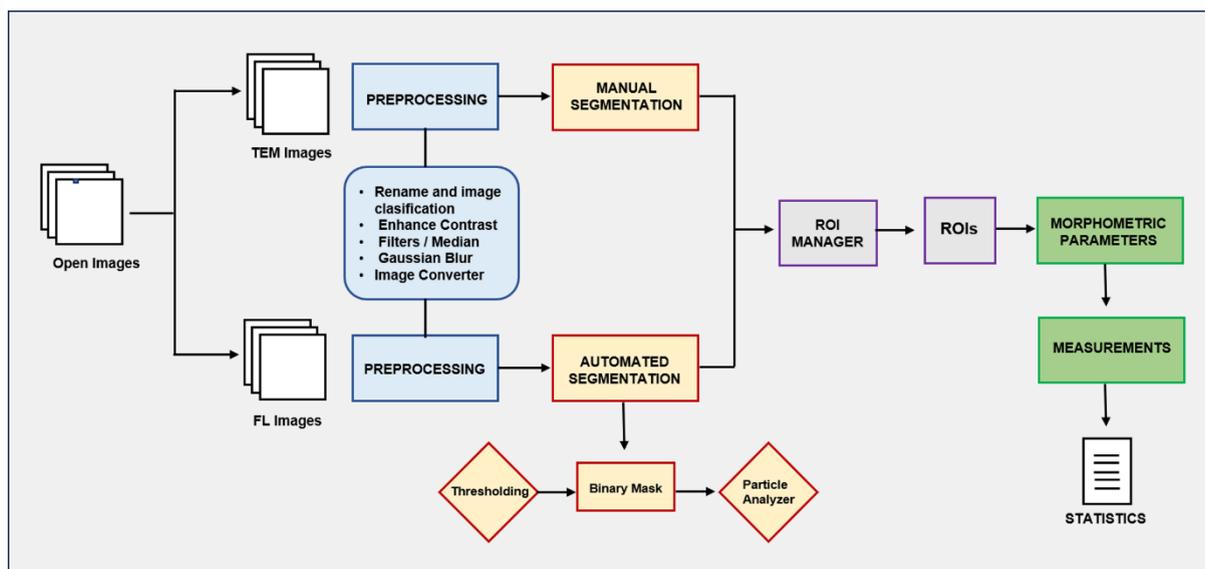
**Figura 2. Diagrama de flujo.** Pasos seguidos para el análisis de las imágenes de la PME, obtenidas por microscopía de fluorescencia, en el modelo de ratón.

2- Para el **análisis de las imágenes de la PME, obtenidas por microscopía de fluorescencia, en el espermatozoide humano**, se generaron los siguientes scripts, los cuales se ejecutan también de manera secuencial:

- *newSegm.py*: el cual ejecuta un algoritmo de segmentación que utiliza no solo la imagen fluorescente de la PME sino también la imagen fluorescente del núcleo espermático, por lo cual ambos tipos de imágenes son requeridas, obteniéndose la segmentación y respectiva ROI, no solo de la PME sino también de la cabeza del espermatozoide.
- *newGenericDialog.py* - el cual genera una interfase de diálogo para la verificación de la segmentación.
- *newMergeAll.py* - la ejecución del mismo genera una composición de imágenes en base al marcaje o a las señales recibidas desde los espermatozoides (PME y cabeza/núcleo espermático).
- *newMeasures.py* - determina la generación y almacenamiento en un archivo .csv, de las medidas generadas tanto de la PME como de la cabeza del espermatozoide a partir de los parámetros morfométricos seteados.

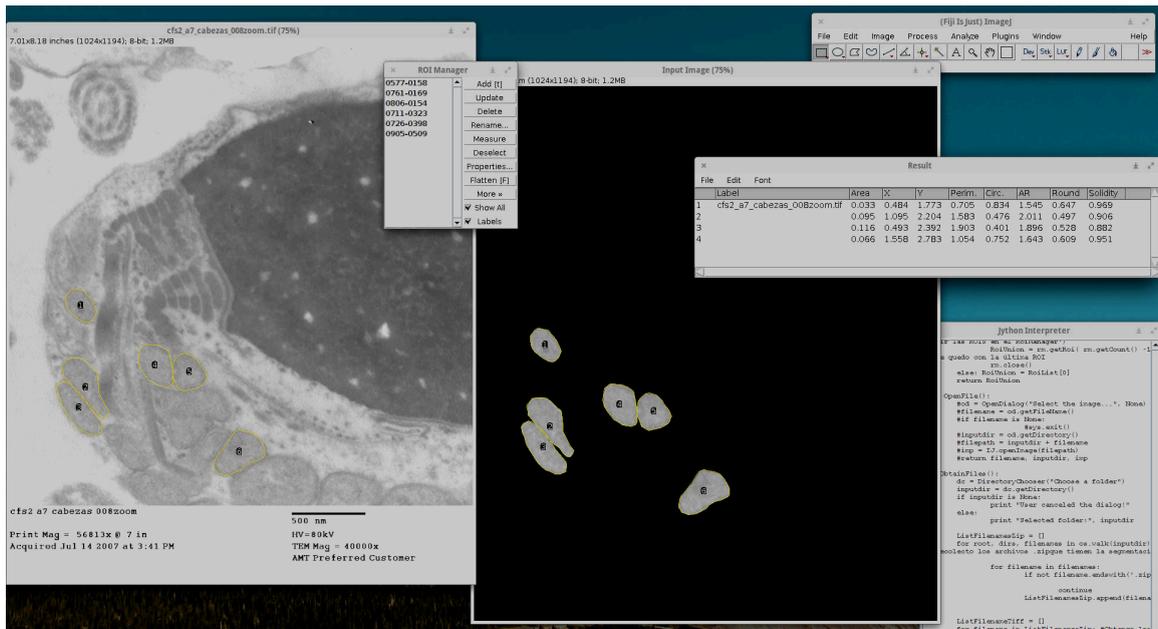
En suma y siguiendo el diagrama de flujo de la Figura 3, se procedió de la siguiente manera:

- Una vez obtenidas las imágenes de los espermatozoides humanos marcados con Mitotracker y DAPI, las mismas fueron preprocesadas. A diferencia del procesamiento llevado a cabo en el modelo de ratón, las imágenes debieron ser renombradas y clasificadas en forma manual. Previamente, también en forma manual, se debieron generar y nombrar las carpetas necesarias, solicitadas por los distintos scripts para el Input y Output de los mismos. Este procedimiento se debió repetir tantas veces como individuos incluidos en el estudio hubiere. La correcta clasificación de las carpetas, al igual que el correcto nombrado de cada una de las imágenes resultó fundamental para la correcta ejecución de los distintos scripts en forma secuencial.
- A continuación, a través del algoritmo de segmentación para Mitotracker y DAPI, se obtuvieron las ROIs de la PME y del núcleo del espermatozoide. Para que el script funcionara correctamente, las imágenes debieron ser previamente calibradas y seteada la escala de las mismas (píxeles a micras).
- Una vez obtenidas las ROIs y verificada la segmentación por el observador, a través del script: *newGenericDialog.py*, las ROIs definitivas fueron almacenadas en la carpeta correspondiente.
- A través del script: *newMergeAll.py*, se generaron los “composites” de las imágenes, a partir de los cuales y de sus respectivas ROIs y tras la ejecución del último script (*newMeasures.py*) se obtuvieron las medidas morfométricas de la PME.
- Se generó una gran cantidad de datos los cuales fueron procesados, como se analizará en el capítulo 3 de la tesis, en función a la condición del sujeto en estudio.



**Figura 3. Diagrama de flujo.** Pasos seguidos para el análisis de las imágenes de la PME, obtenidas por microscopía de fluorescencia, en el modelo humano.

3- El análisis de las imágenes de las PME, y en particular de las mitocondrias allí presentes, obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión, en ambos modelos, se realizó en forma semiautomatizada. La alta complejidad estructural de estas imágenes, bajo contraste entre las diferentes estructuras, presencia de ruido, (a pesar del preprocesado de las mismas) y presencia de gran cantidad de detalles en las estructuras subcelulares hizo imposible la generación de scripts capaces de segmentar las mitocondrias en forma automatizada. La complejidad estructural y variabilidad morfológica de las mitocondrias espermáticas, sumado a diferencias en la orientación del corte observado mediante microscopía electrónica, determinó que la segmentación de las mismas se realizara en forma manual. Las ROIs mitocondriales generadas en forma manual fueron incorporadas al ROI Manager, una herramienta de ImageJ/Fiji, para luego ser procesadas, ahora sí en forma automatizada, para obtener los parámetros morfométricos descriptores de forma y tamaño de las mitocondrias (Figura 4).



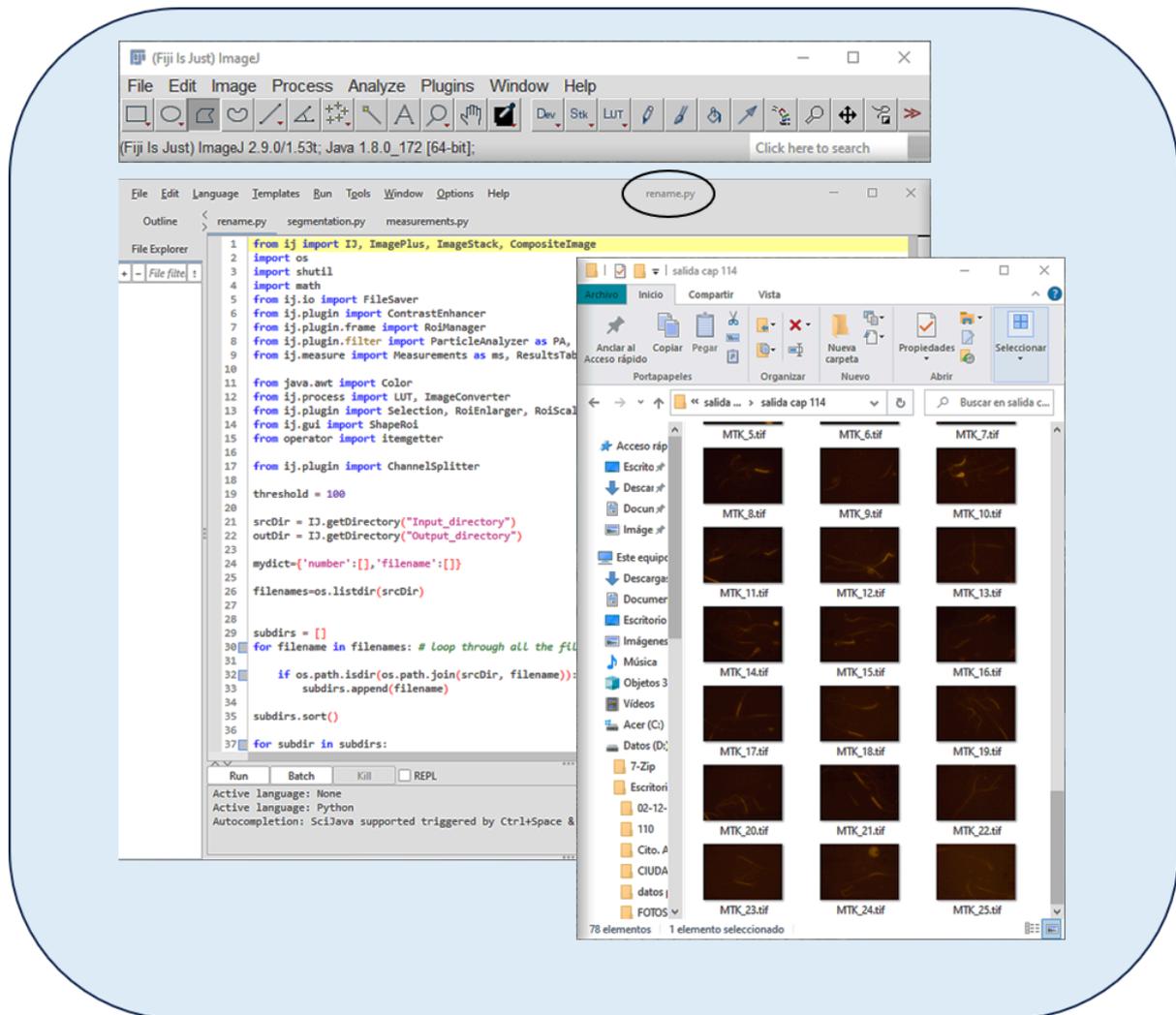
**Figura 4.** Screenshot que muestra los pasos seguidos para el procesamiento de las mitocondrias, segmentación y obtención de datos morfométricos de las mismas, en imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

A continuación, se detallan algunos comandos empleados en la construcción de los distintos scripts. Se describen pasos en común a los distintos procesamientos y pasos específicos.

## Preprocesamiento de las imágenes

Una vez adquiridas las imágenes con los preceptos descritos al inicio del capítulo, independientemente del experimento y del modelo en estudio, todas ellas fueron preprocesadas (Figuras 2 y 3). El preprocesamiento de las imágenes crudas fue necesario para mejorar la calidad de las mismas y corregir imperfecciones que pudieran obstaculizar la posterior segmentación de las mismas, así como la obtención de los parámetros morfométricos. Para ello las imágenes se procesaron como imágenes de 8 bits, se eliminaron artefactos a través de herramientas de sustracción de background, se mejoró el contraste y nitidez de las mismas, se redujo el ruido a través de la utilización de filtros de media y filtros Gaussianos.

Como se describió anteriormente y como parte del preprocesamiento, el script generado para el análisis de las imágenes de fluorescencia de la PME de ratón, renombra y clasifica las imágenes en forma automatizada, tomándolas de su carpeta original y guardándolas en una nueva carpeta, según la técnica de tinción o el marcado fluorescente utilizado (Figura 5).



**Figura 5.** Screenshot que muestra parte del preprocesamiento de las PME de ratón. Se observa en particular la ejecución del script *rename.py* que renombra y clasifica en forma automatizada las imágenes obtenidas.

## Segmentación y generación de regiones de interés (ROIs)

Como ya se mencionó, la segmentación de las imágenes de fluorescencia se realizó en forma automatizada y las mitocondrias en las imágenes de microscopía electrónica se segmentaron en forma manual.

La segmentación de las piezas medias espermáticas se obtuvo a partir de las imágenes de fluorescencia donde la mismas se marcaron con MitoTracker™, a través del método de umbralización de MaxEntropy (Maximum Entropy Thresholding) [203]. Este método permite encontrar automáticamente un valor de umbral que separe una imagen en dos clases (por ejemplo, fondo y objeto = PME marcadas con rojo fluorescente y fondo negro) maximizando la información entre ambas. El mismo determina automáticamente un valor de umbral  $h$  en la

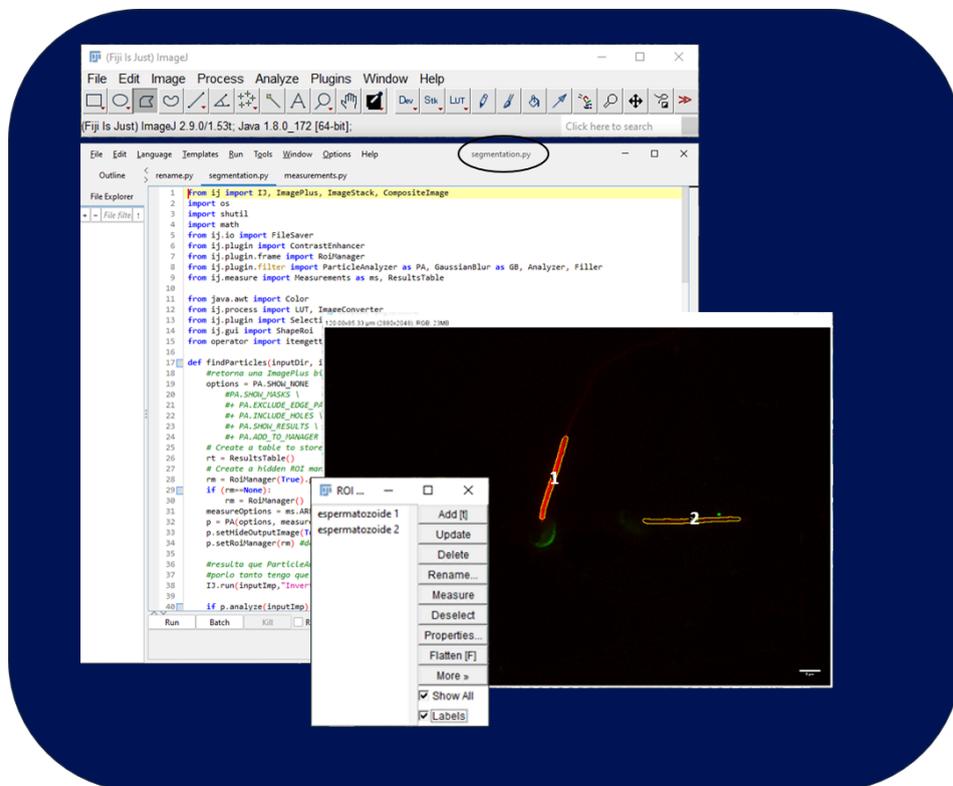
escala de intensidad que maximiza  $\psi(h)$ , basado en la entropía de Shannon [204], donde matemáticamente se representa como:

$$\Psi(s) = \ln P_s (1 - P_s) + \frac{H_s}{P_s} + \frac{H_n - H_s}{1 - P_s}, \text{ with } H_k = \sum_{i=1}^k p_i \ln(p_i), P_s = \sum_{i=1}^s p_i,$$

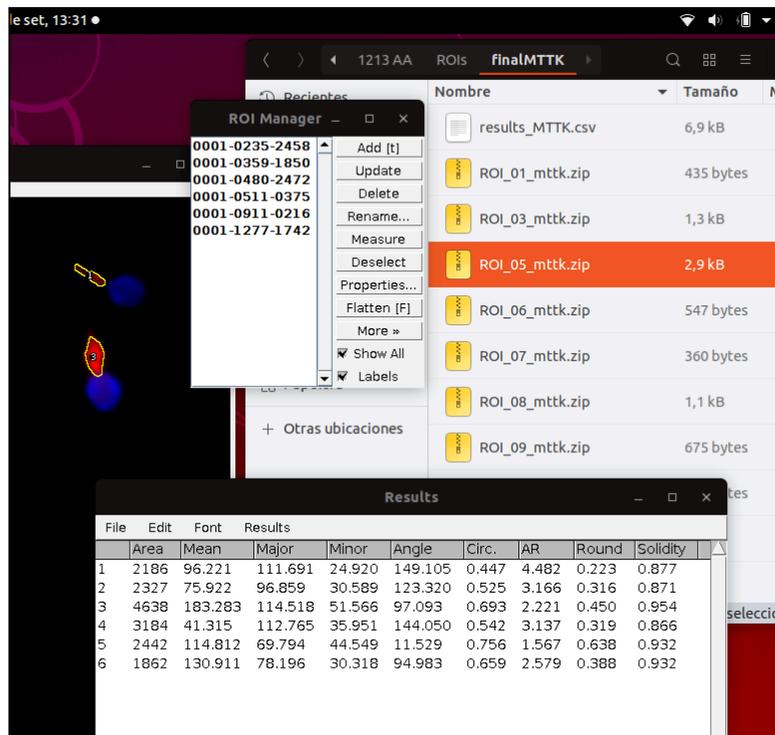
$$p_i = \frac{f_i}{N} \quad \forall i \in \{1, \dots, n\}$$

es la fracción de píxeles con valor  $f_i$ ,  $N$  es el número total de píxeles y  $n$  es el número total de niveles de gris observado en la imagen. Mediante este método, se maximiza la información extraída de la imagen al mejorar el contraste entre las distribuciones de fondo y objeto. Esto permitió la generación automatizada de regiones de interés (ROIs) (ver Figuras 6 y 7), a partir de las cuales se calcularon los descriptores morfométricos y la intensidad de fluorescencia.

Las imágenes de microscopía electrónica se procesaron manualmente y cada mitocondria fue segmentada individualmente a través de herramientas de selección proporcionadas por ImageJ/Fiji (Freehand selection). Cada región de interés encerrada por la herramienta de selección se añadió al ROI Manager de ImageJ/Fiji y a partir de las mismas se realizó el cálculo automatizado de parámetros morfológicos cuantitativos (Figura 4).



**Figura 6.** Screenshot que visualiza la segmentación y generación de ROIs de las PME murinas, a través de la ejecución del script [segmentation.py](#).



**Figura 7.** Screenshot que muestra la segmentación y generación de ROIs de las PME humanas. Las ventanas abiertas evidencian la ejecución del script *newsegmentation.py* que determina la generación de las ROIs que se visualizan sobre la izquierda de la figura. Se observa la ventana del ROI Manager, el output de dicho script que devuelve las ROIs a una carpeta específica (final MTTK), y la ventana de resultados donde se muestra una tabla con las mediciones de algunos de los parámetros morfométricos seleccionados.

## Validación de las regiones de interés

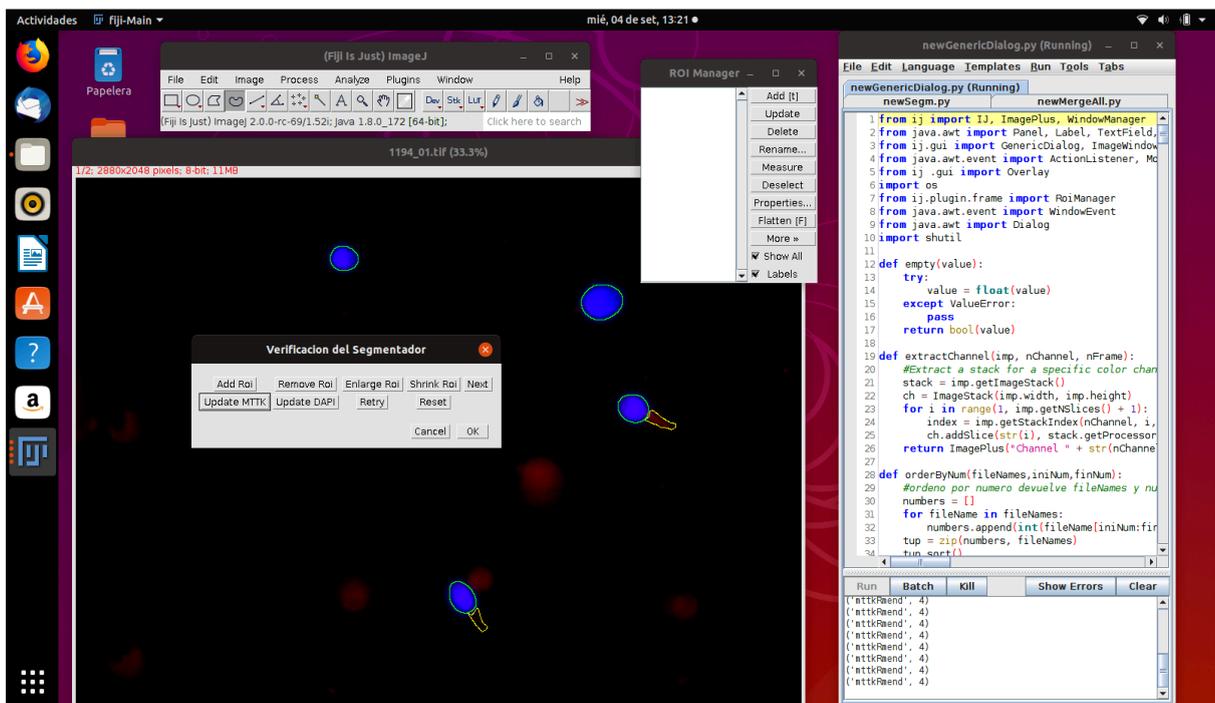
Una vez realizada la segmentación automatizada y obtenidas las regiones de interés se procedió a la validación de las mismas. Todas las ROIs fueron validadas manualmente por el usuario para asegurar la selección de piezas medias bien definidas y aisladas. Se descartaron todas aquellas ROIs donde la PME estuviera incorrectamente segmentada, se superpusiera con imágenes de otras PME “sobremontadas” en el extendido o hubiera superposición de ROIs. También se descartaron las ROIs correspondientes a PME muy incurvadas o enrolladas sobre sí mismas (fundamentalmente en el caso de las PME de ratón, de mayor longitud) que dificultaran el posterior análisis y objetivación de los resultados.

Para la validación de las ROIs generadas en el procesamiento de las imágenes de fluorescencia de espermatozoides humanos, se utilizó un script programado específicamente. En el caso de las PME de ratón, la validación se realizó en forma manual, por el observador,

quien analizando manualmente cada una de las ROIs definió su validación o realizó el ajuste o corrección necesaria para su aceptación.

## Generación del script de validación

Para verificar la segmentación de las PME en los espermatozoides humanos se generó: *newGenericDialog.py*. Dicho “verificador de la segmentación” ejecuta una interfaz de diálogo para la validación de la misma. En este caso, el observador, frente a cada ROI tiene la opción de agregar, eliminar, achicar o ampliar las regiones de interés (ROIs) manualmente y una vez corregidas puede guardar los cambios y continuar con la validación o resetearlos (Figura 8). El script solicita al usuario que seleccione la carpeta principal que contiene los datos de origen de la imagen y las ROIs finales (validadas) son almacenadas en sus respectivas carpetas de salida, para continuar con el procesamiento automatizado.



**Figura 8.** Screenshot que muestra la verificación de la segmentación de las PME humanas. Las ventanas abiertas evidencian la ejecución del script *newGenericDialog.py* que determina la apertura de la ventana del Verificador del Segmentador que permite agregar, remover o modificar por el observador las ROIs generadas, algunas de las cuales se observan en la imagen. Se observa también la ventana del ROI Manager, y la ventana de comandos y herramientas del Fiji/ImageJ.

## Obtención de los parámetros morfométricos

Una vez obtenidas las ROIs, a partir de las mismas y a través de ImageJ/Fiji, aplicando distintos algoritmos sobre los píxeles contenidos dentro de esas regiones, se generaron los descriptores de forma, tamaño y fluorescencia.

Mediante un cuadro de diálogo en ImageJ/Fiji (“Set Measurements”), se pudieron seleccionar diversos descriptores morfométricos (área, mean gray value, centroide, coordenadas en X e Y, centro de masa, perímetro, rectángulo delimitador, elipse ajustada, circularidad, razón de aspecto, redondez, solidez, diámetro de Feret, densidad integrada, entre otros) [205]. Se utilizaron únicamente los parámetros que mejor se ajustaron a la descripción de la pieza media del espermatozoide y sus mitocondrias.

Para el análisis de las PME en las imágenes de fluorescencia, se incluyeron descriptores morfológicos como área, coordenadas en X e Y (para calcular indirectamente ancho y longitud), redondez, circularidad y solidez, así como métricas de fluorescencia como densidad integrada e intensidad media, empleadas para evaluar la intensidad de fluorescencia. Para el análisis preciso del largo y ancho de la PME de los espermatozoides de ratón se utilizó un script específico programado en Python. Dichos parámetros se obtuvieron a partir de la “esqueletización” de cada PME y de la ROI obtenida tras la segmentación de la misma. La “esqueletización” transforma una región binaria en una versión central o “esqueleto” de la forma, en este caso de la PME, obteniéndose así el “eje central” de la estructura (ver Figura 5a-e del capítulo 2 de la tesis). Esto permitió analizar y calcular con mayor precisión la longitud de la PME, teniendo en cuenta que dichas estructuras en el ratón, son más largas que las humanas y por ende se observan en forma menos rectilínea en las imágenes estudiadas. En el mismo sentido, dicho script permitió calcular el ancho promedio de la PME promediando las distancias desde puntos seleccionados del esqueleto de la PME hasta su contorno (Figura 5 – Capítulo 2).

Para el análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica, entre los parámetros disponibles en ImageJ/Fiji, se seleccionaron los siguientes: Área, Perímetro, Circularidad, Redondez, Coordenada en X y Valor Medio de Grises (Mean Gray Value).

En ImageJ/Fiji, los parámetros Circularidad y Redondez [202] se calculan de la siguiente manera:

$$\text{Circularidad} = \frac{4\pi \times \text{Área}}{\text{Perímetro}^2}, \quad \text{Redondez} = \frac{4 \times \text{Área}}{\pi \times M^2}$$

donde  $M$  representa el eje mayor de una elipse ajustada a la ROI.

Aunque ambos parámetros pueden parecer similares, presentan diferencias importantes. Por ejemplo, si se consideran una elipse y un rectángulo como ROIs que comparten la misma elipse ajustada, tendrán áreas, ejes mayores y menores, y ángulos similares. Dado que el eje mayor ( $M$ ) es el mismo para ambas, la Redondez será igual, pero la Circularidad será mayor para la elipse que para el rectángulo. Motivo por el cual se prefirió considerar ésta última.

Una vez seleccionados en el “Set Measurements” los descriptores de forma, tamaño e intensidad de fluorescencia y ejecutado el script correspondiente las medidas morfométricas fueron devueltas como archivos .csv pasibles de ser transformados en planillas de Excel con una enorme cantidad de data acorde al número de ROIs analizadas en cada experimento y en cada condición y a la cantidad de parámetros seleccionados.

Una vez obtenidas las medidas morfométricas estas fueron analizadas estadísticamente para dar lugar a los resultados que se describen en los capítulos 2 y 3 de la tesis.

Los scripts y un pequeño conjunto de datos de imágenes a modo de ejemplo se encuentran disponibles públicamente en <https://gitlab.fing.edu.uy/imagina/mitomorph/>.

### Objetivo 2

**Analizar cambios morfométricos de las mitocondrias espermáticas durante la capacitación.**

## MATERIALES y MÉTODOS

Para cumplir con el objetivo 2 se llevaron a cabo los siguientes procedimientos.

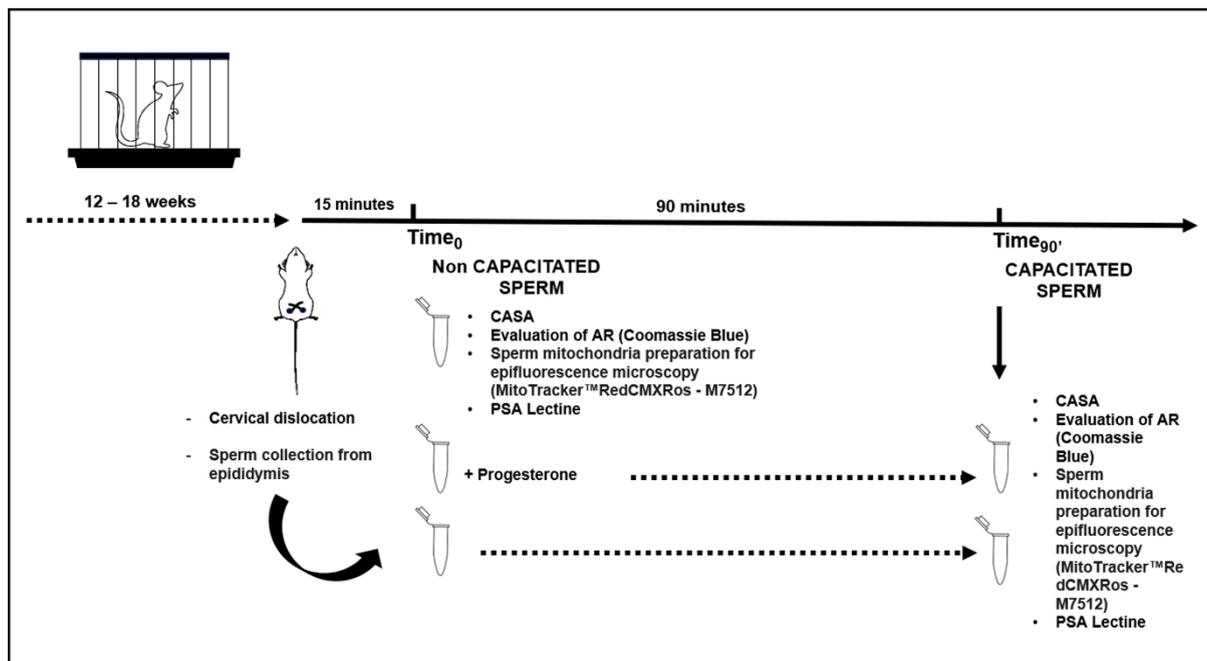
### Animales, obtención y preparación de los espermatozoides

Los espermatozoides se obtuvieron de híbridos F1 de ratones machos B6Bc/JF1 de 12–18 semanas de edad. La línea F1 fue generada en el bioterio de la Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay, mediante el cruce de las cepas de ratón BALB/c y C57BL/6. Ambas cepas fueron adquiridas en Jackson Laboratory. El peso corporal de los animales F1 fue de  $26.8 \pm 1.8$  g (media  $\pm$  desviación estándar).

Todos los animales se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas/12 horas, a una temperatura constante de  $22 \pm 1$  °C, con libre acceso al agua y alimento. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Los espermatozoides se recolectaron del epidídimo tras 15 minutos en 1,5 ml de medio Global Total GT® (Fertilization/LifeGlobal Europe, Bruselas, Bélgica, Ref: LGTF-100) mediante el método de "swim-out". El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (Uruguay, CHEA).

Para la capacitación espermática también se utilizó el medio GT®. Dicho medio fue previamente colocado en una incubadora con CO<sub>2</sub> para equilibrar el pH, según las instrucciones del fabricante. Las suspensiones espermáticas se transfirieron a cámaras CELL-VU, con una profundidad de 20  $\mu$ m, (DRM-600, Millennium Sciences, Inc., CELL-VU®, NY) precalentadas. La concentración y motilidad espermática se analizaron mediante un sistema de análisis computarizado (CASA, SCA, Microptic, Barcelona, España), utilizando un microscopio Nikon Eclipse E200 (Japón) con sistema de contraste de fases 100X, equipado con una cámara Basler acA780–75gc (Alemania). Los parámetros de configuración del equipo fueron los siguientes: adquisición a 30 fotogramas/segundo, frecuencia de 60 Hz, y tamaño de cabeza entre 5–70. Los espermatozoides con motilidad hiperactivada se clasificaron en base a los siguientes parámetros cinéticos: ALH > 8  $\mu$ m,

VCL > 180  $\mu\text{m/s}$  y LIN < 50  $\mu\text{m}$ . Se analizaron al menos 500 espermatozoides por ensayo. Luego del análisis de motilidad, las muestras se dividieron en tres tubos. Uno de ellos se procesó inmediatamente (Tiempo 0) y se consideró la condición NC (no capacitada). Los espermatozoides en los otros dos tubos se incubaron durante 90 minutos (Tiempo 90') a 37 °C en medio Global Total GT® para inducir la capacitación. A uno de estos tubos se le añadió progesterona (Sigma-Aldrich) (100  $\mu\text{M}$ ) para inducir la reacción acrosómica (gráfico de línea temporal).



**Gráfico de línea temporal.** Se esquematizan los procedimientos y experimentos realizados en función al tiempo.

### Evaluación de la reacción acrosómica con Azul de Coomassie (Coomassie Blue)

El porcentaje de espermatozoides que habían experimentado la reacción acrosómica se determinó colocando 15  $\mu\text{l}$  de cada muestra sobre un portaobjetos de vidrio, luego del extendido y secado de la misma, se fijó con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos y se lavó dos veces con solución buffer fosfato salina (PBS). Tras el lavado, los portaobjetos se incubaron con azul de Coomassie al 0,22% (Coomassie Blue G-250; Thermo Scientific), preparado en una solución compuesta por 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial y 40% de agua destilada, durante 2 minutos. El exceso de colorante se eliminó mediante lavados con agua destilada. Los portaobjetos se secaron al aire y se montaron con un cubreobjetos adherido mediante medio de montaje. Los espermatozoides así teñidos se

examinaron con un microscopio de campo claro a 400 aumentos (Nikon E100, Japón) de modo de determinar el porcentaje de espermatozoides que habían sufrido la reacción acrosómica. En cada experimento se evaluaron al menos 200 espermatozoides. La reacción acrosómica se expresó como el porcentaje de espermatozoides reaccionados respecto al número total de espermatozoides analizados. Este recuento se realizó en las distintas condiciones experimentales planteadas anteriormente (no capacitada, capacitada y capacitada con progesterona).

### **Fertilización in vitro (FIV)**

En resumen, hembras de ratón B6Bc/JF1 de 4 semanas de edad fueron superovuladas mediante inyecciones intraperitoneales de 7,5 UI de PMSG (Syntex, Argentina), seguidas 48 horas después por 7,5 UI de HCG (Intervet International B.V., Holanda). A las 24 horas, se extrajeron los oviductos y los complejos cúmulo-ovocito (COCs) se transfirieron a una placa que contenía una gota de 200  $\mu$ L de medio GT® (1 M). Se añadieron espermatozoides a las gotas de FIV que contenían los COCs y se incubaron en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Veinticuatro horas después, se registraron las tasas de fertilización. Una parte de los ovocitos segmentados se transfirió a medio GT® (Ref: LGGT-060) con CO<sub>2</sub> con el fin de alcanzar un estadio más avanzado en el desarrollo embrionario, confirmándose así la capacitación de la fracción espermática utilizada.

### **Microscopía de fluorescencia (preparación de los espermatozoides para el análisis de la pieza media y de la reacción acrosómica)**

Para el análisis morfométrico de la pieza media espermática (PME), los espermatozoides fueron incubados con MitoTracker™ Red CMXRos-M7512 (Invitrogen, EE. UU.) a una concentración de 200 nM, durante 30 minutos a 37 °C, inmediatamente después del swim-out desde el epidídimo (tiempo cero) o tras el período de capacitación (tiempo 90 minutos) (ver gráfico de línea temporal).

Posteriormente, se colocaron 50  $\mu$ l de cada muestra de esperma sobre un portaobjetos de vidrio con lo cual se realizaron extendidos. Los espermatozoides fueron fijados con PAF al 4% durante 30 minutos y lavados tres veces con PBS. Después de la fijación, los espermatozoides fueron incubados con lectina PSA biotinilada (Pisum Sativum Agglutinin, B-1055-5), un marcador acrosomal que permite diferenciar entre espermatozoides

reaccionados y no reaccionados. La lectina PSA, se utilizó a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Los núcleos fueron contrateñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI).

### **Microscopía de Epifluorescencia**

Las preparaciones fueron observadas utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 equipado con un objetivo de 100X de inmersión en aceite y apertura numérica 1.4 (excitación:  $\lambda = 488 \text{ nm}$  y  $\lambda = 543 \text{ nm}$ ). Se tomaron imágenes de fluorescencia de al menos 100 espermatozoides por cada condición, las cuales se cotejaron con micrografías de luz transmitida para verificar que se incluyeran la cabeza y la pieza media de cada espermatozoide. Las fotografías digitales fueron capturadas con una cámara digital Nikon DS-Fi3 de 5.9 megapíxeles y procesadas posteriormente.

### **Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

Para el análisis ultraestructural, se analizaron espermatozoides obtenidos del epidídimo de cinco ratones, los cuales se separaron en tres condiciones (no capacitados, capacitados y capacitados con progesterona) según lo descrito previamente. Luego, se fijaron y procesaron para microscopía electrónica de transmisión (TEM). La fijación se realizó con una solución mixta de paraformaldehído al 4% p/v en buffer fosfato 0.1 M conteniendo glutaraldehído al 2.5% v/v (pH 7.4), durante toda la noche a 4 °C. Una vez fijadas, las muestras se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% (p/v) durante una hora, se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente y acetona, y finalmente se incluyeron en Araldita, la resina de inclusión para el procesamiento de rutina. Tras la inclusión, se obtuvieron cortes finos (500 nm) y ultrafinos (50–70 nm) en un ultramicrotomo Leica EM UC6 con cuchilla de diamante DIATOME. Las secciones ultrafinas se contrastaron con acetato de uranilo seguido de citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 a una aceleración de voltaje de 90 kV. Se adquirieron imágenes de aproximadamente cincuenta cortes transversales de la pieza media espermática para cada condición, las cuales fueron registradas y almacenadas. Las imágenes se capturaron y procesaron con una cámara digital Hamamatsu C4742-95 para obtener información cualitativa y cuantitativa sobre la pieza media espermática y la morfología mitocondrial. Entre 32 y 48 imágenes de la pieza media se obtuvieron y procesaron semi-automáticamente en cada condición, utilizando el ROI manager de Fiji).

## **Procesamiento de imágenes**

El procesamiento de las imágenes obtenidas tanto por microscopía de fluorescencia como por MET se realizó como se detalla en el capítulo 1 de la tesis.

## **Análisis estadístico**

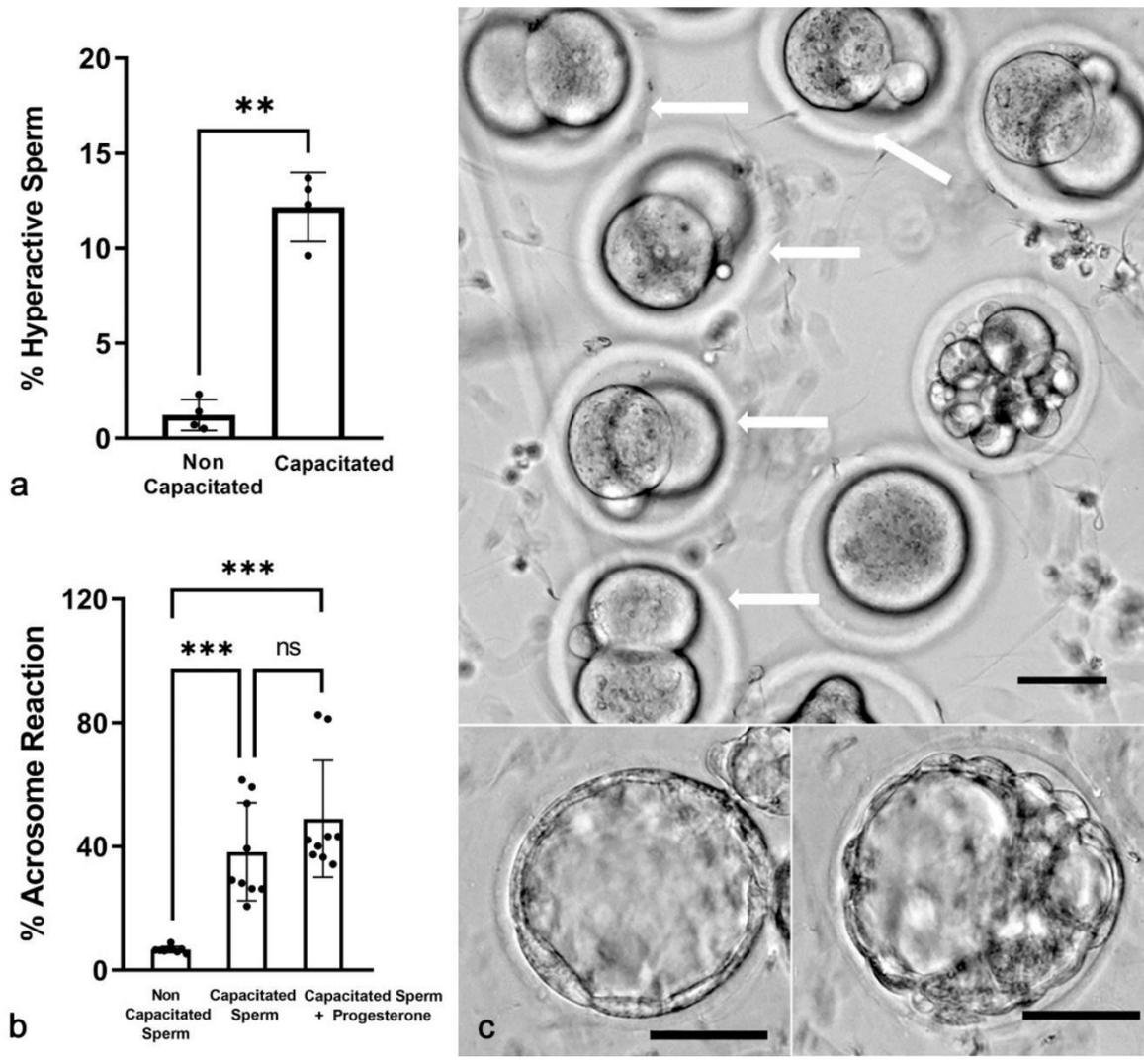
Luego de verificar la distribución normal de los datos mediante el test de normalidad de Shapiro–Wilk, los valores de fluorescencia y morfometría de las ROIs de las piezas medias de espermatozoides en condiciones no capacitadas, capacitadas, y con o sin reacción acrosómica, se compararon utilizando la prueba del test de t pareada. El efecto de la progesterona sobre los espermatozoides en condiciones no capacitantes y capacitantes se analizó mediante ANOVA. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ . En el caso del porcentaje de reacción acrosómica y del perímetro de las piezas medias en los cortes de MET, los valores no presentaron distribución normal, por lo que las medianas se analizaron con el test de Kruskal-Wallis. Para los experimentos de FIV, los resultados de las tasas de fertilización con los distintos tratamientos, se analizaron mediante ANOVA. Todos los análisis se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 9 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA; <http://www.graphpad.com>).

## **RESULTADOS**

### **Eventos asociados a la capacitación tras la incubación de los espermatozoides en un medio capacitante**

Como se describió al inicio de la tesis, la capacitación espermática se caracteriza por diversos eventos que permiten que el espermatozoide alcance y fecunde al ovocito. Para evaluar la capacitación, primero examinamos tres características clave luego de 90 minutos de incubación en un medio enriquecido con BSA y bicarbonato (condición capacitante). Como se muestra en la Figura 1, se detectó un mayor porcentaje de células hiperactivadas en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes en comparación con aquellos incubados en medio no capacitante (Figura 1.a) (media  $\pm$  desviación estándar en no capacitados:  $1.3 \pm 0.8$  vs en capacitados:  $12.2 \pm 1.8$ ,  $n = 4$ ,  $p = 0.0012$ , test de t pareado). El porcentaje medio  $\pm$  desviación estándar de espermatozoides con reacción acrosómica, estudiado mediante la técnica de Coomassie Blue, también aumentó en espermatozoides

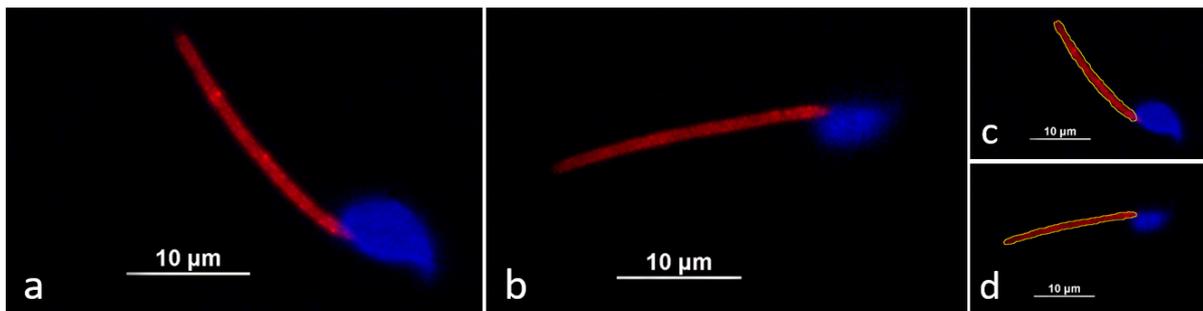
capacitados (Figura 1.b) (no capacitados (NC):  $6.6 \pm 1.0$ , capacitados (CAP):  $38.3 \pm 15.9$ , y tras la inducción con progesterona (Capi):  $49.0 \pm 18.9$ ,  $n = 9$ ,  $p < 0.001$ , prueba de Kruskal-Wallis). Además, se evaluó la viabilidad embrionaria mediante la obtención de embriones en estadio de dos células a las 24 horas post-FIV (flechas en Figura 1.c) y blastocistos a las 96 horas (imagen inferior de la misma figura). Con base en estos resultados, se confirmó que la fracción espermática incubada durante 90 minutos en medio enriquecido con BSA y bicarbonato, correspondía a una fracción de espermatozoides capacitados, verificándose efectivamente la capacitación espermática.



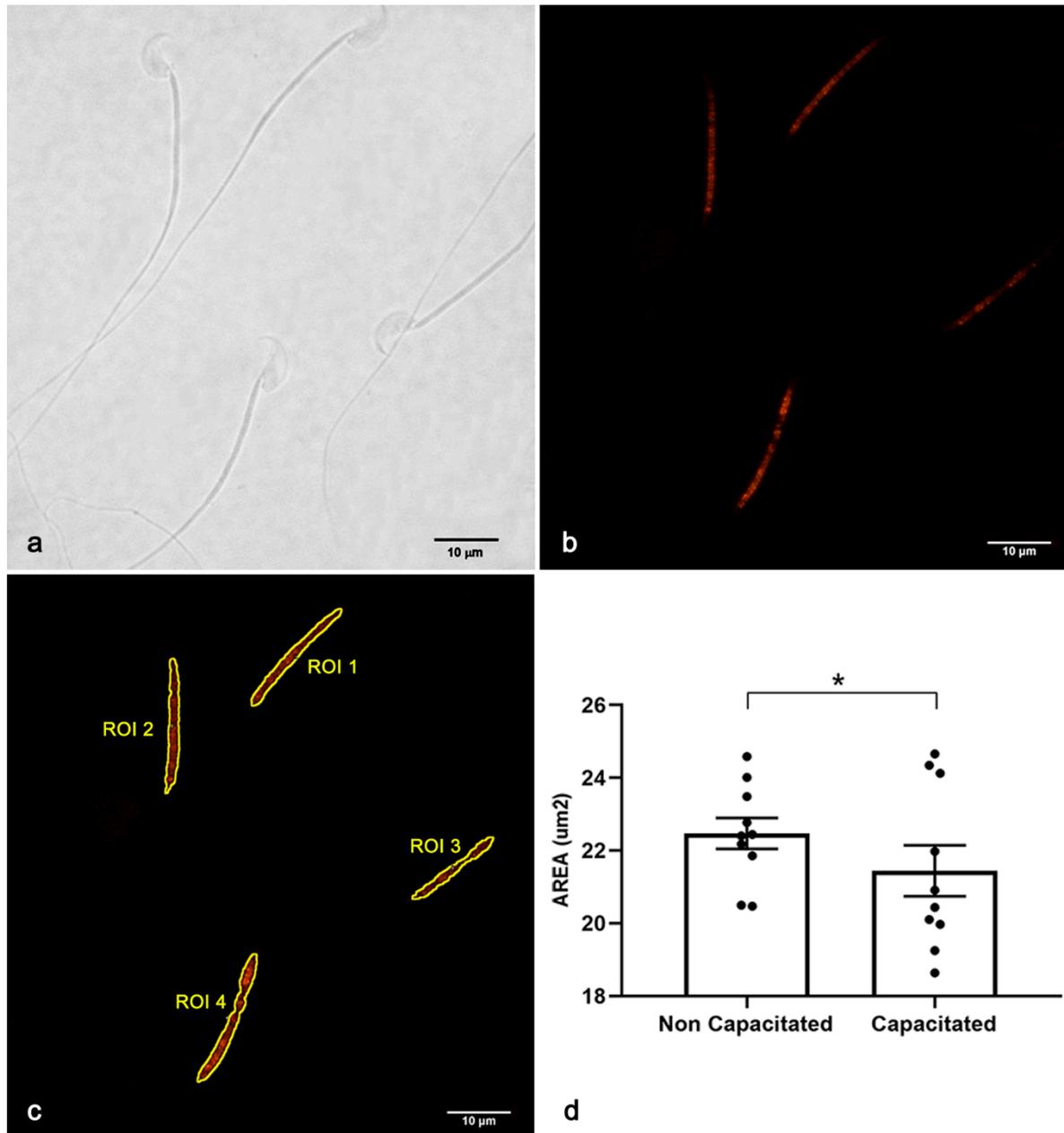
**Figura 1. Marcadores de la capacitación espermática en ratón.** a. Porcentaje de espermatozoides hiperactivados medido mediante CASA, expresado como media  $\pm$  desviación estándar,  $p < 0,05$ ,  $n=4$ , test de t pareado. b. Porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal medido mediante la técnica de azul de Coomassie, expresado como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=9$ ,  $p < 0,05$ , ANOVA. c. Imágenes representativas de embriones obtenidos tras la incubación de espermatozoides en un medio capacitante. Imagen superior: Las flechas blancas indican embriones de ratón en estadio de 2 células, obtenidos luego de 24 horas de la FIV. Las imágenes inferiores muestran embriones en estadio de blastocisto tras 96 horas de la FIV.

## Reducción del área de la pieza media espermática bajo condiciones capacitantes

La mayoría de las piezas medias espermáticas se marcaron con MitoTracker tanto en condiciones capacitantes como no capacitantes (Figura 2 y Figura 3). En la Figura 2a y b se muestran imágenes representativas de espermatozoides no capacitados y capacitados respectivamente. Se generaron sus respectivas regiones de interés (ROIs) (Figura 2c y d). El marcado fluorescente rojo se restringió a la región de la pieza media de cada espermatozoide, coincidiendo con el inicio del flagelo en las imágenes de luz transmitida (Figura 2 y Figura 3b). La especificidad del marcado permitió hacer coincidir con precisión las ROIs con la región del flagelo donde se localizan las mitocondrias (Figura 2 y Figura 3 b y c). El análisis morfométrico de las imágenes representativas de la Figura 2 evidenció una reducción del área y el ancho de la pieza media espermática en un 20%, específicamente en los espermatozoides representativos capacitados (Figura 2b y d) en comparación con los no capacitados (Figura 2a y c). El análisis morfométrico de todas las ROIs obtenidas en forma automatizada mediante el script de Fiji mostró que la media  $\pm$  desviación estándar del área en espermatozoides no capacitados fue mayor que en espermatozoides capacitados ( $22.47 \pm 1.37$  vs.  $21.44 \pm 2.26 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 10$ ,  $p = 0.01$ ), lo que sugiere una contracción de la pieza media espermática durante el proceso de capacitación (Figura 3d).



**Figura 2. Procesamiento de imágenes y análisis morfométrico de las piezas medias de espermatozoides de ratón en condiciones no capacitantes y capacitantes.** a. Imagen representativa de un espermatozoide no capacitado. b. Imagen representativa de un espermatozoide capacitado. c. Segmentación del espermatozoide no capacitado y generación de la ROI correspondiente (línea en amarillo). d. ROI del espermatozoide capacitado.



**Figura 3. Procesamiento de imágenes y análisis morfométrico de las piezas medias de espermatozoides de ratón en condiciones no capacitantes y capacitantes.** a. Espermatozoides de ratón en campo claro. b. Espermatozoides de ratón cargados con MitoTracker Red; la pieza media espermática se observa en rojo. c. Segmentación de la pieza media del espermatozoide y determinación de las ROIs. d. Parámetros morfométricos (área) en la comparación entre condiciones no capacitantes y capacitantes en diez ratones. \* $p < 0,05$ , test de  $t$  pareado.

### **Reducción del área de la pieza media espermática en espermatozoides que sufrieron la reacción acrosómica**

Para evaluar si el remodelado de la pieza media espermática está relacionado con los cambios que ocurren simultáneamente en la cabeza del espermatozoide durante la capacitación, se midió el área de la pieza media en espermatozoides con y sin reacción acrosómica. Para ello,

la población de espermatozoides marcados con PSA fue clasificada por el observador como espermatozoides intactos o con reacción acrosómica. Esta clasificación se realizó en función a la presencia o ausencia de una estructura verde en forma de coma que recubre la cabeza del espermatozoide (Figura 4b). Se midieron las regiones de interés (ROIs) en ambas condiciones: en espermatozoides sin reacción acrosómica (no reaccionados) (ROI 1 en la Figura 4c) y espermatozoides con reacción acrosómica (reaccionados) (ROI 2 en la Figura 4c). El área de la pieza media en espermatozoides con reacción acrosómica disminuyó un 8,5% en comparación con los espermatozoides no reaccionados (media  $\pm$  desviación estándar: no reaccionados:  $24,33 \pm 0,47$  vs. reaccionados:  $22,25 \pm 0,21 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,0001$ , test de t pareado).

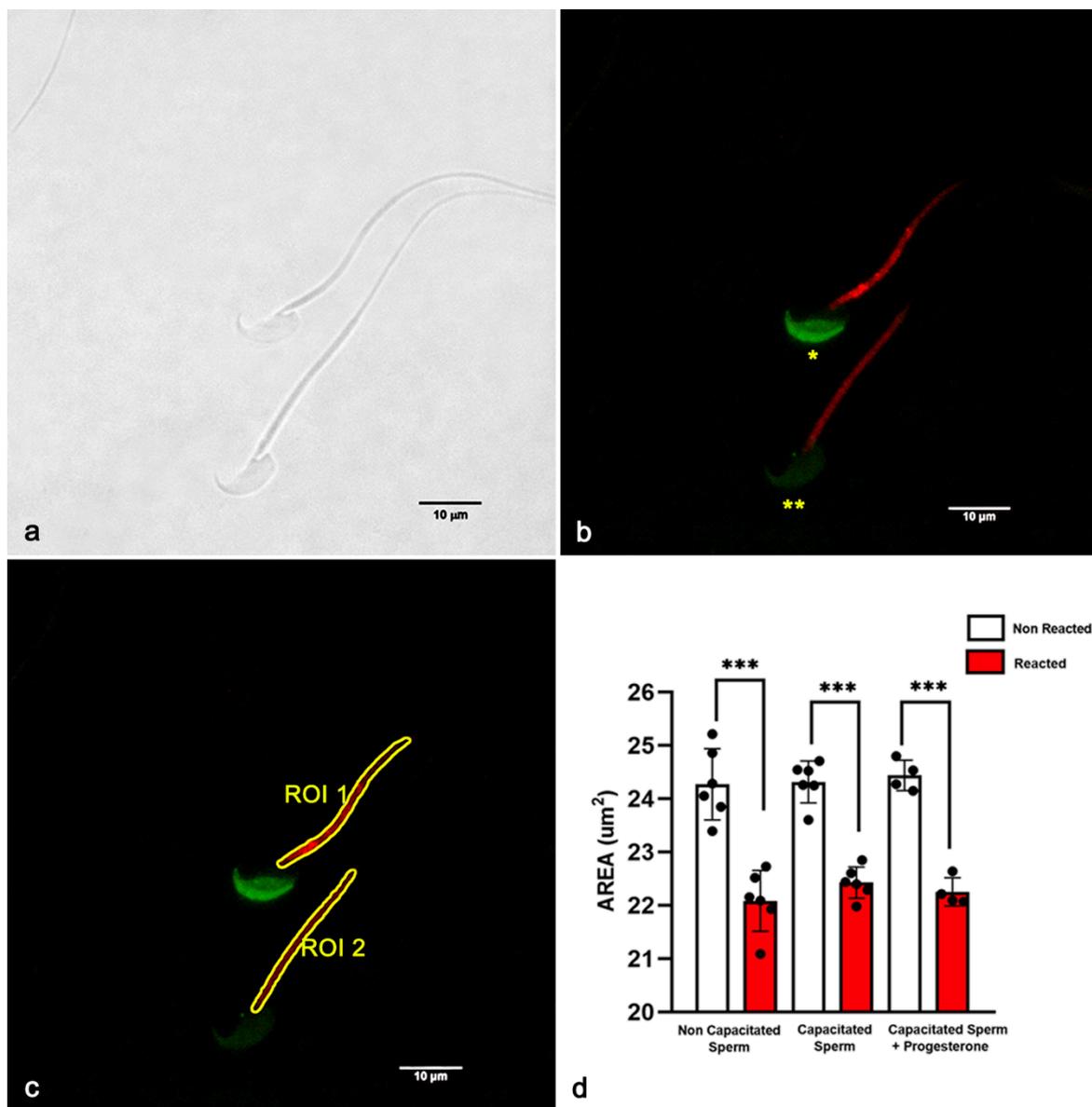
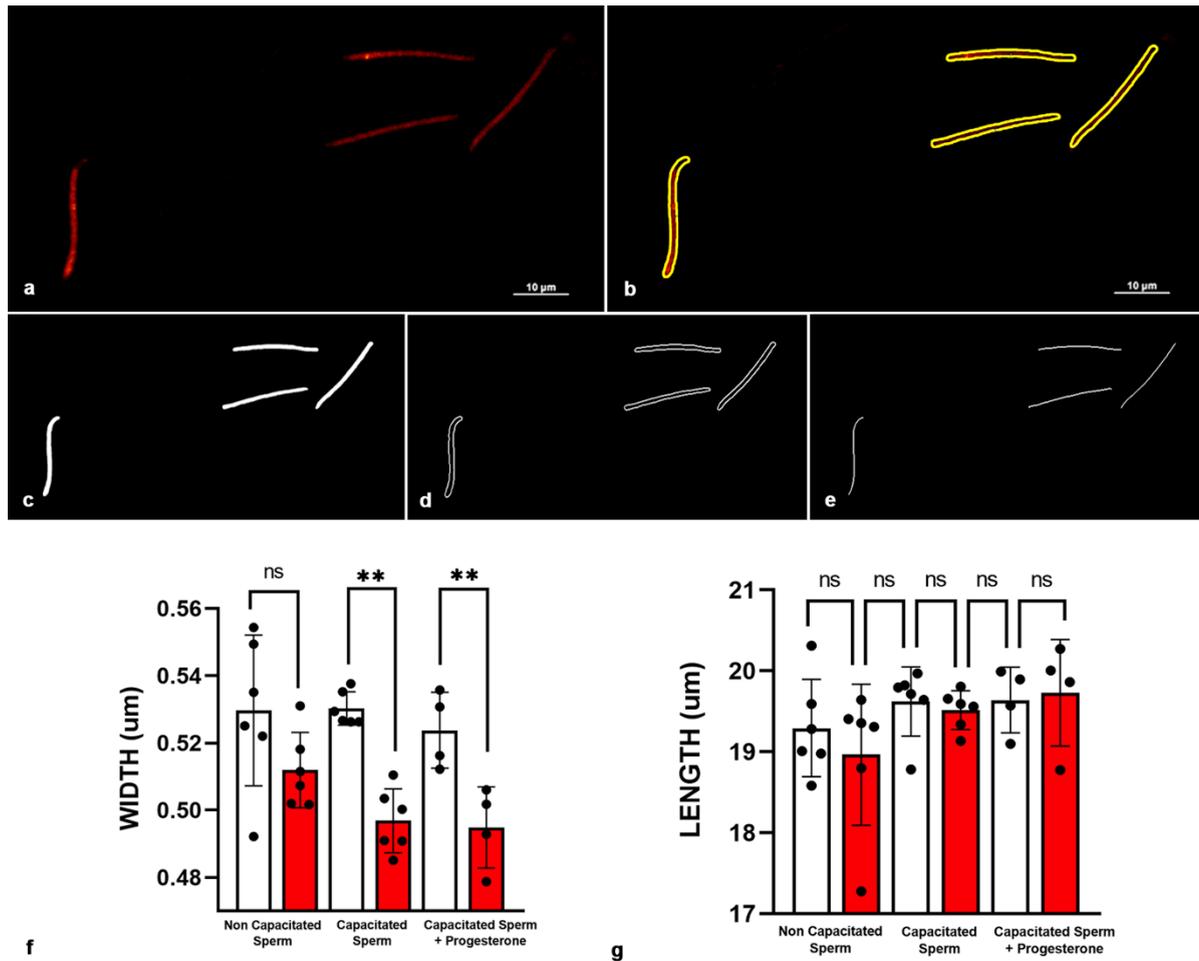


Figura. 4. Procesamiento de imágenes y análisis morfométrico de la pieza media espermática de ratón en relación a la reacción acrosómica. a. Espermatozoides de ratón en campo claro. b. Espermatozoides de ratón

marcados con MitoTracker Red (las piezas medias se muestran en rojo) y con lectina PSA que revela el estado de los acrosomas (los acrosomas se observan en verde: \*no reaccionados, \*\*reaccionados). c. Segmentación de las piezas medias espermáticas y determinación de las ROIs. d. Parámetros morfométricos (área) correspondientes al estado del acrosoma de los espermatozoides en las distintas etapas de la capacitación espermática (n = 4–6 ratones). \*p < 0,05, test de t pareado.

Esta disminución se observó tanto en los espermatozoides reaccionados espontáneamente en condiciones no capacitantes (no reaccionados:  $24,27 \pm 0,66$  vs. reaccionados:  $22,08 \pm 0,56$ ,  $p < 0,001$ , n = 6, test de t pareado), como tras la incubación en un medio capacitante (no reaccionados:  $24,31 \pm 0,39$  vs. reaccionados:  $22,43 \pm 0,29$ ,  $p < 0,0001$ , test de t pareado) o frente a la reacción acrosómica inducida por progesterona (no reaccionados:  $24,44 \pm 0,29$  vs. reaccionados:  $22,25 \pm 0,26$ ,  $p < 0,0001$ , test de t pareado) (Figura 4d).

Luego se examinó cuál de las dimensiones de la pieza media espermática podría explicar la disminución observada en el área de los espermatozoides reaccionados. La esqueletización de las regiones de interés (ROIs) permitió medir el ancho y la longitud de las zonas marcadas (Figura 5a–d). La media  $\pm$  desvío estándar del ancho de la PME disminuyó en los espermatozoides con reacción acrosómica (no reaccionados:  $0,54 \pm 0,014 \mu\text{m}$  vs. reaccionados:  $0,50 \pm 0,13 \mu\text{m}$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,001$ ; test de t pareado), mientras que la longitud de la PME se mantuvo sin cambios significativos (no reaccionados:  $19,50 \pm 0,49 \mu\text{m}$  vs. reaccionados:  $19,36 \pm 0,68 \mu\text{m}$ ;  $n = 6$ ;  $p = 0,3$ ; test de t pareado). Se observó una disminución del ancho de la pieza media espermática en las tres condiciones analizadas: **no capacitados** (no reaccionados:  $0,53 \pm 0,02 \mu\text{m}$  vs. reaccionados:  $0,51 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ;  $n = 6$ ;  $p = 0,2$ ); **capacitados** (no reaccionados:  $0,53 \pm 0,00 \mu\text{m}$  vs. reaccionados:  $0,49 \pm 0,00 \mu\text{m}$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,001$ ); **capacitados con progesterona** (no reaccionados:  $0,52 \pm 0,01 \mu\text{m}$  vs. reaccionados:  $0,49 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ;  $n = 4$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 5f y g).

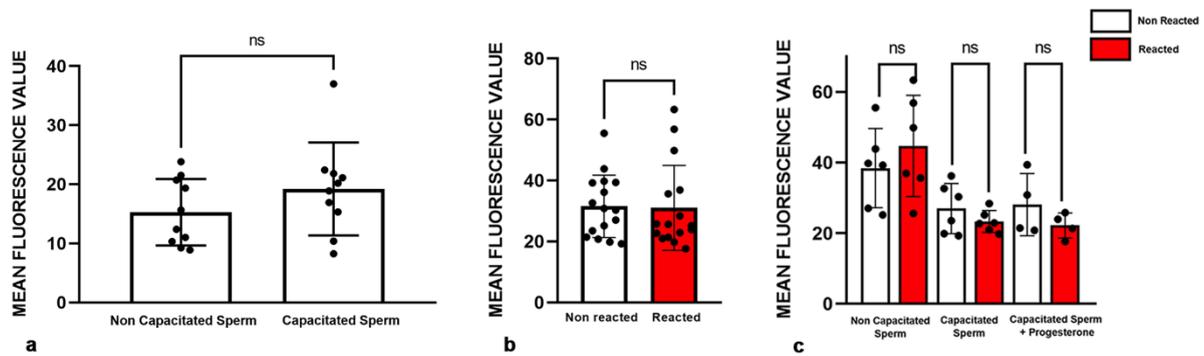


**Figura 5. Procesamiento de imágenes y análisis de las dimensiones de la pieza media espermática marcada con MitoTracker®.** a–e: Esqueletización de las ROIs de la pieza media de espermatozoides con y sin reacción acrosómica, lo que permitió determinar el ancho (d) y la longitud (e) de la pieza media espermática. Análisis estadístico del ancho (f) y la longitud (g) de la pieza media, comparando espermatozoides con y sin reacción acrosómica en distintas condiciones de capacitación ( $n = 4-6$  ratones). \*\* $p < 0,001$ , ns: no significativo, test de  $t$  pareado. Barras claras: espermatozoides no reaccionados; barras rojas: espermatozoides reaccionados.

### Análisis del valor medio de fluorescencia a nivel de la pieza media espermática

Las regiones de interés (ROIs) de las imágenes obtenidas en las secciones previas fueron re-analizadas, tras la sustracción del background (como se describió en el Capítulo 1 de la tesis), con el fin de obtener el valor medio de fluorescencia en las piezas medias de los espermatozoides. Luego de dicho análisis, no se encontraron diferencias significativas en la media  $\pm$  desvío estándar de la intensidad de fluorescencia entre las condiciones capacitadas y no capacitadas (no capacitadas:  $15,29 \pm 5,64$  vs. capacitadas:  $19,23 \pm 7,86$ ;  $n = 10$ ;  $p = 0,2$ ; test de  $t$  pareado) (Figura 6a). Cuando los espermatozoides fueron clasificados como no

reaccionados o reaccionados según la condición del acrosoma, tal como se describió previamente, la intensidad media de fluorescencia en los flagelos marcados con MitoTracker fue similar entre ambos grupos (media  $\pm$  desvío estándar: no reaccionados:  $31,54 \pm 10,47$  vs. reaccionados:  $31,04 \pm 13,91$ ;  $n = 16$ ; test de  $t$  pareado; Figura 6b), independientemente de la condición espermática (Figura 6c).

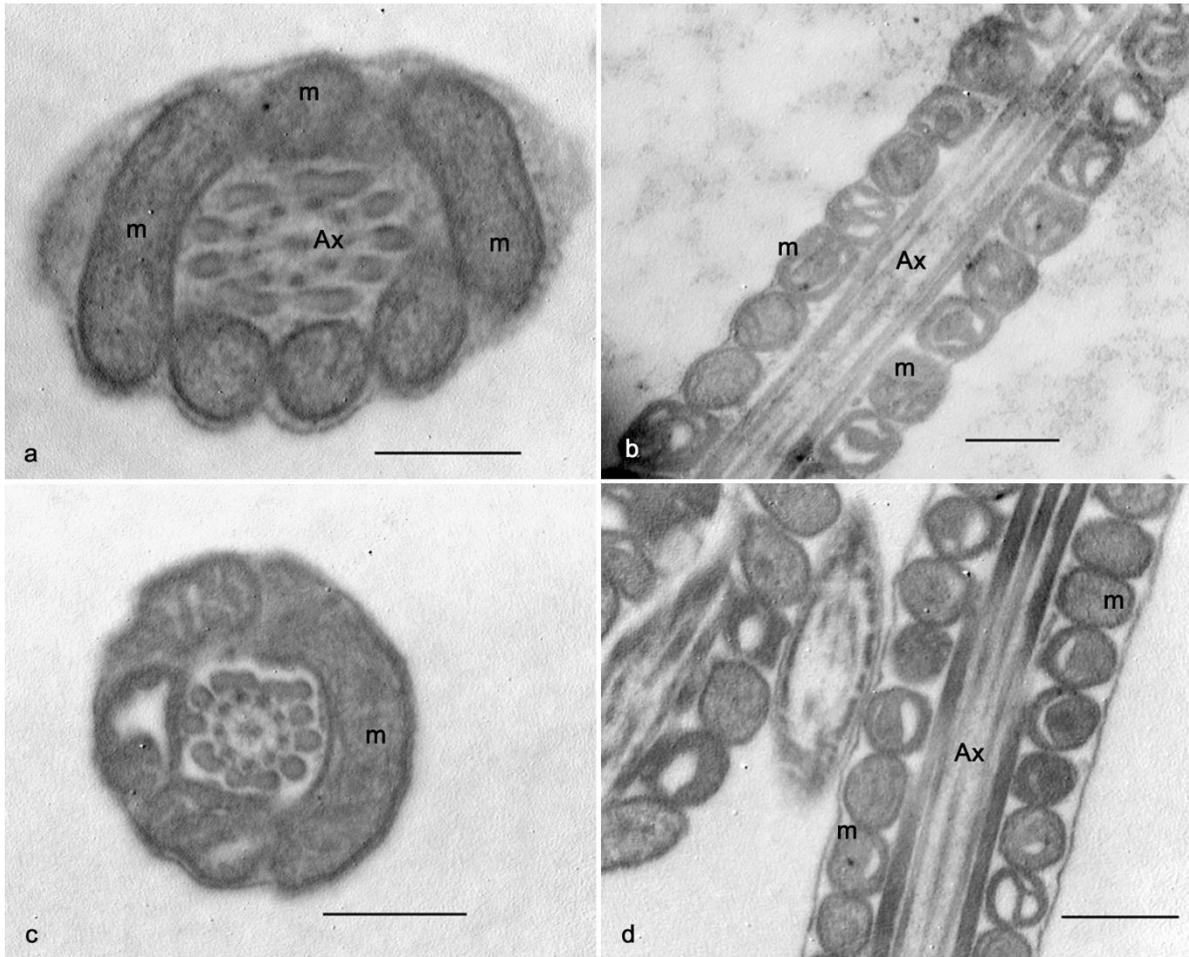


**Figura 6. Análisis de la fluorescencia de la pieza media espermática marcada con MitoTracker®.**

a. Media  $\pm$  desviación estándar de los valores medios de fluorescencia de la pieza media espermática bajo condiciones capacitantes y no capacitantes ( $n = 10$  ratones). b. Suma de los valores medios de fluorescencia en espermatozoides con y sin reacción acrosómica ( $n = 16$  ratones). c. Fluorescencia media según la condición de capacitación espermática ( $n = 4-6$  ratones). ns = no significativo;  $p = 0,2$ , test de  $t$  pareado.

### Análisis ultraestructural de la pieza media espermática

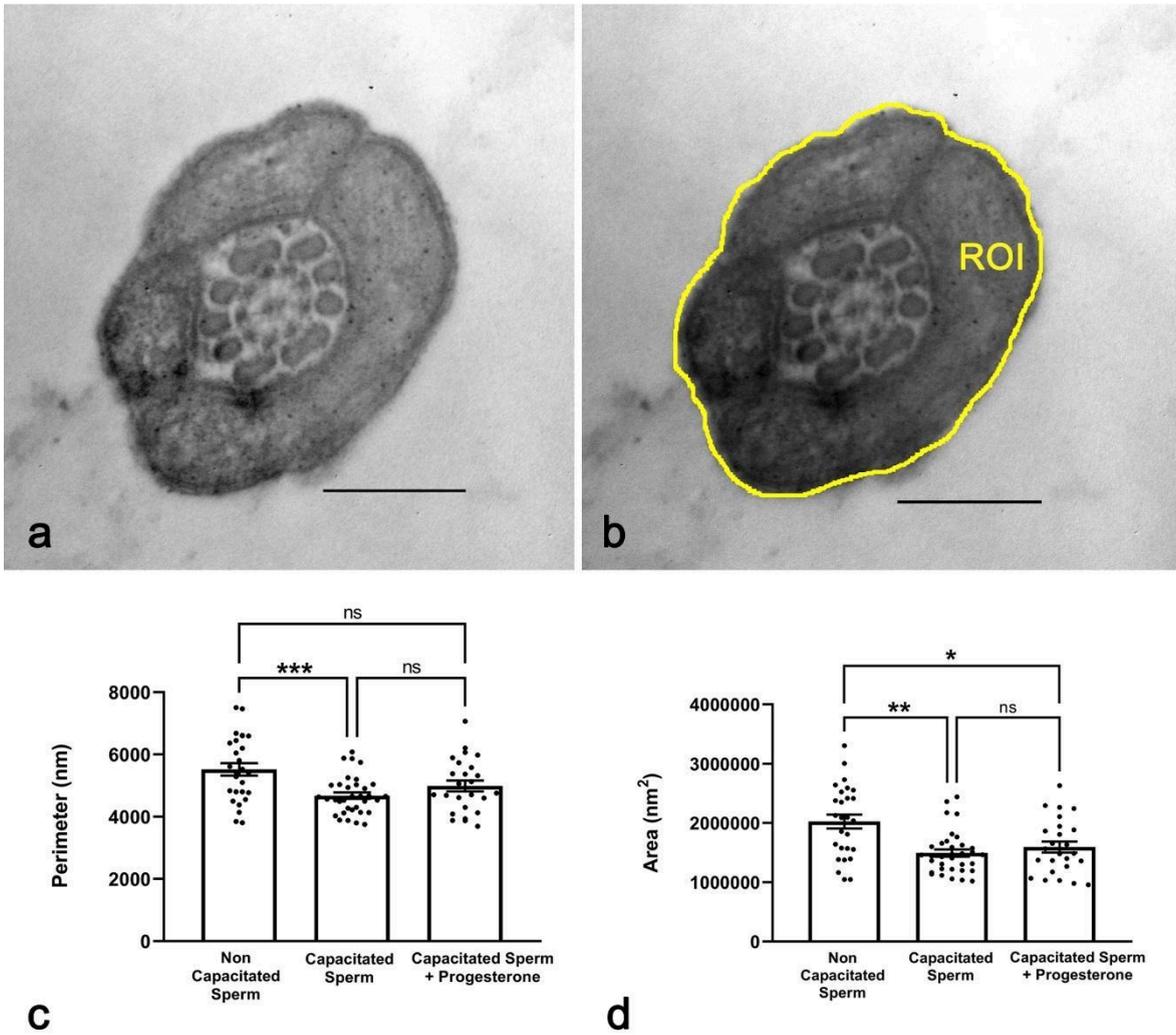
Para estudiar las características ultraestructurales de la pieza media y de las mitocondrias allí presentes, se analizaron imágenes de cortes transversales y longitudinales de la pieza media espermática en cada una de las condiciones ya planteadas (Figura 7). En la mayoría de las secciones analizadas, las mitocondrias eran regulares y estaban bien organizadas alrededor del axonema (Fig. 7a-d). En muchas de las secciones, las mitocondrias de los espermatozoides en condición capacitante se encontraban más próximas al axonema (Figura 7c) en comparación con la condición no capacitante (Figura 7a). Algunas secciones de la pieza media de espermatozoides tanto no capacitados como capacitados mostraron mitocondrias con zonas electrón lúcidas entre las membranas de las crestas mitocondriales (Figuras 7b y d).



**Figura 7. Análisis ultraestructural de la pieza media del espermatozoide.**

a. y b. Cortes transversales y longitudinales, respectivamente, de la pieza media de un espermatozoide no capacitado. Las mitocondrias están bien organizadas alrededor del axonema y las crestas mitocondriales están definidas. c. Pieza media de un espermatozoide capacitado. Las mitocondrias están condensadas alrededor del axonema. No se observa desorganización mitocondrial ni alteraciones ultraestructurales. d. Corte longitudinal de parte de la pieza media de un espermatozoide capacitado. La organización mitocondrial y las características ultraestructurales son similares a las observadas en espermatozoides no capacitados. m = mitocondrias, Ax = axonema. Barras de escala: 500 nm.

Como fuera descrito en el Capítulo 1, para realizar el análisis morfométrico de la pieza media espermática, se segmentó manualmente cada corte transversal de la misma y se definieron ROIs (Figura 8). Se obtuvieron descriptores de forma y tamaño, los cuales fueron analizados estadísticamente. El análisis cuantitativo ultraestructural de los descriptores de tamaño de la pieza media confirmó una disminución en el área y el perímetro de la PME de los espermatozoides capacitados. La media  $\pm$  desviación estándar del área y perímetro de la PME fue menor en los espermatozoides capacitados que en los no capacitados ( $1.494.687 \pm 360.867 \text{ nm}^2$ ,  $n = 48$  vs.  $2.026.211 \pm 607.794 \text{ nm}^2$ ,  $n = 39$ ,  $p < 0,0001$ ; y  $4678 \pm 603,8 \text{ nm}$ ,  $n = 48$  vs.  $5526 \pm 1042 \text{ nm}$ ,  $n = 39$ ,  $p = 0,0002$ ; ANOVA) (Figura 8c y d).



**Figura 8. Procesamiento de imágenes y análisis morfométrico de la pieza media espermática.** a–b Segmentación semiautomatizada de la pieza media espermática y generación de ROIs (amarillo). c y d Análisis estadístico de los parámetros morfométricos de la PME según la condición de capacitación. Barras: 500 nm. \* $p < 0.001$ , ns: no significativo; test de t.

### Objetivo 3

**Estudiar cambios morfométricos de las mitocondrias espermáticas en hombres fértiles e infértiles y su vinculación con la funcionalidad mitocondrial.**

### MATERIALES y MÉTODOS

Para cumplir con el objetivo 3 se llevaron a cabo los siguientes procedimientos.

#### **Población de estudio y recolección de las muestras humanas**

Se incluyeron en el estudio hombres que asistieron a la Clínica Andrológica (Fertilab) para pruebas de análisis del semen y a la Unidad de Reproducción Humana del Centro Hospitalario Pereira-Rossell (Montevideo, Uruguay) para evaluación de la fertilidad. Se seleccionaron aleatoriamente e incluyeron en el análisis morfométrico mediante microscopía de fluorescencia las muestras de 37 individuos provenientes de Fertilab. Para el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), se incluyeron las muestras de 12 individuos provenientes de la Unidad de Reproducción Humana del Centro Hospitalario Pereira-Rossell, las cuales fueron clasificadas según la capacidad de concepción de cada sujeto. Para clasificar a un hombre como infértil se consideraron los siguientes criterios de inclusión: una historia clínica con causa de infertilidad desconocida, un espermograma anormal y la ausencia de un factor femenino en la pareja. De los 7 hombres infértiles que fueron incluidos en el estudio, ninguno tenía hijos propios, y todos presentaban al menos dos espermogramas con morfología espermática anormal, según los criterios de la OMS [122]. Se excluyeron específicamente pacientes con varicocele, antecedentes de infecciones del tracto genital, trastornos endocrinos, control post-vasectomía o criptorquidia. No se identificaron antecedentes genéticos ni familiares de infertilidad masculina. También se descartaron posibles causas de infertilidad en sus parejas femeninas (trastornos ovulatorios, factores anatómicos o cervicales). Todos ellos fueron clasificados como portadores de infertilidad de causa masculina. Los 5 hombres fértiles incluidos en el estudio fueron seleccionados entre varones de edad similar, que habían tenido al menos un hijo y presentaban parámetros seminales normales al momento del estudio.

Las muestras de semen fueron recolectadas en la Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Antes de la recolección de las muestras, todos los participantes firmaron un formulario de consentimiento informado. El personal del laboratorio garantizó el anonimato de los participantes.

### **Análisis de rutina del semen**

Las muestras de semen fueron recolectadas por masturbación, tras tres días de abstinencia sexual, en recipientes descartables, estériles. Fueron entregadas al laboratorio inmediatamente después de la eyaculación. El semen se dejó reposar en una estufa de laboratorio (Heratherm™ General Protocol, Thermo Scientific™, Massachusetts, EE. UU.) a 37 °C durante 30 minutos. Tras la licuefacción, se analizaron el volumen, la viabilidad, el pH y la morfología normal del semen de acuerdo con las pautas establecidas por la OMS [122], [139]. Para el análisis microscópico, se cargaron dos cámaras de conteo espermático CELL-VU® (Millennium Sciences, Inc., Nueva York, Estados Unidos) con cada muestra de semen. Se examinaron aleatoriamente diez campos diferentes por cámara (moviendo la platina del microscopio de arriba hacia abajo y luego hacia la derecha, evitando observar el mismo campo óptico) utilizando un microscopio Nikon con platina termostaticada a 37 °C. Los parámetros de concentración y motilidad fueron analizados mediante un analizador automático SCA-Microoptics (CASA) (Barcelona, España), con los ajustes estándar según los criterios de la OMS [122], [139].

Para evaluar la morfología espermática, se realizaron extendidos de semen teñidos mediante el método de Shorr (IVD: Dispositivo Médico de Diagnóstico In Vitro, Merck KGaA, Alemania) y se observaron con un microscopio de campo claro Nikon ECLIPSE E200 a 1000x (con aceite de inmersión). Se observaron y analizaron al menos 200 espermatozoides consecutivos por muestra. La evaluación morfológica se realizó en varias áreas del portaobjeto, seleccionadas sistemáticamente, desplazando la platina hacia arriba, hacia la derecha y luego hacia abajo (en guarda griega), enfocando así diferentes campos microscópicos.

Siguiendo los criterios morfológicos de la OMS [122], [139], se evaluaron y registraron todos los espermatozoides normales, y se anotaron los defectos de la cabeza, de la pieza media-cuello y de la cola de los espermatozoides anormales. Las muestras fueron descartadas

si presentaban leucocitospermia [122], [139]. Los cultivos espermáticos resultaron negativos para microorganismos.

### **Evaluación de la morfología de la pieza media espermática mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal**

Después de la licuefacción, alícuotas de las 37 muestras de semen fueron centrifugadas a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante. Los espermatozoides se resuspendieron en medio BWW (Biggers-Whitten-Whittingham) y se incubaron con 50 nM de MitoTracker®Red CMXRos - M7512 - (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) a 37 °C durante 30 minutos en una incubadora digital de laboratorio, modelo Heratherm IMC-18 de Thermo Scientific. Luego, los espermatozoides fueron extendidos sobre un portaobjeto de vidrio y fijados en una solución mixta de paraformaldehído al 4% p/v en buffer fosfato (PB) 0.1 M durante 30 minutos, y lavados cuidadosamente con buffer fosfato salino (PBS). Los núcleos espermáticos fueron contrateñidos con DAPI (4',6-diamidino-2'-fenilindol dihidrocloruro).

Tras el montaje de los portaobjetos, las muestras fueron observadas con un microscopio confocal espectral Leica, modelo TCS SP5 II, y un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 con objetivo de inmersión en aceite 100X, 1.4 NA (excitación:  $\lambda = 488$  nm y  $\lambda = 543$  nm). Se tomaron y procesaron varias imágenes fotográficas digitales de los espermatozoides de cada individuo.

### **Separación de espermatozoides apoptóticos y no apoptóticos**

Con el fin de obtener fracciones separadas de espermatozoides apoptóticos y no apoptóticos, muestras de semen fueron procesadas mediante separación celular activada por columnas magnéticas (MACS, por sus siglas en inglés), un método conocido de selección espermática. En resumen, primero se realizó un procedimiento de *swim-up* en medio de lavado espermático PureCeption™ (SAGE In Vitro Fertilization, Inc., California, EE. UU.). Una alícuota del esperma seleccionado por *swim-up* fue centrifugada, incubada con microesferas conjugadas con Anexina V (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y procesada mediante MACS según las indicaciones del fabricante (Miltenyi Biotec) y el procedimiento descrito por Grunewald y Paasch [206]. Se recolectaron las células no marcadas que fluyeron a través de la columna (fracción no apoptótica). Luego, se eliminó el campo magnético y se obtuvieron las células espermáticas retenidas magnéticamente, conjugadas con Anexina V

(fracción de células apoptóticas). El test de dispersión de la cromatina espermática se realizó en ambas fracciones según el método de Fernández et al. [207]. Una alícuota de cada fracción fue fijada y procesada para su análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

### **Evaluación ultraestructural de la morfología mitocondrial espermática mediante microscopía electrónica de transmisión**

Se procesaron muestras de semen de cinco hombres fértiles (grupo control) y siete pacientes infértiles para su análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Tras la licuefacción, cada muestra fue centrifugada a 400 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet espermático resultante se fijó en una solución de paraformaldehído al 4% (p/v) en buffer fosfato (PB) 0.1 M (pH 7.4) conteniendo glutaraldehído al 2.5% (v/v), a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se lavaron con PB (pH 7.4), se post-fijaron en tetróxido de osmio al 1% (p/v) durante una hora, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y acetona, y se incluyeron en Araldita. La polimerización se llevó a cabo a 58–60 °C durante 48 horas. Luego de la polimerización se obtuvieron cortes con un ultramicrotomo RMC MT-X equipado con una cuchilla de diamante DIATOME. Secciones semifinas (500 nm) fueron teñidas con azul de toluidina al 1% (p/v) y examinadas con un microscopio óptico Nikon ECLIPSE E200. Las secciones ultrafinas adyacentes (50–70 nm) fueron teñidas con acetato de uranilo, seguido de citrato de plomo, y examinadas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 operado a 80 kV.

Como se mencionara previamente, por cada muestra, se capturaron imágenes digitales de al menos 100 secciones a nivel de la pieza media espermática, incluyendo vistas longitudinales (pasando por el eje medio del axonema) y transversales. Las imágenes fueron adquiridas y procesadas mediante una cámara digital Hamamatsu C-4742-95 para obtener datos cualitativos y cuantitativos de la morfología mitocondrial.

### **Evaluación de la morfología de la pieza media espermática mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal luego del tratamiento con drogas mitocondriales**

Por último, nos propusimos analizar las características morfométricas de la PME luego de alterar la función mitocondrial a través del uso de drogas mitocondriales. Para ello

incluimos en el estudio los espermatozoides provenientes del semen de 12 individuos derivados de la clínica andrológica. Luego del análisis de los parámetros espermáticos de cada muestra (recuento y motilidad) se analizaron las PME de los espermatozoides en condiciones control y luego del tratamiento con drogas mitocondriales. Se centrifugaron alícuotas de las muestras a 300 g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y los espermatozoides fueron resuspendidos en medio BWW, separándose tres fracciones: una control, otra a la cual se agregó Antimicina A (un inhibidor del complejo III y de la formación del gradiente de protones de la membrana mitocondrial interna) a una concentración de 2,5  $\mu\text{M}$  y una tercer fracción, la cual se trató con FCCP (un desacoplante de la cadena respiratoria) 5  $\mu\text{M}$ . Conjuntamente, cada una de las fracciones mencionadas se incubó con la sonda MitoTracker Red que difunde pasivamente a través de la membrana plasmática y se acumula en la mitocondria activa. Luego de 30 minutos, se realizaron extendidos fijados con paraformaldehído al 4% y contrateñidos con 4',6-diamidina-2-fenilindole (DAPI) para la visualización de los núcleos espermáticos. Los preparados obtenidos fueron observados con un microscopio epifluorescente Nikon Eclipse E400, mientras que algunas de las muestras fueron también analizadas mediante microscopía confocal (SL – Leica). Se obtuvieron imágenes de aproximadamente 20 campos diferentes por cada muestra y por cada condición, con un promedio de 3 espermatozoides por campo. Se analizaron un total de al menos 100 espermatozoides por cada condición. Para el análisis y procesamiento de las imágenes se utilizó el mismo algoritmo mencionado previamente para el análisis de la PME de espermatozoides humanos.

### **Evaluación de la ultraestructura mitocondrial luego del tratamiento con drogas mitocondriales**

Siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior, la muestra normozoospermica de un individuo proveniente de la misma clínica andrológica, fue sometida al tratamiento con AA 2,5  $\mu\text{M}$  y FCCP 5  $\mu\text{M}$ . Las muestras tratadas con AA y FCCP al igual que la fracción control de las mismas (OH 100°) fueron procesadas bajo el protocolo de rutina para microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes obtenidas tanto para la fracción control como para las fracciones tratadas con AA y FCCP se analizaron en forma semiautomatizada de la misma manera en que se describió previamente. Se registraron y analizaron entre 15 y 20 imágenes de la PME en secciones longitudinales y transversales y se obtuvieron medidas morfométricas de más de 100 mitocondrias en cada condición experimental.

## **Procesamiento de imágenes**

En el capítulo 1 de la tesis se describió detalladamente el procesamiento de las imágenes obtenidas tanto por microscopía de fluorescencia como por MET.

## **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism, versión 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Los datos se expresaron como medias aritméticas y su correspondiente desviación estándar. La distribución normal de los datos se evaluó mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Se realizó un análisis de regresión lineal entre los datos morfométricos y la morfología espermática. Las comparaciones entre medias se efectuaron utilizando la prueba t de Student o la prueba de Mann-Whitney, dependiendo de la distribución normal de los datos (dos grupos). Las hipótesis se contrastaron en dos colas, y se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p$  menor a 0.05. El análisis morfométrico de las mitocondrias de las PME frente al tratamiento con drogas mitocondriales, se realizó mediante el test de ANOVA, aceptándose como significativo un  $p < 0.05$ . Para el estudio ultraestructural, dado que los datos no siguieron una distribución normal, se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

# **RESULTADOS**

## **Datos clínicos y análisis del semen**

Se incluyeron en el estudio un total de 49 hombres entre 21 y 50 años de edad. De ellos, 25 presentaban normozoospermia y 24 mostraban parámetros seminales anormales, incluyendo astenozoospermia (n=2), teratozoospermia (n=4), oligozoospermia (n=6), oligo-astenozoospermia (n=1), terato-astenozoospermia (n=2), oligo-terato-astenozoospermia (n=5) y oligo-teratozoospermia (n=4).

La edad de los participantes y las características seminales observadas en el estudio morfométrico mediante microscopía de fluorescencia se presentan en la Tabla 1. La edad y las características seminales de los cinco hombres fértiles y siete hombres infértiles analizadas mediante MET se muestran en la Tabla 2. Los datos de la estadística descriptiva

(media, desvío estándar, mediana, mínimo y máximo) de la concentración espermática, motilidad progresiva y morfología espermática normal, para los participantes en ambos experimentos, se reportan también en las Tablas 1 y 2.

<b>Parameter</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Median</b>	<b>Max</b>	<b>Min</b>	<b>Lower reference value (WHO, 2021)</b>
Subject age (yr)	35.4	5.8	36.0	50.0	21.0	/
Sperm concentration (million/ml)	45.5	38.4	35.0	159.0	1.6	16.0
Progressive Motility (a+b) (%)	47.5	20.3	52.0	82.0	3.0	30.0
Normal Sperm Morphology (%)	6.6	3.4	7.0	15.0	0.0	4.0
Alterations of the sperm head (%)	34.9	11.4	35.0	60.0	16.0	/
Alterations of the sperm midpiece (%)	1.9	1.4	2.0	5.0	0.0	/
Alterations of the sperm principal piece (%)	2.7	2.1	3.0	8.0	0.0	/

**Tabla 1. Edad y características descriptivas de los parámetros espermáticos de los sujetos estudiados mediante microscopía de epifluorescencia.** Los datos fueron obtenidos mediante el análisis del primer espermograma de 37 individuos que asistieron a la clínica de andrología. DE = desvío estándar, Máx = valor máximo, Mín = valor mínimo.

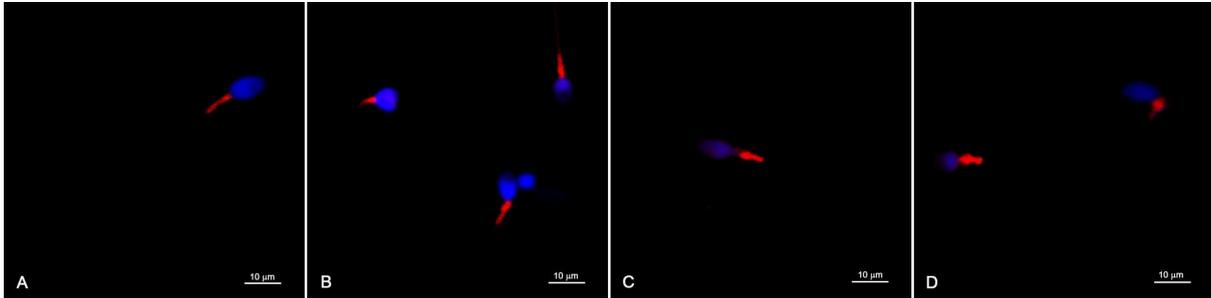
<b>Parameter</b>	<b>Fertile Men</b>					<b>Infertile Men</b>					<b>Lower reference value (WHO, 2021)</b>
	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Median</b>	<b>Max</b>	<b>Min</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Median</b>	<b>Max</b>	<b>Min</b>	
Men age (yr)	42.2	2.3	43.0	44.0	38.0	34.7	4.8	35.0	44.0	29.0	/
Sperm concentration (million/ml)	76.2	56.1	71.0	147.0	12.0	71.2	97.1	21.3	214.0	6.9	16.0
Progressive Motility (a+b) (%)	58.0	14.6	63.0	71.0	35.0	50.3	23.8	54.0	74.0	13.0	30.0
Normal Sperm Morphology (%)	20.4	5.6	21.0	28.0	14.0	2.9	1.9	2.0	7.0	1.0	4.0

**Tabla 2. Edad y características descriptivas de los parámetros seminales de hombres fértiles e infértiles analizados mediante TEM.** Los datos fueron obtenidos mediante el análisis del primer espermograma de 12 individuos que asistieron a la clínica de andrología para valoración de fertilidad. DE = desvío estándar, Máx = valor máximo, Mín = valor mínimo, LRV (por sus siglas en inglés) = valor menor dentro del rango de valores de referencia según la OMS.

## **Análisis de la pieza media espermática mediante microscopía confocal y microscopía de epifluorescencia**

Se observó una gran heterogeneidad en las características morfológicas y en las dimensiones de las piezas medias de los espermatozoides. La mayoría de las piezas medias espermáticas fueron marcadas con MitoTracker™, y la fluorescencia roja se confinó específicamente a esta región del espermatozoide (Figura 1). Se observaron diferentes patrones de marcado, lo que indica una gran heterogeneidad en la morfometría de la pieza media de los espermatozoides humanos, así como posibles diferencias en la organización mitocondrial. También pueden

apreciarse detalles en la distribución de la fluorescencia roja dentro de la pieza media espermática, evidenciándose como un puntillado más o menos fluorescente dentro de la misma (Figura 1A-D).



**Figura 1. Imágenes representativas de espermatozoides marcados con MitoTracker™ y observados mediante microscopía confocal. (A-D).** La marcación fluorescente roja está confinada a la pieza media del espermatozoide y se observan diferentes patrones de marcación. La cabeza espermática y la cromatina nuclear se observan marcadas en azul.

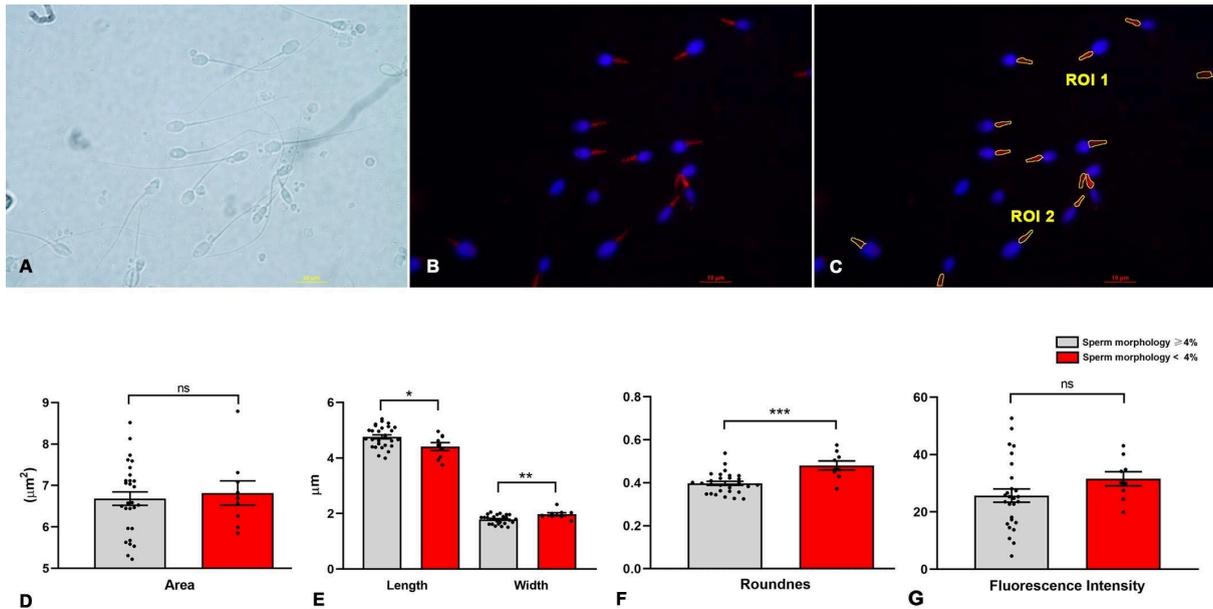
### **Análisis morfométrico de las piezas medias espermáticas**

Basándonos en los scripts descritos en el capítulo 1 de la tesis, logramos detectar automáticamente las áreas marcadas con MitoTracker™, segmentarlas y generar ROIs, a partir de las cuales determinamos las características morfométricas de las piezas medias espermáticas (Figura 2).

Primero, verificamos manualmente que el MitoTracker™ marcaba específicamente la pieza media, permitiendo una identificación precisa de la región ocupada por las mitocondrias a lo largo del flagelo espermático (Figuras 2A–C). Posteriormente, evaluamos la relación entre la morfología espermática convencional (criterios estrictos según la OMS) y las medidas morfométricas obtenidas mediante nuestro script (Figura 2). El análisis de regresión lineal no reveló una asociación significativa entre la media del área ( $R^2 = 0.013$ ,  $p = 0.5$ ) ni entre la media de la intensidad de fluorescencia ( $R^2 = 0.025$ ,  $p = 0.4$ ) de las ROIs en las muestras de los 37 sujetos analizados. Sin embargo, se observaron correlaciones negativas entre el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y la redondez ( $R^2 = 0.37$ ,  $p = 0.0001$ ), longitud ( $R^2 = 0.14$ ,  $p = 0.03$ ) y ancho ( $R^2 = 0.27$ ,  $p = 0.001$ ) de la pieza media espermática.

Las muestras se agruparon además según la morfología espermática, utilizando los criterios estrictos de la OMS y un punto de corte del 4%. Se incluyeron 28 muestras con morfología normal  $\geq 4\%$  y 9 muestras con morfología normal  $< 4\%$ . No se observaron diferencias en el

área de la pieza media entre los grupos ( $6.68 \pm 0.86$  vs.  $6.82 \pm 0.88 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0.68$ ; Figura 2D). Sin embargo, las muestras con morfología normal  $<4\%$  presentaron piezas medias más anchas y redondeadas (ancho:  $1.97 \pm 0.16$  vs.  $1.79 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ,  $p = 0.0042$ ; redondez:  $0.48 \pm 0.06$  vs.  $0.40 \pm 0.05$ ,  $p = 0.0002$ ), además de menor longitud ( $4.4 \pm 0.42$  vs.  $4.8 \pm 0.38 \mu\text{m}$ ,  $p = 0.026$ ; Figura 2E–F). No se encontraron diferencias en la circularidad, solidez o intensidad de fluorescencia ( $31.6 \pm 7.3$  vs.  $25.7 \pm 12.2$ ;  $p = 0.18$ ; Figura 2G).

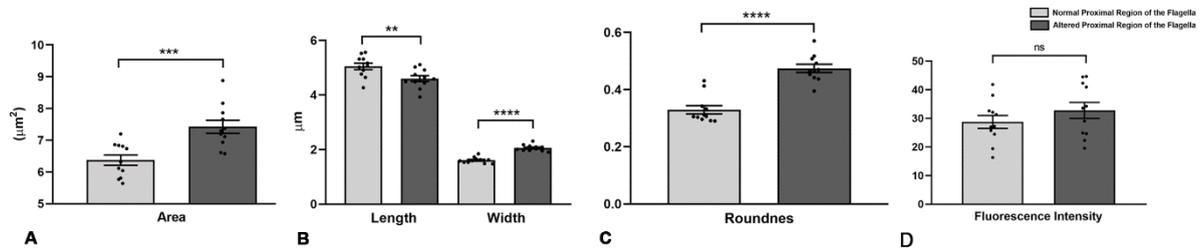


**Figura 2. Procesamiento de imágenes y análisis morfométrico de la pieza media del espermatozoide según la morfología espermática.** (A) Campo claro. (B) Piezas medias de los espermatozoides marcadas en rojo con MitoTracker™, el núcleo se marca en azul. (C) Segmentación de la pieza media del espermatozoide y determinación de la Región de Interés (ROI). (D–G) Parámetros morfométricos de la pieza media comparados según la morfología espermática ( $<$  o  $\geq 4\%$ ) ( $n = 9$  y  $n = 28$ , respectivamente) según criterios de la OMS. Test de t – \* $p < 0,05$ .

Para profundizar en el estudio de la morfología de la pieza media, clasificamos manualmente, y en base a las imágenes de contraste de fase, los espermatozoides de once sujetos (7 normozoospermicos y 4 teratozoospermicos) según presentaran una región proximal del flagelo normal (NPF = normal proximal flagella por sus siglas en inglés) o alterada (APF = altered proximal flagella por sus siglas en inglés) (Figura 3). Para dicha clasificación nos basamos en los criterios establecidos por la OMS como determinantes de malformaciones del cuello y de la pieza media espermática [122], [139]. Para cada sujeto, se analizaron entre 50 y 100 imágenes de espermatozoides.

Los espermatozoides con APF mostraron un aumento del área de la pieza media ( $7.42 \pm 0.69$  vs.  $6.37 \pm 0.53 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0.0007$ ), del ancho ( $2.06 \pm 0.12$  vs.  $1.61 \pm 0.11 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.0001$ ) y de

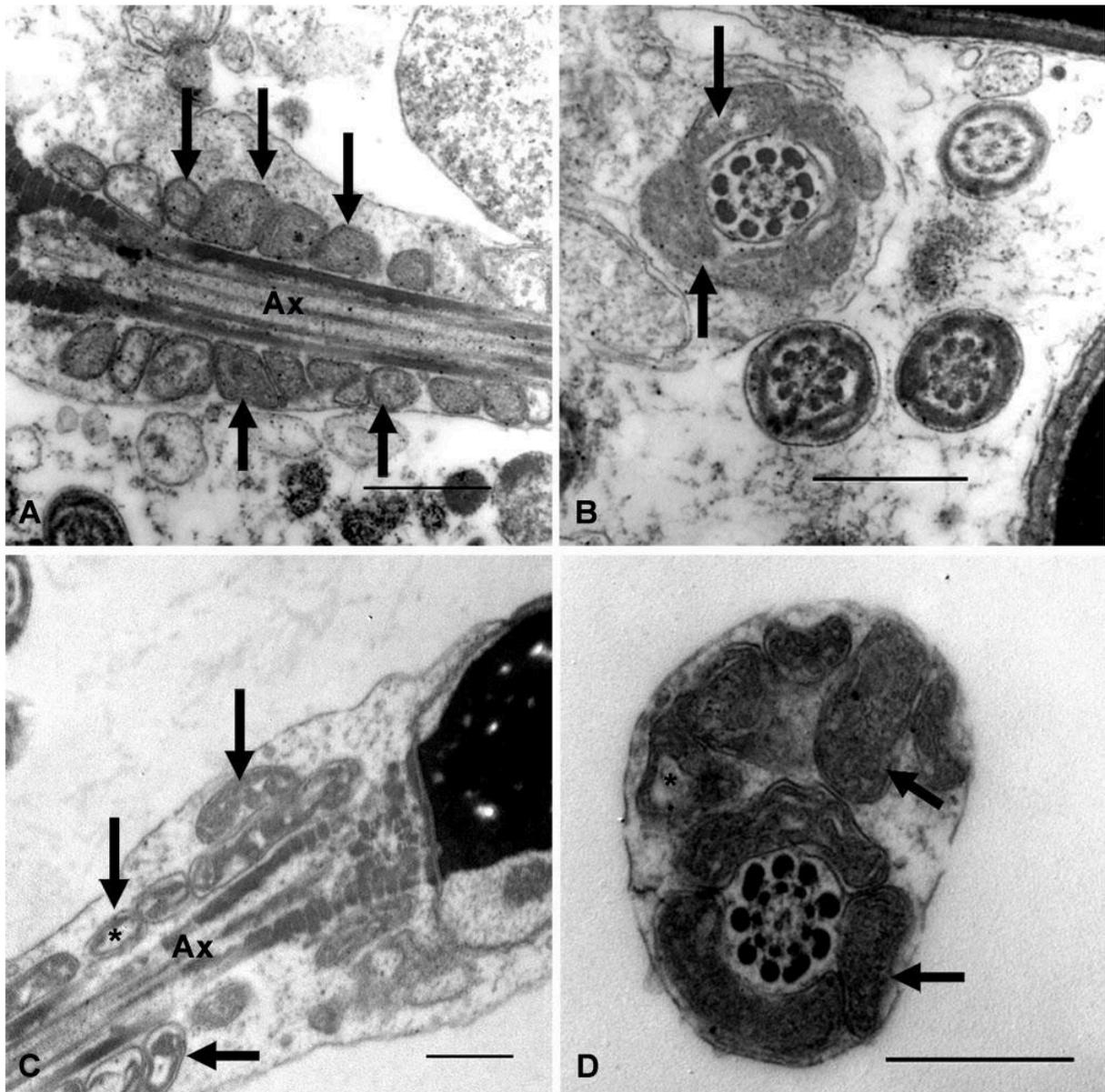
la redondez ( $0.47 \pm 0.05$  vs.  $0.33 \pm 0.005$ ,  $p < 0.0001$ ), así como una disminución de la longitud ( $4.60 \pm 0.35$  vs.  $5.05 \pm 0.39 \mu\text{m}$ ,  $p = 0.0097$ ; Figuras 3A–C). No se observaron diferencias en la circularidad, solidez ni en la intensidad media de fluorescencia ( $32.8 \pm 9.3$  vs.  $28.7 \pm 7.5$ ;  $p = 0.28$ ; Figura 3D).



**Figura 3. Análisis morfométrico de las piezas medias de espermatozoides humanos según la morfología de la región proximal del flagelo espermático.** (A-D) Descriptores morfométricos de la pieza media en función de la morfología normal o alterada de la región proximal del flagelo espermático.  $n = 11$  (7 muestras normozoospermicas y 4 muestras teratozoospermicas, de acuerdo con los criterios de la OMS). Test de t - \* $p < 0.05$ .

### **Análisis de la pieza media espermática mediante microscopía electrónica de transmisión**

El análisis ultraestructural reveló que en algunas de las secciones de la PME analizadas, las mitocondrias presentaban formas redondeadas, regulares y bien organizadas alrededor del axonema. Sus crestas eran fácilmente reconocibles, y se podía observar claramente la separación regular entre las membranas mitocondriales interna y externa (Figuras 4A-B). En otras secciones, estos orgánulos mostraban perfiles anormales con formas irregulares, una disposición desorganizada alrededor del axonema y amplias áreas electrón lúcidas en la matriz mitocondrial que frecuentemente impedían o distorsionaban la visualización de las crestas mitocondriales (Figuras 4C-D). Si bien se observaron perfiles mitocondriales normales (Figuras 4A-B) y alterados (Figuras 4C-D) tanto en hombres fértiles como infértiles, este último grupo presentó la mayor proporción de formas anormales.



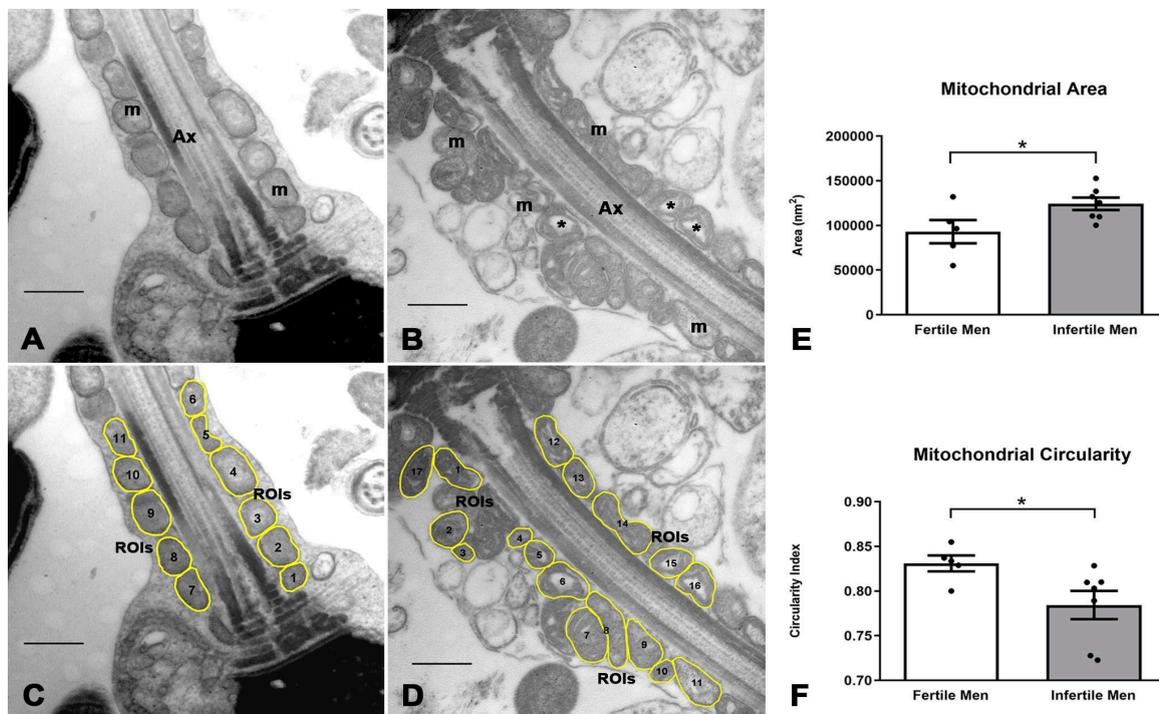
**Figura 4. Características ultraestructurales de la pieza media del espermatozoide en hombres fértiles e infértiles.** Se observan diferentes patrones de organización y morfología mitocondrial (flechas). Las mitocondrias en (A) y (B) son más pequeñas, con perfiles más homogéneos y dispuestas de manera regular alrededor del axonema. En (C) y (D) se evidencia una desorganización mitocondrial en torno al axonema, con mitocondrias dilatadas y de forma irregular. Los espacios claros entre las membranas mitocondriales (\*) podrían sugerir edema o hinchazón mitocondrial. Ax = axonema. Barras = 500 nm.

### **Análisis morfométrico ultraestructural**

Para realizar el análisis morfométrico ultraestructural, nos basamos en el reconocimiento en forma semiautomática de las mitocondrias de la pieza media del espermatozoide y generamos descriptores de imagen. La segmentación se realizó manualmente y se definieron las regiones de interés (Figura 5A-D). Los descriptores de forma y tamaño fueron determinados siguiendo

el algoritmo que se describe en el capítulo 1 de la tesis (Figura 5E-F). Para el estudio morfométrico, se analizaron únicamente las mitocondrias presentes en cortes longitudinales que atravesaban el eje central del axonema (casi 100 secciones y un total de aproximadamente 1000 mitocondrias por sujeto).

El análisis cuantitativo de las características morfométricas observadas confirmó un aumento en el tamaño y la heterogeneidad mitocondrial en los hombres infértiles. La media  $\pm$  DE del área mitocondrial fue menor en los hombres fértiles en comparación con los infértiles ( $93.085 \pm 28.907$  vs.  $124.191 \pm 18.471$  nm<sup>2</sup>,  $p = 0.045$ ) (Figura 5E), mientras que la media  $\pm$  DE de la circularidad mitocondrial fue mayor en los hombres fértiles ( $0.83 \pm 0.02$  vs.  $0.78 \pm 0.04$ ,  $p = 0.046$ ) (Figura 5F). No se observaron diferencias en otros parámetros morfológicos mitocondriales (perímetro, mean gray value, coordenada X).



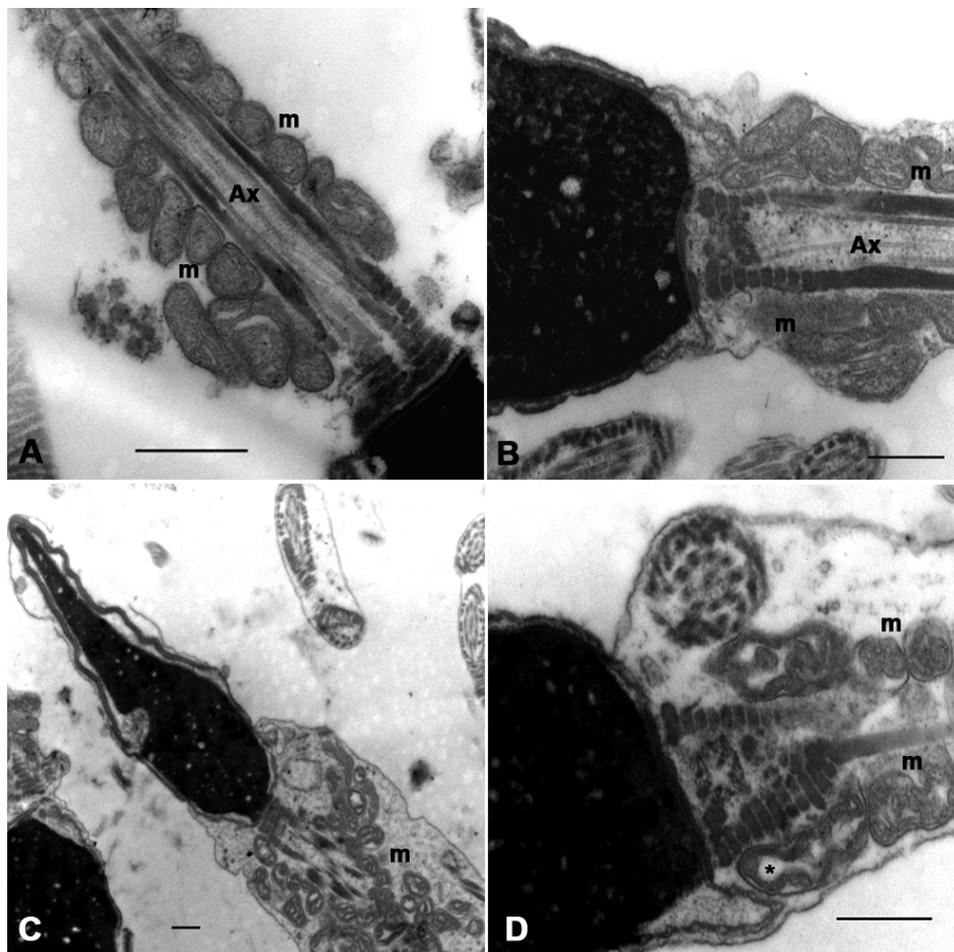
**Figura 5. Procesamiento de imágenes y análisis morfométrico de las mitocondrias en la pieza media espermática de hombres fértiles e infértiles.** (A) y (B): características ultraestructurales de las mitocondrias en hombres fértiles e infértiles, respectivamente. (C) y (D): segmentación de la mitocondria en la pieza media del espermatozoide (línea amarilla) y determinación de las regiones de interés (ROIs). (E-F): análisis cuantitativo de los descriptores morfométricos.  $n=5$  hombres fértiles y  $n=7$  hombres infértiles. Test de t -  $*p<0.05$ . Barras = 500 nm. m = mitocondria, Ax = axonema, \* = dilatación de la matriz mitocondrial.

### Morfología mitocondrial en espermatozoides apoptóticos

Nos propusimos analizar los cambios morfológicos en las mitocondrias de los espermatozoides sometidos a un método de selección espermática (separación celular

activada magnéticamente – MACS) que permite separar espermatozoides apoptóticos y no apoptóticos. A través de las herramientas que se describen en el capítulo 1 de la tesis logramos analizar y cuantificar dichos cambios morfológicos.

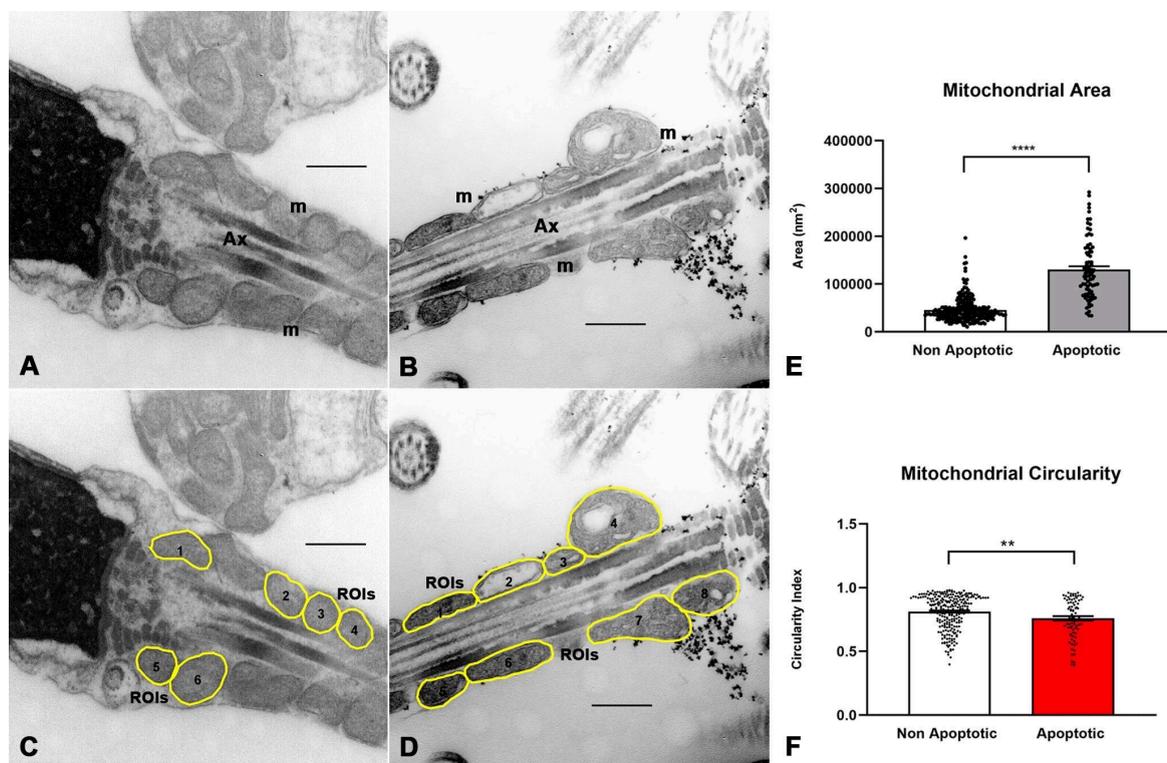
El semen de cinco hombres infértiles, con un recuento total de espermatozoides superior a 20 millones (cantidad suficiente para poder realizar microscopia electrónica de transmisión), morfología espermática normal entre 1–7% y fragmentación del ADN espermático, medida mediante el ensayo de dispersión de la cromatina espermática (SCD), superior al 16%, fue sometido al método de separación espermática mencionado, basado en el uso de columnas de anexina V. El análisis ultraestructural de estos espermatozoides apoptóticos y no apoptóticos se muestra en la Figura 6.



**Figura 6. Morfología mitocondrial en espermatozoides sometidos a separación celular magnética (MACS).** En los espermatozoides no apoptóticos (A) y (B), las mitocondrias (m) están dispuestas alrededor del axonema (Ax) y no presentan alteraciones marcadas en la organización de las membranas internas. En los espermatozoides apoptóticos (C) y (D), se observan mitocondrias (m) dispersas y de aspecto edematizado, heterogéneas en forma y tamaño, con dilataciones marcadas entre las membranas mitocondriales (\*). Barras: 500 nm.

Se observaron cambios similares a los descritos anteriormente. En los espermatozoides no apoptóticos, las mitocondrias estaban principalmente dispuestas alrededor del axonema y presentaban forma y tamaño homogéneos (Figura 6 A-B). En los espermatozoides apoptóticos, las mitocondrias aparecían mayormente desorganizadas alrededor del axonema y eran más grandes y heterogéneas que en los espermatozoides no apoptóticos (Figura 6 C-D). Se observaron con mayor frecuencia dilataciones marcadas o espacios claros entre las membranas mitocondriales (Figura 6D).

El análisis morfométrico de las regiones de interés (ROIs) determinadas manualmente se presenta en la Figura 7. La media  $\pm$  DE del área mitocondrial fue menor en los espermatozoides no apoptóticos en comparación con los apoptóticos ( $45.651 \pm 25.334$  vs.  $130.228 \pm 62.117$  nm<sup>2</sup>,  $p < 0.0001$ ,  $n = 251/82$ ) (Figura 7E), mientras que la media  $\pm$  D de la circularidad mitocondrial fue mayor en los espermatozoides no apoptóticos ( $0.81 \pm 0.13$  vs.  $0.76 \pm 0.15$ ,  $p = 0.005$ ,  $n = 251/82$ ) (Figura 7F), lo cual es consistente con las diferencias ultraestructurales descritas previamente entre varones fértiles e infértiles. No se encontraron diferencias en otros descriptores morfométricos (mean gray value).



**Figura 7. Procesamiento de imágenes y análisis morfométrico de las mitocondrias de la pieza media espermática en espermatozoides no apoptóticos y apoptóticos. (A) y (B): características ultraestructurales de las mitocondrias en espermatozoides no apoptóticos y apoptóticos, respectivamente. (C) y (D): segmentación de**

las mitocondrias en la pieza media del espermatozoide y determinación de las regiones de interés (ROIs). (E-F): análisis cuantitativo de los descriptores morfométricos. Prueba de Mann-Whitney, n=251 espermatozoides no apoptóticos y n=82 espermatozoides apoptóticos.  $p < 0.05$ . Barras: 500 nm. m = mitocondrias, Ax = axonema.

### **Análisis de la pieza media espermática mediante microscopía confocal y microscopía de epifluorescencia luego del tratamiento con drogas mitocondriales**

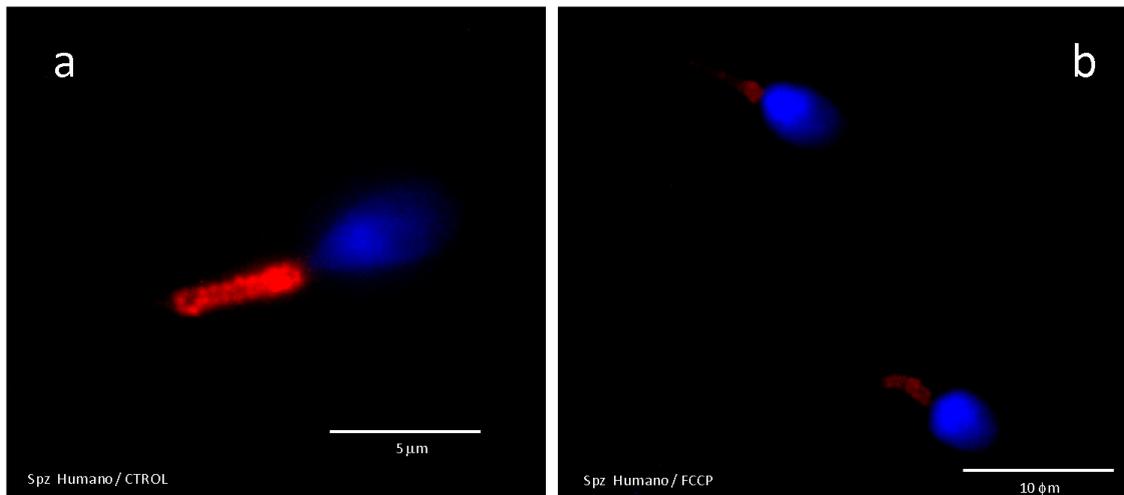
Se estudiaron las muestras de semen de 12 sujetos entre 22 y 45 años de edad. El análisis de los parámetros seminales permitió identificar 7 individuos normozoospermicos (con parámetros seminales normales) y 5 individuos con alteraciones en el espermograma (3 oligoastenoteratozoospermicos, 1 oligoastenozoospermico y 1 astenozoospermico) según los puntos de corte establecidos por la OMS [122], [139], como se muestra en la Tabla 3.

Paciente	Edad (años)	PARÁMETROS SEMINALES			Diagnóstico
		Concentración spz (n/ml)	Motilidad progresiva	Morfología %	
1	25	72000000	69	9	NZ
2	41	600000	4	0	OATZ
3	45	15800000	49	10	NZ
4	44	26000000	65	14	NZ
5	39	1400000	3	0	OATZ
6	33	85000000	73	14	NZ
7	33	4900000	20	14	OAZ
8	35	62850000	80	8	NZ
9	39	34000000	24	6	AZ
10	32	110000000	85	10	NZ
11	22	40000000	76	7	NZ
12	42	1400000	30	3	OATZ

**Tabla 3. Edad y características descriptivas de los parámetros seminales de los sujetos cuyos espermatozoides fueron tratados con drogas mitocondriales y analizados mediante microscopía de fluorescencia.** Los datos fueron obtenidos mediante el análisis del primer espermiograma de 12 individuos cuyas muestras se obtuvieron a partir de la clínica Andrológica donde concurrieron para valoración de fertilidad. NZ = normozoospermico, OATZ = oligoastenoteratozoospermico, OAZ = oligoastenozoospermico, AZ = astenozoospermico, según valores de referencia propuestos por la OMS [139].

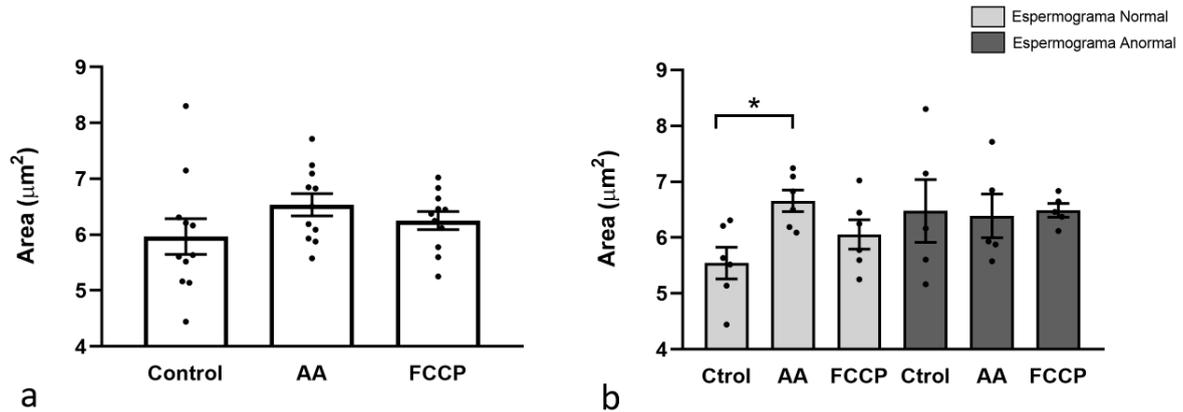
El análisis de los espermatozoides, mediante microscopía de fluorescencia, luego del tratamiento con drogas mitocondriales, mostró la marca fluorescente roja nuevamente confinada a la pieza media espermática en las imágenes analizadas. Si bien dicha marca reveló una gran heterogeneidad tanto en la morfología como en las dimensiones de la PME, no se identificaron patrones de marcado repetitivos vinculados al tratamiento con las drogas mitocondriales, ni una diferencia sistemática en la distribución de la fluorescencia roja dentro de la PME. No obstante, las PME de los espermatozoides tratados con FCCP

mostraron una marcada disminución en la intensidad de fluorescencia (Figura 8b) en relación a la fracción control.



**Figura 8.** Imágenes representativas de espermatozoides marcados con MitoTracker™ y observados mediante microscopía confocal, luego del tratamiento con drogas mitocondriales. (a-b) La marca fluorescente roja está confinada a la pieza media del espermatozoide y se observan diferentes patrones de marcado. (b) Se evidencia una disminución en la intensidad de fluorescencia roja luego del tratamiento con FCCP. La cabeza espermática y la cromatina nuclear se observan marcadas en azul.

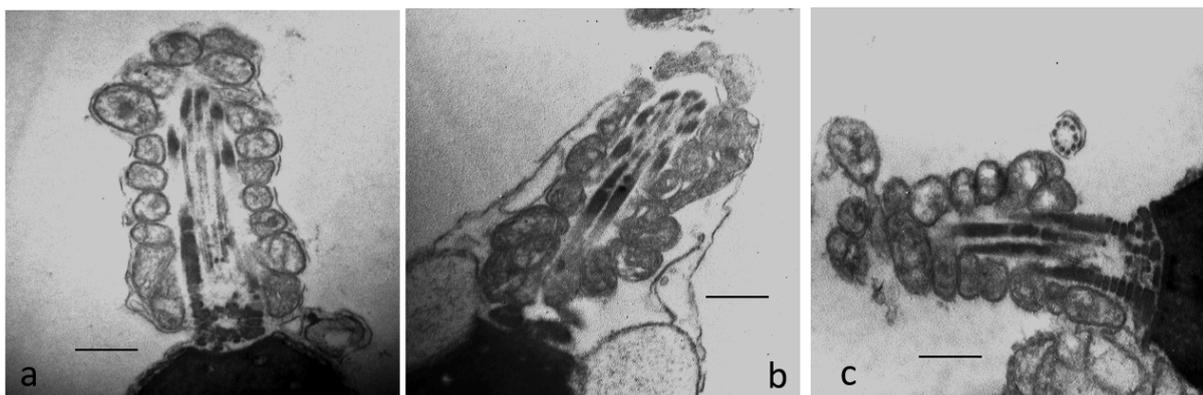
Dado que los experimentos realizados anteriormente habían revelado cambios fundamentalmente en los parámetros morfométricos descriptores de tamaño de la PME fuimos a buscar ahora cambios en el área de la región ocupada por las mitocondrias en la cola espermática, luego del tratamiento con drogas mitocondriales (Figura 9). Dicho análisis morfométrico no reveló cambios en el área de la PME, luego del tratamiento con drogas mitocondriales, cuando se estudiaron todos los sujetos en conjunto (Figura 9a) (control  $5.97 \pm 1.06$  vs AA  $6.54 \pm 0.67$  vs FCCP  $6.25 \pm 0.53$ ;  $n=11$ , ANOVA,  $p<0.05$ ). Sin embargo, el análisis por separado de las PME en los sujetos con y sin alteraciones en el espermograma, mostró un aumento del área de la PME en los individuos normozoospermicos luego del tratamiento con Antimicina A en relación al área de la PME en individuos normozoospermicos sin tratamiento o control (control  $5.54 \pm 0.69$  vs AA  $6.66 \pm 0.48$  vs FCCP  $6.06 \pm 0.64$ ;  $n = 6$ , ANOVA,  $p<0.05$ ), Figura 9b. No se encontraron diferencias en el área de la PME luego del tratamiento con drogas mitocondriales en los individuos con alteraciones en los parámetros del espermograma (control  $6.48 \pm 1.26$  vs AA  $6.39 \pm 0.88$  vs FCCP  $6.49 \pm 0.27$ ;  $n = 5$ , ANOVA,  $p>0.05$ ) Figura 9b.



**Figura 9. Análisis morfométrico de la pieza media espermática luego del tratamiento con drogas mitocondriales.** a. Área de la PME en las tres condiciones estudiadas (control, con Antimicina A (AA) y con FCCP) en todos los sujetos incluidos en el estudio (n=11). b. Área de la PME en relación al tratamiento con drogas mitocondriales (AA y FCCP) en individuos normozoospermicos (n=6) y en individuos con alteraciones del espermograma (n=5). ANOVA, \*p<0.05.

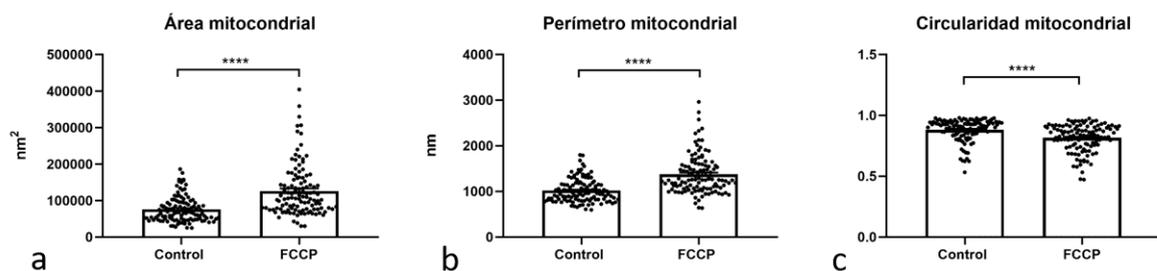
### **Análisis de la pieza media espermática mediante microscopía electrónica luego del tratamiento con drogas mitocondriales**

Luego del tratamiento con drogas mitocondriales no se observaron grandes diferencias morfológicas en la ultraestructura de las mitocondrias presentes a nivel de la PME. No se evidenció ningún patrón o cambio subcelular característico o patognomónico del tratamiento con las respectivas drogas mitocondriales (Figura 10).



**Figura 10. Morfología mitocondrial en espermatozoides sometidos al tratamiento con drogas mitocondriales.** a., b. y c. Imágenes representativas de la pieza media espermática de la fracción control, de la fracción tratada con AA y de la fracción tratada con FCCP respectivamente. No se observan grandes diferencias morfológicas ni un patrón ultraestructural representativo del tratamiento con drogas mitocondriales. Barras: 500 nm.

El análisis morfométrico ultraestructural de la pieza media espermática y de las mitocondrias allí presentes mostró diferencias en los parámetros morfométricos descriptores de forma y tamaño mitocondrial luego del tratamiento con FCCP (Figura 11). Se evidenciaron mitocondrias más grandes y con una morfología más irregular en la fracción tratada con FCCP en comparación con la fracción control (área = control vs FCCP; media  $\pm$  SD = 75541  $\pm$  35171 vs 126195  $\pm$  70216, mediana 66531 vs 105764; perímetro = 1020  $\pm$  254.8 vs 1371  $\pm$  424.2, mediana 962.4 vs 1250; circularidad = 0.88  $\pm$  0.09 vs 0.81  $\pm$  0.11, mediana 0.91 vs 0.83).



**Figura 11. Análisis morfométrico de las mitocondrias presentes en la pieza media de espermatozoides humanos tratados con drogas mitocondriales.** (a.- c.) Descriptores morfométricos de las mitocondrias de la pieza media en función al tratamiento con FCCP, n=118 y 117 respectivamente. Mann-Whitney - \*p < 0.0001.

## DISCUSIÓN

La capacidad fecundante del gameto masculino depende, entre otras cosas, de sus características estructurales, por lo cual fallas en su conformación y organización podrían conducir a alteraciones en la fertilización.

En los mamíferos, la evaluación de la morfología del espermatozoide proporciona información sobre el estado funcional de la gónada masculina y de las vías genitales [147], [208], [209]. Más aún, la cuantificación de la morfología espermática en el hombre es fundamental para evaluar la calidad del semen y predecir el éxito de la fertilidad tanto in vivo como in vitro [123], [210], [211], [212], [213].

En la evaluación del hombre infértil, el espermograma ha sido tradicionalmente el estudio de elección, a pesar de sus múltiples limitaciones. Una estrategia para profundizar no solamente en el diagnóstico, sino también en la etiopatogenia de la infertilidad, consiste en el desarrollo de nuevos métodos de estudio [133], [137], [214]. En este sentido jerarquizamos los estudios morfométricos, las técnicas de obtención y procesamiento de imágenes, poco aplicadas para el estudio sistemático del espermatozoide, y el análisis ultraestructural de las mitocondrias espermáticas. Además, en casi un 30% de los casos de infertilidad en el varón, la causa se desconoce o no es posible su determinación, por lo cual debieran enfocarse nuevos blancos intracelulares capaces de explicar o permitir una aproximación al entendimiento de la misma [138]. El estudio de la morfología mitocondrial, no considerado en el examen rutinario del hombre infértil, aporta información relevante en la evaluación y diagnóstico del hombre con dificultades para concebir.

Por otro lado, se conoce que la longitud de la pieza media espermática, se relaciona con la motilidad y competitividad del espermatozoide [3], [91], [215], pero no si participa en otros procesos de la función normal del mismo, por ejemplo, la capacitación.

En este contexto, desarrollamos distintos algoritmos para evaluar la morfología mitocondrial, capaces de cuantificar mínimas modificaciones a nivel de la pieza media espermática, ya sea durante procesos fisiológicos como la capacitación o frente a modelos patológicos, como es el caso de la infertilidad en el varón. Generamos scripts capaces de adaptarse a la organización de las mitocondrias espermáticas, y los ajustamos, según las necesidades para obtener datos sistemáticos, precisos y reproducibles, aplicables en otros contextos, no sólo con fines de investigación sino pasibles de ser implementados a futuro, con fines diagnósticos, en la práctica clínica. Las características de las herramientas generadas,

plausibles de ser reutilizadas sin la necesidad de un operador experimentado, las perfila a futuro como una herramienta más en el estudio del hombre infértil.

Sumado a esto, y en base a que los scripts fueron generados en el seno de un equipo multidisciplinario de la UDELAR, se contribuyó también a la formación de individuos capacitados en la generación de herramientas para el estudio del espermatozoide y del hombre infértil.

Debido a su tamaño y distribución en espiral [24], las mitocondrias en el espermatozoide son más difíciles de distinguir como entidades separadas. El uso de sondas fluorescentes, dirigidas específicamente a las mitocondrias, y capaces de acumularse en éstas, nos permitió constatar modificaciones en la forma y tamaño de la pieza media espermática que reflejan con precisión los cambios en este organelo. Las herramientas desarrolladas, basándose en la marca fluorescente roja generada por la sonda mitocondrial, lograron la segmentación de las piezas medias espermáticas, generando regiones de interés que abarcan toda la extensión de la misma, por lo cual, cambios en el tamaño de la pieza media espermática, traducen modificaciones en la forma, tamaño u organización estructural de las mitocondrias que la conforman.

Las herramientas generadas, nos permitieron detectar cambios a nivel de la pieza media tanto en espermatozoides humanos como de ratón.

En el ratón, observamos una reducción del área de la pieza media en espermatozoides capacitados, específicamente en aquellos que habían sufrido la reacción acrosómica. Estos resultados sugieren que la capacitación espermática implica no solo cambios a nivel bioquímico [216], metabólico [34], [217] y molecular [28], [41], [43], sino también modificaciones morfológicas. A pesar de que las mitocondrias espermáticas forman una estructura compacta [91], [119], [120], los datos sugieren que exhiben cierto grado de dinamismo, reorganizándose o constriñéndose alrededor del axonema bajo condiciones específicas como la capacitación y en particular la reacción acrosómica. Estudios recientes de células vivas durante la fertilización in vitro, revelaron una disminución en el diámetro de la pieza media luego de la exocitosis acrosómica [218]. Esta observación concuerda con nuestros resultados en espermatozoides capacitados, donde medimos y constatamos una disminución en el ancho de la pieza media. Dicha contracción de la pieza media está asociada con la reacción acrosómica, lo cual sugiere que durante dicho proceso surgen modificaciones estructurales del espermatozoide que involucran a toda la célula (además del acrosoma y la cabeza espermática) y que podrían estar afectando no solo la organización sino también la función de los componentes del flagelo (en este caso las mitocondrias).

Nuestros hallazgos con microscopía de fluorescencia fueron corroborados mediante MET, técnica ampliamente utilizada en el estudio del flagelo espermático [3], [7], [219], [220], [221]. En concordancia con las imágenes de fluorescencia, donde analizamos los espermatozoides “in toto”, extendidos sobre una lámina, el análisis ultraestructural de secciones transversales de la pieza media espermática, reveló una disminución del área y del perímetro de las mismas en espermatozoides capacitados, sugiriendo también, una constricción de las piezas medias espermáticas con un acercamiento de las mitocondrias al eje medio del flagelo.

La regulación de la exocitosis acrosómica implica cambios en el citoesqueleto, con cambios de la polimerización de actina en la cabeza espermática [222] además de la activación de distintas vías de señalización [218], [223], [224], [225]. Hallazgos recientes han demostrado que un arreglo en doble hélice de actina polimerizada acompaña a las mitocondrias en la pieza media del flagelo del espermatozoide de ratón [226]. Los cambios en la polimerización del citoesqueleto de actina de la cabeza del espermatozoide durante la reacción acrosómica, podrían inducir modificaciones en la doble hélice de la pieza media, traducándose en la constricción de la misma y en cambios morfológicos de las mitocondrias. Interesantemente, estos cambios en la estructura podrían incluso modular la función mitocondrial como se observa en otros tipos celulares [227].

El análisis de las piezas medias en espermatozoides humanos reveló modificaciones estructurales de las mitocondrias en espermatozoides defectuosos. Nuestros hallazgos sugieren una desorganización de las mitocondrias a nivel de la pieza media espermática lo cual se traduce en un aumento del área de dicha región, con piezas medias más cortas y anchas. A diferencia de lo observado en espermatozoides de ratón, durante la capacitación, las mitocondrias parecen perder su organización estructural característica, desarmando su ensamblaje durante procesos patológicos. Estos resultados corroboran, mediante un análisis morfométrico computacional automatizado, hallazgos previos en piezas medias espermáticas segmentadas manualmente [194]. Esto valida nuestros algoritmos, utilizando espermatozoides humanos, donde el desafío resulta mayor que en el ratón, debido a la gran heterogeneidad de los espermatozoides y a las menores dimensiones del flagelo y por ende de la pieza media.

Los resultados obtenidos mediante microscopía de fluorescencia se corroboraron a nivel subcelular. La microscopía electrónica nos permitió el análisis detallado de las mitocondrias espermáticas de hombres fértiles e infértiles. Propusimos un análisis computacional sistemático de la morfología de dichas mitocondrias. En contraste con estudios de otros autores [157], [163], [167], [228], [229], utilizamos procesamiento de imágenes para obtener varios descriptores morfométricos y medidas precisas del tamaño (área) y la forma

(circularidad) de cada mitocondria en las secciones de la pieza media espermática. Al igual que en otros estudios, observamos en los espermatozoides de hombres infértiles, abundancia de mitocondrias grandes, edematizadas y ensambladas de forma irregular, pero nuestro método de análisis nos permitió demostrar cuantitativamente que las mitocondrias eran significativamente más grandes y de forma heterogénea.

Las herramientas generadas nos permitieron también aproximarnos al análisis morfofuncional de las mitocondrias. Evidenciamos cambios morfológicos en las mitocondrias de espermatozoides apoptóticos, constatando mitocondrias grandes y de forma irregular. Esto se correlaciona con los resultados de otros estudios, los cuales han vinculado la presencia de defectos ultraestructurales en los espermatozoides, con apoptosis y con patología espermática en humanos [228], [229], [230], [231], reportando la presencia de mitocondrias edematizadas y mal organizadas en la pieza media de espermatozoides apoptóticos [84], [111], [116], [117], [118]. Nosotros, a través de nuestro análisis fuimos capaces no solo de corroborar la presencia de tales defectos mitocondriales en espermatozoides apoptóticos, sino de objetivarlos a través de mediciones sistemáticas y precisas. La frecuencia y patrón de defectos mitocondriales, hallados en los espermatozoides apoptóticos, fue similar a la observada, en éste mismo trabajo, en hombres con infertilidad de causa inexplicada. Si bien se desconocen con exactitud las causas que llevan a la presencia de espermatozoides apoptóticos en el eyaculado, el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, producidos por una disfunción mitocondrial, puede desencadenar la apoptosis. Esto, según reportes de otros autores, conduciría a cambios en la motilidad espermática, y a daño oxidativo a nivel del ADN del núcleo del espermatozoide y por ende a la infertilidad [107], [110], [113], [114], [115], [232]. Nuestros hallazgos confirman la presencia de cambios morfológicos a nivel mitocondrial, como acompañantes de dicho proceso, los cuales contribuirían a explicar la etiopatogenia de dicha enfermedad.

El tratamiento de los espermatozoides humanos con inhibidores de la cadena respiratoria mostró cambios estructurales tanto a nivel de la pieza media espermática como a nivel de las mitocondrias, lo cual podría sugerir que cambios en la función mitocondrial se traducen en cambios morfológicos de la mitocondria. Trabajos previos de nuestro laboratorio evidenciaron cambios funcionales en espermatozoides luego de ser incubados con inhibidores mitocondriales, constatándose modificaciones en la función mitocondrial [96], [194]. En este trabajo, constatamos en espermatozoides normales, un aumento del área de la pieza media espermática luego del tratamiento con Antimicina A, sugiriendo que fallas en la función mitocondrial podrían traducirse también en cambios en la morfología espermática y en la

organización de las mitocondrias en particular. Según nuestros hallazgos, en individuos con espermograma alterado, en la condición control (sin tratamiento con drogas mitocondriales) los datos morfométricos de la pieza media espermática se asemejan a los valores observados luego del tratamiento con drogas mitocondriales en individuos normales (Figura 9 - Capítulo 3). Esto podría sugerir la existencia de alteraciones previas en la morfología y/o en la organización mitocondrial, lo cual a su vez coincide con nuestros hallazgos a nivel de la vaina mitocondrial en hombres infértiles. El hecho de que nuestro trabajo se llevó a cabo en células fijadas, lo cual nos permite analizar solo un tiempo determinado luego de la incubación con las drogas mitocondriales, podría constituir una limitante para la interpretación de los resultados. Dada la particular disposición de las mitocondrias en el espermatozoide, estudios en células vivas, donde se pueda seguir en el tiempo la generación de los cambios morfológicos o en la organización mitocondrial serían de gran ayuda.

Por último, el análisis de la intensidad de fluorescencia, a través de los scripts generados, no constituyó un parámetro morfológico capaz de correlacionarse con la función mitocondrial. Según resultados de nuestro laboratorio y de otros autores, se produce un aumento del potencial de membrana mitocondrial durante la capacitación [96], [142], [233], lo cual se vería reflejado en un aumento de la intensidad de fluorescencia a nivel de las mitocondrias espermáticas. Sin embargo, si bien constatamos un remodelado de la pieza media espermática durante la capacitación, el análisis de la intensidad de fluorescencia a través de nuestras herramientas morfométricas, no mostró cambios. Tampoco observamos cambios en la intensidad de fluorescencia de la pieza media en espermatozoides provenientes de muestras con parámetros espermáticos alterados, donde sí evidenciamos cambios morfométricos y en donde una disminución del potencial de membrana mitocondrial sería esperable.

El potencial de membrana mitocondrial depende de la función mitocondrial, y ya ha sido monitoreado en espermatozoides mediante diferentes sondas fluorescentes catiónicas utilizando citometría de flujo, epifluorescencia o microscopía confocal [197]. Por ejemplo, Moscatelli et al. utilizaron MitoTracker Green para distinguir entre espermatozoides con mitocondrias activas e inactivas [234]. Cada uno de los compuestos de la familia “mitotracker” tiene propiedades diferentes, y no existe una completa consistencia en el uso de todas estas sondas para determinar el estado funcional de las células. Para imágenes de microscopía de espermatozoides fijados, Amaral y Ramalho-Santos sugirieron monitorear el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides coincubando a las células con sondas de viabilidad y expresar los resultados como un porcentaje de espermatozoides vivos

[197]. De todas maneras pese a la falta de especificidad en el monitoreo del potencial de membrana mitocondrial debido a la sonda elegida (sin la combinación con otros marcadores funcionales), entendemos que es un gran aporte al área el hecho de que fuimos capaces de diseñar un instrumento metodológico que nos permitió cuantificar simultáneamente la morfología y la fluorescencia mitocondrial como prueba de funcionalidad. La puesta a punto de sondas fluorescentes que junto con las herramientas morfométricas desarrolladas sean capaces de monitorear conjuntamente tanto la forma como la función de las mitocondrias en el espermatozoide constituye un desafío pendiente.

## CONCLUSIONES

-Se desarrollaron las herramientas informáticas necesarias para el análisis de la morfología mitocondrial en el espermatozoide, tanto a nivel celular como subcelular.

-Los datos obtenidos destacan el potencial del algoritmo como una herramienta robusta para el análisis cuantitativo de la morfología mitocondrial y para su aplicación en diversos contextos para evaluar la calidad espermática, pudiendo ser de valor como una estrategia más en el diagnóstico del hombre infértil.

-Las mitocondrias espermáticas son capaces de reorganizarse y de experimentar cambios morfológicos a nivel de la pieza media lo cual las hace pasibles de cierto dinamismo.

-El remodelado morfológico de las mitocondrias refleja cambios detectables dentro de la pieza media del espermatozoide los cuales están asociados con la función del espermatozoide, con la calidad espermática y con la infertilidad masculina.

-Dichos hallazgos postulan a la mitocondria y su morfología como un objeto de estudio para la comprensión de la fisiología espermática normal y para el entendimiento de las bases etiopatogénicas que subyacen a la infertilidad.

Los resultados presentados y analizados en esta tesis dieron lugar a varias presentaciones en congresos nacionales e internacionales y a las siguientes publicaciones en revistas internacionales arbitradas:

- *Mitochondrial morphology in fertile and infertile men: image processing and morphometric analysis of the sperm midpiece.* **Skowronek MF**, Pietroroia S, de Cola G, Ramos M, Silvera D, Casanova G, Lecumberry F, Cassina A, Sapiro R. *Front Cell Dev Biol.* 2025 Jun;10;13:1609081. doi: 10.3389/fcell.2025.1609081. eCollection 2025. PMID: 40556737
- *Morphometric analysis of the sperm midpiece during capacitation.* **Skowronek MF**, Pietroroia S, Silvera D, Ford M, Cassina A, Lecumberry F, Sapiro R. *Tissue Cell.* 2025 Aug;95:102866. doi: 10.1016/j.tice.2025.102866. Epub 2025 Mar 22. PMID: 40157222
- *Mitochondrial metabolism determines the functional status of human sperm and correlates with semen parameters.* Irigoyen P, Pintos-Polasky P, Rosa-Villagran L, **Skowronek MF**, Cassina A, Sapiro R. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Aug 30;10:926684. doi: 10.3389/fcell.2022.926684. eCollection 2022. PMID: 36111336

## **PERSPECTIVAS**

Como estrategias a futuro, proponemos:

-Profundizar en el estudio de la morfología mitocondrial espermática, recurriendo a técnicas o a microscopías que, a través de una mejor resolución, nos permitan analizar con mayor detalle los cambios morfológicos constatados.

-Analizar cambios en la morfología mitocondrial en células vivas, generando cambios funcionales en el espermatozoide que puedan reflejarse en modificaciones morfológicas a nivel mitocondrial y/o “desafiando” directamente a la mitocondria buscando evidenciar cambios en su forma y organización.

-Estudiar posibles interacciones de las mitocondrias con estructuras vecinas, a nivel de la pieza media espermática, capaces de relacionarse o de explicar los cambios morfológicos evidenciados.

-Correlacionar los cambios morfológicos de la mitocondria con la función mitocondrial en el contexto de la infertilidad. Para ello ahondaremos en el estudio de distintos marcadores de función mitocondrial en individuos fértiles e infértiles correlacionando los hallazgos con los parámetros espermáticos y con la morfología mitocondrial.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Puerta Suárez, S. S. du Plessis, and W. D. Cardona Maya, "Spermatozoa: A Historical Perspective," *Int. J. Fertil. Steril.*, vol. 12, no. 3, Oct. 2018, doi: 10.22074/ijfs.2018.5316.
- [2] R. Pereira and M. Sousa, "Morphological and Molecular Bases of Male Infertility: A Closer Look at Sperm Flagellum," *Genes*, vol. 14, no. 2, p. 383, Feb. 2023, doi: 10.3390/genes14020383.
- [3] N.-H. Gu, W.-L. Zhao, G.-S. Wang, and F. Sun, "Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 17, no. 1, p. 66, Dec. 2019, doi: 10.1186/s12958-019-0510-y.
- [4] N. Kumar and A. K. Singh, "The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery," *Biol. Reprod.*, vol. 104, no. 3, pp. 508–520, Mar. 2021, doi: 10.1093/biolre/ioaa213.
- [5] M. S. Lehti and A. Sironen, "Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects†," *Biol. Reprod.*, vol. 97, no. 4, pp. 522–536, Oct. 2017, doi: 10.1093/biolre/iox096.
- [6] E. Linn, L. Ghanem, H. Bhakta, C. Greer, and M. Avella, "Genes Regulating Spermatogenesis and Sperm Function Associated With Rare Disorders," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, p. 634536, Feb. 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.634536.
- [7] D. W. Fawcett, "A Comparative View of Sperm Ultrastructure1," *Biol. Reprod.*, vol. 2, no. suppl\_2, pp. 90–127, Jun. 1970, doi: 10.1095/biolreprod2.Supplement\_2.90.
- [8] M. R. Leung *et al.*, "In-cell structures of conserved supramolecular protein arrays at the mitochondria–cytoskeleton interface in mammalian sperm," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 118, no. 45, p. e2110996118, Nov. 2021, doi: 10.1073/pnas.2110996118.
- [9] A. Amaral, B. Lourenço, M. Marques, and J. Ramalho-Santos, "Mitochondria functionality and sperm quality," *REPRODUCTION*, vol. 146, no. 5, pp. R163–R174, Nov. 2013, doi: 10.1530/REP-13-0178.
- [10] E. M. Eddy, K. Toshimori, and D. A. O'Brien, "Fibrous sheath of mammalian spermatozoa," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 61, no. 1, pp. 103–115, May 2003, doi: 10.1002/jemt.10320.
- [11] E. A. Guseva, V. S. Buev, S. E. Mirzaeva, P. I. Pletnev, O. A. Dontsova, and P. V. Sergiev, "Structure and Composition of Spermatozoa Fibrous Sheath in Diverse Groups of Metazoa," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 25, no. 14, p. 7663, Jul. 2024, doi: 10.3390/ijms25147663.
- [12] E. M. Eddy, K. Toshimori, and D. A. O'Brien, "Fibrous sheath of mammalian spermatozoa," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 61, no. 1, pp. 103–115, May 2003, doi: 10.1002/jemt.10320.
- [13] H. E. Chemes, S. Brugo, F. Zanchetti, C. Carrere, and J. C. Lavieri, "Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility," *Fertil. Steril.*, vol. 48, no. 4, pp. 664–669, Oct. 1987, doi: 10.1016/S0015-0282(16)59482-5.
- [14] N. Gatimel, J. Moreau, J. Parinaud, and R. D. Léandri, "Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017," *Andrology*, vol. 5, no. 5, pp. 845–862, Sep. 2017, doi: 10.1111/andr.12389.
- [15] S. A. Dávila Garza and P. Patrizio, "Reproductive outcomes in patients with male infertility because of Klinefelter's syndrome, Kartagener's syndrome, round-head sperm, dysplasia fibrous sheath, and 'stump' tail sperm: an updated literature review," *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, vol. 25, no. 3, pp. 229–246, Jun. 2013, doi: 10.1097/GCO.0b013e32835faae5.
- [16] A. Boursier *et al.*, "Results and perinatal outcomes from 189 ICSI cycles of couples with asthenozoospermic men and flagellar defects assessed by transmission electron microscopy," *Reprod. Biomed. Online*, vol. 47, no. 5, p. 103328, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.rbmo.2023.103328.

- [17] H. E. Chemes, "Phenotypic varieties of sperm pathology: Genetic abnormalities or environmental influences can result in different patterns of abnormal spermatozoa," *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 194, pp. 41–56, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.04.074.
- [18] J. A. MacLean and M. F. Wilkinson, "Gene Regulation in Spermatogenesis," in *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 71, Elsevier, 2005, pp. 131–197. doi: 10.1016/S0070-2153(05)71005-X.
- [19] A.-F. Holstein, W. Schulze, and M. Davidoff, "Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 1, no. 1, p. 107, Nov. 2003, doi: 10.1186/1477-7827-1-107.
- [20] H. Wartenberg and A.-F. Holstein, "Morphology of the ?spindle-shaped body? in the developing tail of human spermatids," *Cell Tissue Res.*, vol. 159, no. 4, Jun. 1975, doi: 10.1007/BF00221701.
- [21] A. F. Holstein, "Ultrastructural Observations on the Differentiation of Spermatids in Man\*," *Andrologia*, vol. 8, no. 2, pp. 157–165, Apr. 2009, doi: 10.1111/j.1439-0272.1976.tb02126.x.
- [22] G. E. Olson and V. P. Winfrey, "Mitochondria-cytoskeleton interactions in the sperm midpiece," *J. Struct. Biol.*, vol. 103, no. 1, pp. 13–22, Mar. 1990, doi: 10.1016/1047-8477(90)90081-M.
- [23] H. Otani, O. Tanaka, K. Kasai, and T. Yoshioka, "Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: Regular dispositions and synchronized changes," *Anat. Rec.*, vol. 222, no. 1, pp. 26–33, Sep. 1988, doi: 10.1002/ar.1092220106.
- [24] H. Ho and S. Wey, "Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 70, no. 8, pp. 719–723, Aug. 2007, doi: 10.1002/jemt.20457.
- [25] D. R. P. Tulsiani, A. Abou-Haila, C. R. Loeser, and B. M. J. Pereira, "The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization," *Exp. Cell Res.*, vol. 240, no. 2, pp. 151–164, May 1998, doi: 10.1006/excr.1998.3943.
- [26] K. A. Hook, Q. Yang, L. Campanello, W. Losert, and H. S. Fisher, "The social shape of sperm: using an integrative machine-learning approach to examine sperm ultrastructure and collective motility".
- [27] K. Georgadaki, N. Khoury, D. A. Spandidos, and V. Zoumpourlis, "The molecular basis of fertilization (Review)," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 38, no. 4, pp. 979–986, Oct. 2016, doi: 10.3892/ijmm.2016.2723.
- [28] L. C. Puga Molina, G. M. Luque, P. A. Balestrini, C. I. Marín-Briggiler, A. Romarowski, and M. G. Buffone, "Molecular Basis of Human Sperm Capacitation," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 6, p. 72, Jul. 2018, doi: 10.3389/fcell.2018.00072.
- [29] R. Sullivan and R. Mieusset, "The human epididymis: its function in sperm maturation," *Hum. Reprod. Update*, vol. 22, no. 5, pp. 574–587, Sep. 2016, doi: 10.1093/humupd/dmw015.
- [30] E. R. James, D. T. Carrell, K. I. Aston, T. G. Jenkins, M. Yeste, and A. Salas-Huetos, "The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 15, p. 5377, Jul. 2020, doi: 10.3390/ijms21155377.
- [31] R. Deng *et al.*, "Exosomes from uterine fluid promote capacitation of human sperm," *PeerJ*, vol. 12, p. e16875, Apr. 2024, doi: 10.7717/peerj.16875.
- [32] R. J. Aitken and B. Nixon, "Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored," *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 19, no. 12, pp. 785–793, Dec. 2013, doi: 10.1093/molehr/gat067.
- [33] P. E. Visconti, D. Krapf, J. L. De La Vega-Beltrán, J. J. Acevedo, and A. Darszon, "Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation," *Asian J. Androl.*, vol. 13, no. 3, pp. 395–405, May 2011, doi: 10.1038/aja.2010.69.
- [34] M. Balbach, M. G. Gervasi, D. M. Hidalgo, P. E. Visconti, L. R. Levin, and J. Buck,

- “Metabolic changes in mouse sperm during capacitation†,” *Biol. Reprod.*, vol. 103, no. 4, pp. 791–801, Oct. 2020, doi: 10.1093/biolre/iaaa114.
- [35] P. E. Visconti, J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G. S. Kopf, “Capacitation of mouse spermatozoa: I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation,” *Development*, vol. 121, no. 4, pp. 1129–1137, Apr. 1995, doi: 10.1242/dev.121.4.1129.
- [36] H. Breitbart, “Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 187, no. 1–2, pp. 139–144, Feb. 2002, doi: 10.1016/S0303-7207(01)00704-3.
- [37] L. J. Burkman, “Characterization of Hyperactivated Motility by Human Spermatozoa During Capacitation: Comparison of Fertile and Oligozoospermic Sperm Populations,” *Arch. Androl.*, vol. 13, no. 2–3, pp. 153–165, Jan. 1984, doi: 10.3109/01485018408987514.
- [38] C. Brucker, “The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update,” *Hum. Reprod. Update*, vol. 1, no. 1, pp. 51–62, Jan. 1995, doi: 10.1093/humupd/1.1.51.
- [39] M. D. Lyon *et al.*, “SLO3: A Conserved Regulator of Sperm Membrane Potential,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 13, p. 11205, Jul. 2023, doi: 10.3390/ijms241311205.
- [40] M. Yoshida and K. Yoshida, “Activation of motility and chemotaxis in the spermatozoa,” *Reprod. Med. Biol.*, vol. 24, no. 1, p. e12638, Jan. 2025, doi: 10.1002/rmb2.12638.
- [41] Y. Yang *et al.*, “The regulation role of calcium channels in mammalian sperm function: a narrative review with a focus on humans and mice,” *PeerJ*, vol. 12, p. e18429, Oct. 2024, doi: 10.7717/peerj.18429.
- [42] J. Simons and L. Fauci, “A Model for the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm,” *Bull. Math. Biol.*, vol. 80, no. 9, pp. 2481–2501, Sep. 2018, doi: 10.1007/s11538-018-0478-3.
- [43] A. Delgado-Bermúdez, M. Yeste, S. Bonet, and E. Pinart, “Physiological role of potassium channels in mammalian germ cell differentiation, maturation, and capacitation,” *Andrology*, vol. 13, no. 2, pp. 184–201, Feb. 2025, doi: 10.1111/andr.13606.
- [44] Z. He, M. Xie, Q. Q. Li, J. Duan, and X. Lu, “Research Progress on the Microregulatory Mechanisms of Fertilization: A Review,” *In Vivo*, vol. 36, no. 5, pp. 2002–2013, 2022, doi: 10.21873/invivo.12926.
- [45] M. Fujikura and M. Fujinoki, “Progesterone and estradiol regulate sperm hyperactivation and *in vitro* fertilization success in mice,” *J. Reprod. Dev.*, vol. 70, no. 2, pp. 96–103, 2024, doi: 10.1262/jrd.2023-080.
- [46] N. O. McPherson *et al.*, “Clinical use of progesterone in human sperm preparation media for increasing IVF success,” *Reprod. Biomed. Online*, vol. 48, no. 4, p. 103625, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.rbmo.2023.103625.
- [47] D. M. Hidalgo *et al.*, “Capacitation increases glucose consumption in murine sperm,” *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 87, no. 10, pp. 1037–1047, Oct. 2020, doi: 10.1002/mrd.23421.
- [48] L. N. González, M. M. Giaccagli, J. D. Herzfeld, P. S. Cuasnicú, V. G. Da Ros, and D. J. Cohen, “A side-by-side comparison of different capacitation media in developing mouse sperm fertilizing ability,” *Sci. Rep.*, vol. 14, no. 1, p. 14287, Jun. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-65134-w.
- [49] J. M. Bedford, “Sperm Capacitation and Fertilization in Mammals,” *Biol. Reprod.*, vol. 2, no. suppl\_2, pp. 128–158, Jun. 1970, doi: 10.1095/biolreprod2.Supplement\_2.128.
- [50] T. Vorup-Jensen, “X-ray microscopy of human spermatozoa shows change of mitochondrial morphology after capacitation,” *Hum. Reprod.*, vol. 14, no. 4, pp. 880–884, Apr. 1999, doi: 10.1093/humrep/14.4.880.
- [51] *Lehninger principios de bioquímica*, Séptima edición. Barcelona: Omega, 2019.
- [52] B. C. Jenkins *et al.*, “Mitochondria in disease: changes in shapes and dynamics,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 49, no. 4, pp. 346–360, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.tibs.2024.01.011.
- [53] A. M. Van Der Blik, M. M. Sedensky, and P. G. Morgan, “Cell Biology of the Mitochondrion,” *Genetics*, vol. 207, no. 3, pp. 843–871, Nov. 2017, doi:

- 10.1534/genetics.117.300262.
- [54] A. S. Monzel, J. A. Enríquez, and M. Picard, “Multifaceted mitochondria: moving mitochondrial science beyond function and dysfunction,” *Nat. Metab.*, vol. 5, no. 4, pp. 546–562, Apr. 2023, doi: 10.1038/s42255-023-00783-1.
- [55] *Histología: texto y atlas correlación con biología celular y molecular*, 8ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer, 2020.
- [56] B. Alberts, *Introducción a la biología celular: 5ª edición*. Ciudad de México: Editorial Medica Panamericana, 2021.
- [57] W. Chen, H. Zhao, and Y. Li, “Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 8, no. 1, Sep. 2023, doi: 10.1038/s41392-023-01547-9.
- [58] M. Liesa, M. Palacín, and A. Zorzano, “Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease,” *Physiol. Rev.*, vol. 89, no. 3, pp. 799–845, Jul. 2009, doi: 10.1152/physrev.00030.2008.
- [59] H. Nohl, L. Gille, A. Kozlov, and K. Staniek, “Are mitochondria a spontaneous and permanent source of reactive oxygen species?,” *Redox Rep.*, vol. 8, no. 3, pp. 135–141, Jun. 2003, doi: 10.1179/135100003225001502.
- [60] A. J. Kowaltowski, N. C. De Souza-Pinto, R. F. Castilho, and A. E. Vercesi, “Mitochondria and reactive oxygen species,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 47, no. 4, pp. 333–343, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004.
- [61] M. D. Brand and D. G. Nicholls, “Assessing mitochondrial dysfunction in cells,” *Biochem. J.*, vol. 435, no. 2, pp. 297–312, Apr. 2011, doi: 10.1042/BJ20110162.
- [62] L. Castro and B. A. Freeman, “Reactive oxygen species in human health and disease,” *Nutrition*, vol. 17, no. 2, pp. 161–165, Feb. 2001, doi: 10.1016/S0899-9007(00)00570-0.
- [63] A. H. Schapira, “Mitochondrial diseases,” *The Lancet*, vol. 379, no. 9828, pp. 1825–1834, May 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(11)61305-6.
- [64] R. J. Aitken, T. B. Smith, M. S. Jobling, M. A. Baker, and G. N. D. Iulii, “Oxidative stress and male reproductive health,” *Oxidative Stress*.
- [65] D. Trachootham, W. Lu, M. A. Ogasawara, N. R.-D. Valle, and P. Huang, “Redox Regulation of Cell Survival,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, no. 8, pp. 1343–1374, Aug. 2008, doi: 10.1089/ars.2007.1957.
- [66] C. Quijano, L. Castro, G. Peluffo, V. Valez, and R. Radi, “Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite,” *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, vol. 293, no. 6, pp. H3404–H3414, Dec. 2007, doi: 10.1152/ajpheart.00761.2007.
- [67] C. Giulivi, J. J. Poderoso, and A. Boveris, “Production of Nitric Oxide by Mitochondria,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 18, pp. 11038–11043, May 1998, doi: 10.1074/jbc.273.18.11038.
- [68] R. Radi, G. Peluffo, M. N. Alvarez, M. Naviliat, and A. Cayota, “Unraveling peroxynitrite formation in biological systems,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 30, no. 5, pp. 463–488, Mar. 2001, doi: 10.1016/S0891-5849(00)00373-7.
- [69] H. Sies, “Oxidative stress: From basic research to clinical application,” *Am. J. Med.*, vol. 91, no. 3, pp. S31–S38, Sep. 1991, doi: 10.1016/0002-9343(91)90281-2.
- [70] W. Dröge, “Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function,” *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 1, pp. 47–95, Jan. 2002, doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
- [71] A. H. Schapira, “Mitochondrial disease,” *The Lancet*, vol. 368, no. 9529, pp. 70–82, Jul. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)68970-8.
- [72] J. Nunnari and A. Suomalainen, “Mitochondria: In Sickness and in Health,” *Cell*, vol. 148, no. 6, pp. 1145–1159, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035.
- [73] G. Peluffo and R. Radi, “Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 75, no. 2, pp. 291–302, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.cardiores.2007.04.024.
- [74] P. B. Ham and R. Raju, “Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 157, pp. 92–116, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.06.006.

- [75] Q. Qi, S. Yang, J. Li, P. Li, and L. Du, "Regulation of Redox Homeostasis Through DNA/RNA Methylation and Post-Translational Modifications in Cancer Progression," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 39, no. 7–9, pp. 531–550, Sep. 2023, doi: 10.1089/ars.2023.0371.
- [76] A. John and H. Raza, "Alterations in Inflammatory Cytokines and Redox Homeostasis in LPS-Induced Pancreatic Beta-Cell Toxicity and Mitochondrial Stress: Protection by Azadirachtin," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 10, p. 867608, Jun. 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.867608.
- [77] C. O'Flaherty and E. Scarlata, "OXIDATIVE STRESS AND REPRODUCTIVE FUNCTION: The protection of mammalian spermatozoa against oxidative stress," *Reproduction*, vol. 164, no. 6, pp. F67–F78, Dec. 2022, doi: 10.1530/REP-22-0200.
- [78] A. Worth, A. J. Thrasher, and H. Bobby Gaspar, "Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype," *Br. J. Haematol.*, vol. 133, no. 2, pp. 124–140, Apr. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.05993.x.
- [79] J. Varley, D. Evans, and J. Birch, "Li-Fraumeni syndrome – a molecular and clinical review," *Br. J. Cancer*, vol. 76, no. 1, pp. 1–14, Jul. 1997, doi: 10.1038/bjc.1997.328.
- [80] X. Xu, Y. Lai, and Z.-C. Hua, "Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials," *Biosci. Rep.*, vol. 39, no. 1, p. BSR20180992, Jan. 2019, doi: 10.1042/BSR20180992.
- [81] S.-Y. Jeong and D.-W. Seol, "The role of mitochondria in apoptosis".
- [82] S. Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, Jun. 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
- [83] M. K. White and C. Cinti, "A Morphologic Approach to Detect Apoptosis Based on Electron Microscopy," in *Cell Cycle Control and Dysregulation Protocols*, vol. 285, New Jersey: Humana Press, 2004, pp. 105–112. doi: 10.1385/1-59259-822-6:105.
- [84] M. Karbowski and R. Youle, "Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis," *Cell Death Differ.*
- [85] E. Bossy-Wetzell, M. J. Barsoum, A. Godzik, R. Schwarzenbacher, and S. A. Lipton, "Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 706–716, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.ceb.2003.10.015.
- [86] B. Glancy, Y. Kim, P. Katti, and T. B. Willingham, "The Functional Impact of Mitochondrial Structure Across Subcellular Scales," *Front. Physiol.*, vol. 11, p. 541040, Nov. 2020, doi: 10.3389/fphys.2020.541040.
- [87] D. C. Chan, "Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease," *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 15, no. 1, pp. 235–259, Jan. 2020, doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032711.
- [88] M. Adebayo, S. Singh, A. P. Singh, and S. Dasgupta, "Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis," *FASEB J.*, vol. 35, no. 6, Jun. 2021, doi: 10.1096/fj.202100067r.
- [89] R. Quintana-Cabrera and L. Scorrano, "Determinants and outcomes of mitochondrial dynamics," *Mol. Cell*, vol. 83, no. 6, pp. 857–876, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.molcel.2023.02.012.
- [90] G. W. Dorn, "Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 81, no. 1, pp. 1–17, Feb. 2019, doi: 10.1146/annurev-physiol-020518-114358.
- [91] M. Bogueuet, P.-E. Bouet, A. Spiers, P. Reynier, and P. May-Panloup, "Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility," *Hum. Reprod. Update*, vol. 27, no. 4, pp. 697–719, Jun. 2021, doi: 10.1093/humupd/dmab001.
- [92] P. Piomboni, R. Focarelli, A. Stendardi, A. Ferramosca, and V. Zara, "The role of mitochondria in energy production for human sperm motility," *Int. J. Androl.*, vol. 35, no. 2, pp. 109–124, Apr. 2012, doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x.
- [93] M. Vahedi Raad, A. M. Firouzabadi, M. Tofighi Niaki, R. Henkel, and F. Fesahat, "The impact of mitochondrial impairments on sperm function and male fertility: a systematic review," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 22, no. 1, Jul. 2024, doi: 10.1186/s12958-024-01252-4.
- [94] N. Kumar, "Sperm Mitochondria, the Driving Force Behind Human Spermatozoa

- Activities: Its Functions and Dysfunctions - A Narrative Review," *Curr. Mol. Med.*, vol. 23, no. 4, pp. 332–340, 2023, doi: 10.2174/1566524022666220408104047.
- [95] N. Kumar, "Sperm Mitochondria, the Driving Force Behind Human Spermatozoa Activities: Its Functions and Dysfunctions - A Narrative Review," *Curr. Mol. Med.*, vol. 23, no. 4, pp. 332–340, May 2023, doi: 10.2174/1566524022666220408104047.
- [96] J. J. Ferreira *et al.*, "Increased mitochondrial activity upon CatSper channel activation is required for mouse sperm capacitation," *Redox Biol.*, vol. 48, p. 102176, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.redox.2021.102176.
- [97] G. Lavranos, M. Balla, A. Tzortzopoulou, V. Syriou, and R. Angelopoulou, "Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways," *Reprod. Toxicol.*, vol. 34, no. 3, pp. 298–307, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.reprotox.2012.06.007.
- [98] "New Insights into Sperm Physiology and Pathology," in *Handbook of Experimental Pharmacology*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, pp. 99–115. doi: 10.1007/978-3-642-02062-9\_7.
- [99] R. Jones, T. Mann, and R. Sherins, "Peroxidative Breakdown of Phospholipids in Human Spermatozoa, Spermicidal Properties of Fatty Acid Peroxides, and Protective Action of Seminal Plasma," *Fertil. Steril.*, vol. 31, no. 5, pp. 531–537, May 1979, doi: 10.1016/s0015-0282(16)43999-3.
- [100] S. Chen, J.-P. Allam, Y. Duan, and G. Haidl, "Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches," *Arch. Gynecol. Obstet.*, vol. 288, no. 1, pp. 191–199, Jul. 2013, doi: 10.1007/s00404-013-2801-4.
- [101] R. Chianese and R. Pierantoni, "Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality," *Antioxidants*, vol. 10, no. 1, p. 92, Jan. 2021, doi: 10.3390/antiox10010092.
- [102] E. Scarlata and C. O'Flaherty, "Antioxidant Enzymes and Male Fertility: Lessons from Knockout Models," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 32, no. 8, pp. 569–580, Mar. 2020, doi: 10.1089/ars.2019.7985.
- [103] A. Kowalczyk, "The Role of the Natural Antioxidant Mechanism in Sperm Cells," *Reprod. Sci.*, vol. 29, no. 5, pp. 1387–1394, May 2022, doi: 10.1007/s43032-021-00795-w.
- [104] R. J. Aitken, D. Buckingham, K. West, F. C. Wu, K. Zikopoulos, and D. W. Richardson, "Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors," *Reproduction*, vol. 94, no. 2, pp. 451–462, Mar. 1992, doi: 10.1530/jrf.0.0940451.
- [105] E. Barati, H. Nikzad, and M. Karimian, "Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 77, no. 1, pp. 93–113, Jan. 2020, doi: 10.1007/s00018-019-03253-8.
- [106] R. Aitken, M. Baker, and B. Nixon, "Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress?," *Asian J. Androl.*, vol. 17, no. 4, p. 633, 2015, doi: 10.4103/1008-682x.153850.
- [107] R. Aitken, "A free radical theory of male infertility," *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 6, no. 1, p. 19, 1994, doi: 10.1071/rd9940019.
- [108] J. Aitken and H. Fisher, "Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk," *BioEssays*, vol. 16, no. 4, pp. 259–267, Apr. 1994, doi: 10.1002/bies.950160409.
- [109] C. Ávila, J. I. Vinay, M. Arese, L. Saso, and R. Rodrigo, "Antioxidant Intervention against Male Infertility: Time to Design Novel Strategies," *Biomedicines*, vol. 10, no. 12, p. 3058, Nov. 2022, doi: 10.3390/biomedicines10123058.
- [110] R. J. Aitken and M. A. Baker, "Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 57, no. 2-3-4, pp. 265–272, 2013, doi: 10.1387/ijdb.130146ja.
- [111] S. Grunewald, G. Fitzl, and C. Springsguth, "Induction of ultra-morphological features of apoptosis in mature and immature sperm," *Asian J. Androl.*, vol. 19, no. 5, p. 533,

- 2017, doi: 10.4103/1008-682X.180974.
- [112] G. Barroso, S. Taylor, M. Morshedi, F. Manzur, F. Gaviño, and S. Oehninger, "Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations," *Fertil. Steril.*, vol. 85, no. 1, pp. 149–154, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.06.046.
- [113] M. Muratori *et al.*, "Functional and Ultrastructural Features of DNA-Fragmented Human Sperm," *J. Androl.*, vol. 21, no. 6, pp. 903–912, Nov. 2000, doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03421.x.
- [114] R. J. Aitken and A. J. Koppers, "Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa," *Asian J. Androl.*, vol. 13, no. 1, pp. 36–42, Jan. 2011, doi: 10.1038/aja.2010.68.
- [115] T. Liu *et al.*, "Mechanisms of ROS-induced mitochondria-dependent apoptosis underlying liquid storage of goat spermatozoa," *Aging*, vol. 11, no. 18, pp. 7880–7898, Sep. 2019, doi: 10.18632/aging.102295.
- [116] K. M. Engel, C. H. Springsguth, and S. Grunewald, "What happens to the unsuccessful spermatozoa?," *Andrology*, vol. 6, no. 2, pp. 335–344, Mar. 2018, doi: 10.1111/andr.12467.
- [117] M. Teranishi, J. H. Spodonik, M. Karbowski, C. Kurono, T. Soji, and T. Wakabayashi, "Swelling of Free-Radical-Induced Megamitochondria Causes Apoptosis," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 68, no. 2, pp. 104–123, Apr. 2000, doi: 10.1006/exmp.1999.2288.
- [118] M. Karbowski *et al.*, "Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no. 3–4, pp. 396–409, Feb. 1999, doi: 10.1016/s0891-5849(98)00209-3.
- [119] G. E. Olson and V. P. Winfrey, "Mitochondria-cytoskeleton interactions in the sperm midpiece," *J. Struct. Biol.*, vol. 103, no. 1, pp. 13–22, Mar. 1990, doi: 10.1016/1047-8477(90)90081-m.
- [120] M. Maiorino *et al.*, "Functional Interaction of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase with Sperm Mitochondrion-associated Cysteine-rich Protein Discloses the Adjacent Cysteine Motif as a New Substrate of the Selenoperoxidase," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 46, pp. 38395–38402, Nov. 2005, doi: 10.1074/jbc.m505983200.
- [121] F. Ursini *et al.*, "Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation," *Science*, vol. 285, no. 5432, pp. 1393–1396, Aug. 1999, doi: 10.1126/science.285.5432.1393.
- [122] *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 6th ed. Geneva: World Health Organization, 2010.
- [123] L. Björndahl and J. Kirkman Brown, "The sixth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: ensuring quality and standardization in basic examination of human ejaculates," *Fertil. Steril.*, vol. 117, no. 2, pp. 246–251, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.12.012.
- [124] S. K. Dey, "How we are born," *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 4, pp. 952–955, Apr. 2010, doi: 10.1172/jci42380.
- [125] A. T. Fidler, "Maternal and child health. Infertility: from a personal to a public health problem," *Public Health Rep.*, vol. 114, no. 6, pp. 494–511, Nov. 1999, doi: 10.1093/phr/114.6.494.
- [126] S. Brugo-Olmedo, C. Chillik, and S. Kopelman, "Definition and causes of infertility," *Reprod. Biomed. Online*, vol. 2, no. 1, pp. 41–53, Jan. 2001, doi: 10.1016/s1472-6483(10)62187-6.
- [127] H. Levine *et al.*, "Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis," *Hum. Reprod. Update*, vol. 23, no. 6, pp. 646–659, Nov. 2017, doi: 10.1093/humupd/dmx022.
- [128] L. Rosa-Villagrán, N. Barrera, J. Montes, C. Riso, and R. Sapiro, "Decline of semen quality over the last 30 years in Uruguay," *Basic Clin. Androl.*, vol. 31, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/s12610-021-00128-6.
- [129] A. Ferlin, F. Raicu, V. Gatta, D. Zuccarello, G. Palka, and C. Foresta, "Male infertility:

- role of genetic background,” *Reprod. Biomed. Online*, vol. 14, no. 6, pp. 734–745, Jan. 2007, doi: 10.1016/s1472-6483(10)60677-3.
- [130] C. Farquhar and J. Marjoribanks, “Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews,” *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 2018, no. 8, Aug. 2018, doi: 10.1002/14651858.cd010537.pub5.
- [131] S. Pandruvada *et al.*, “Lack of trusted diagnostic tools for undetermined male infertility,” *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 38, no. 2, pp. 265–276, Feb. 2021, doi: 10.1007/s10815-020-02037-5.
- [132] M. G. Hull *et al.*, “Population study of causes, treatment, and outcome of infertility,” *BMJ*, vol. 291, no. 6510, pp. 1693–1697, Dec. 1985, doi: 10.1136/bmj.291.6510.1693.
- [133] G. Tomaiuolo, F. Fellico, V. Preziosi, and S. Guido, “Semen rheology and its relation to male infertility,” *Interface Focus*, vol. 12, no. 6, Dec. 2022, doi: 10.1098/rsfs.2022.0048.
- [134] D. De Kretser, “Male infertility,” *The Lancet*, vol. 349, no. 9054, pp. 787–790, Mar. 1997, doi: 10.1016/s0140-6736(96)08341-9.
- [135] Z. P. Patel and C. S. Niederberger, “Male Factor Assessment in Infertility,” *Med. Clin. North Am.*, vol. 95, no. 1, pp. 223–234, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.mcna.2010.08.030.
- [136] B. Bartoov, F. Eltes, M. Reichart, J. Langzam, H. Lederman, and N. Zabludovsky, “Male Fertility Laboratory, Department of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat Gan, Israel”.
- [137] M. K. Samplaski, A. Agarwal, R. Sharma, and E. Sabanegh, “New generation of diagnostic tests for infertility: Review of specialized semen tests,” *Int. J. Urol.*, vol. 17, no. 10, pp. 839–847, Oct. 2010, doi: 10.1111/j.1442-2042.2010.02619.x.
- [138] A. Khatun, M. S. Rahman, and M.-G. Pang, “Clinical assessment of the male fertility,” *Obstet. Gynecol. Sci.*, vol. 61, no. 2, p. 179, 2018, doi: 10.5468/ogs.2018.61.2.179.
- [139] “Who laboratory manual 2021 6th edition.”
- [140] D. Durairajanayagam, D. Singh, A. Agarwal, and R. Henkel, “Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction,” *Andrologia*, vol. 53, no. 1, Feb. 2021, doi: 10.1111/and.13666.
- [141] A. Cassina, P. Silveira, L. Cantu, J. M. Montes, R. Radi, and R. Sapiro, “Defective Human Sperm Cells Are Associated with Mitochondrial Dysfunction and Oxidant Production1,” *Biol. Reprod.*, vol. 93, no. 5, Nov. 2015, doi: 10.1095/biolreprod.115.130989.
- [142] P. Irigoyen, S. Mansilla, L. Castro, A. Cassina, and R. Sapiro, “Mitochondrial function and reactive oxygen species production during human sperm capacitation: Unraveling key players,” *FASEB J.*, vol. 38, no. 4, p. e23486, Feb. 2024, doi: 10.1096/fj.202301957RR.
- [143] C. O’Flaherty, M. Beconi, and N. Beorlegui, “Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa,” *Andrologia*, vol. 29, no. 5, pp. 269–275, Apr. 2009, doi: 10.1111/j.1439-0272.1997.tb00481.x.
- [144] S. Vertika, K. K. Singh, and S. Rajender, “Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility – An update,” *Mitochondrion*, vol. 54, pp. 26–40, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.mito.2020.06.003.
- [145] C. J. De Jonge *et al.*, “Current global status of male reproductive health,” *Hum. Reprod. Open*, vol. 2024, no. 2, p. hoae017, Mar. 2024, doi: 10.1093/hropen/hoae017.
- [146] R. Menkveld, C. A. Holleboom, and J. P. Rhemrev, “Measurement and significance of sperm morphology,” *Asian J. Androl.*, vol. 13, no. 1, pp. 59–68, Jan. 2011, doi: 10.1038/aja.2010.67.
- [147] K. Coetzee, “Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review,” *Hum. Reprod. Update*, vol. 4, no. 1, pp. 73–82, Jan. 1998, doi: 10.1093/humupd/4.1.73.
- [148] J. Van Waart, “Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review,” *Hum. Reprod. Update*, vol. 7, no. 5, pp. 495–500, Sep. 2001, doi: 10.1093/humupd/7.5.495.

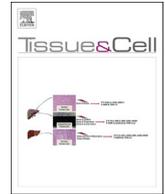
- [149] T. F. Kruger *et al.*, "Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization," *Fertil. Steril.*, vol. 46, no. 6, pp. 1118–1123, Dec. 1986, doi: 10.1016/S0015-0282(16)49891-2.
- [150] B. Bartoov, F. Eltes, M. Reichart, J. Langzam, H. Lederman, and N. Zabludovsky, "QUANTITATIVE ULTRAMORPHOLOGICAL ANALYSIS OF HUMAN SPERM: FIFTEEN YEARS OF EXPERIENCE IN THE DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF MALE FACTOR INFERTILITY," *Arch. Androl.*, vol. 43, no. 1, pp. 13–25, Jan. 1999, doi: 10.1080/014850199262698.
- [151] B. Baccetti *et al.*, "Morphogenesis of the decapitated and decaudated sperm defect in two brothers," *Gamete Res.*, vol. 23, no. 2, pp. 181–188, Jun. 1989, doi: 10.1002/mrd.1120230205.
- [152] L. Lalonde, J. Langlais, P. Antaki, A. Chapdelaine, K. D. Roberts, and G. Bleau, "Male infertility associated with round-headed acrosomeless spermatozoa," *Fertil. Steril.*, vol. 49, no. 2, pp. 316–321, Feb. 1988, doi: 10.1016/S0015-0282(16)59722-2.
- [153] H. E. Chemes, C. Carizza, F. Scarinci, S. Brugo, N. Neuspiller, and L. Schwarsztein, "Lack of a head in human spermatozoa from sterile patients: a syndrome associated with impaired fertilization," *Fertil. Steril.*, vol. 47, no. 2, pp. 310–316, Feb. 1987, doi: 10.1016/S0015-0282(16)50011-9.
- [154] V. Y. Rawe, "A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage," *Hum. Reprod.*, vol. 17, no. 9, pp. 2344–2349, Sep. 2002, doi: 10.1093/humrep/17.9.2344.
- [155] M. Albert *et al.*, "Unexplained in-vitro fertilization failure: implication of acrosomes with a small reacting region, as revealed by a monoclonal antibody," *Hum. Reprod.*, vol. 7, no. 9, pp. 1249–1256, Oct. 1992, doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137836.
- [156] D. Escalier, "Arrest of flagellum morphogenesis with fibrous sheath immaturity of human spermatozoa," *Andrologia*, vol. 38, no. 2, pp. 54–60, Apr. 2006, doi: 10.1111/j.1439-0272.2006.00711.x.
- [157] H. E. Chemes *et al.*, "Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men".
- [158] D. Escalier and M. Albert, "New fibrous sheath anomaly in spermatozoa of men with consanguinity," *Fertil. Steril.*, vol. 86, no. 1, p. 219.e1-219.e9, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.12.042.
- [159] M. F. Skowronek, G. Casanova, J. Alciaturi, A. Capurro, J. M. Montes, and R. Sapiro, "Ultrastructural analysis of sperm neck in patients with idiopathic infertility," *Acta Microsc.*, vol. 19, no. 3, pp. 242–251, 2010.
- [160] M. F. Skowronek, J. Alciaturi, G. Casanova, A. Capurro, J. M. Montes, and R. Sapiro, "Value of quantitative ultramorphological sperm analysis in infertile men," *Reprod. Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 125–139, Jul. 2010, doi: 10.1016/S1642-431X(12)60055-2.
- [161] F. Skowronek *et al.*, "DNA sperm damage correlates with nuclear ultrastructural sperm defects in teratozoospermic men: DNA damage and nuclear sperm defects," *Andrologia*, vol. 44, no. 1, pp. 59–65, Feb. 2012, doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01106.x.
- [162] H. E. Chemes and C. Alvarez Sedo, "Tales of the Tail and Sperm Head Aches Changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail," *Asian J. Androl.*, vol. 14, no. 1, pp. 14–23, Jan. 2012, doi: 10.1038/aja.2011.168.
- [163] A. J. Mundy, T. A. Ryder, and D. K. Edmonds, "Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece," *Hum. Reprod.*, vol. 10, no. 1, pp. 116–119, Jan. 1995, doi: 10.1093/humrep/10.1.116.
- [164] B. Bartoov and G. Y. Messer, "Isolation of mitochondria from ejaculated ram spermatozoa," *J. Ultrastruct. Res.*, vol. 57, no. 1, pp. 68–76, Oct. 1976, doi: 10.1016/S0022-5320(76)80056-1.
- [165] R. A. Cardullo and J. M. Baltz, "Metabolic regulation in mammalian sperm: Mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency," *Cell Motil.*, vol. 19, no. 3, pp. 180–188, Jan. 1991, doi: 10.1002/cm.970190306.
- [166] T. Folgerø, K. Bertheussen, S. Lindal, T. Torbergsen, and P. Øian, "Andrology:

- Mitochondrial disease and reduced sperm motility," *Hum. Reprod.*, vol. 8, no. 11, pp. 1863–1868, Nov. 1993, doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137950.
- [167] F. Pelliccione *et al.*, "Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia," *Fertil. Steril.*, vol. 95, no. 2, pp. 641–646, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.07.1086.
- [168] V. Y. Rawe, R. Hermes, F. N. Nodar, G. Fiszbajn, and H. E. Chemes, "Results of intracytoplasmic sperm injection in two infertile patients with abnormal organization of sperm mitochondrial sheaths and severe asthenoteratozoospermia," *Fertil. Steril.*, vol. 88, no. 3, pp. 649–653, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.12.074.
- [169] G. Collodel, M. G. Federico, N. A. Pascarelli, M. Geminiani, T. Renieri, and E. Moretti, "A case of severe asthenozoospermia: a novel sperm tail defect of possible genetic origin identified by electron microscopy and immunocytochemistry," *Fertil. Steril.*, vol. 95, no. 1, p. 289.e11-289.e16, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.05.029.
- [170] E. Moretti, N. A. Pascarelli, M. G. Federico, T. Renieri, and G. Collodel, "Abnormal elongation of midpiece, absence of axoneme and outer dense fibers at principal piece level, supernumerary microtubules: a sperm defect of possible genetic origin?," *Fertil. Steril.*, vol. 90, no. 4, p. 1201.e3-1201.e8, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.050.
- [171] J. Costa, P. C. Braga, I. Rebelo, P. F. Oliveira, and M. G. Alves, "Mitochondria Quality Control and Male Fertility," *Biology*, vol. 12, no. 6, p. 827, Jun. 2023, doi: 10.3390/biology12060827.
- [172] Y. Yoon, "Morphological control of mitochondrial bioenergetics," *Front. Biosci.*, vol. 20, no. 2, pp. 229–246, 2015, doi: 10.2741/4306.
- [173] D. Marr, "Approaches to Biological Information Processing: *Physics and Mathematics of the Nervous System* . Proceedings of a summer school, Trieste, Italy, Aug. 1973. M. Conrad, W. Güttinger, and M. Dal Cin, Eds. Springer-Verlag, New York, 1974. xiv, 584 pp., illus. Paper, \$18.50. Lecture Notes in Mathematics, vol. 4.," *Science*, vol. 190, no. 4217, pp. 875–876, Nov. 1975, doi: 10.1126/science.190.4217.875.
- [174] S. J. Kiniry, A. M. Michel, and P. V. Baranov, "Computational methods for ribosome profiling data analysis," *WIREs RNA*, vol. 11, no. 3, p. e1577, May 2020, doi: 10.1002/wrna.1577.
- [175] M. Herrera and A. Moreno, "ANÁLISIS MORFOLÓGICO EN EL PROCESAMIENTO ÓPTICO-DIGITAL DE IMÁGENES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DISQUINESIA CILIAR," *Inf. Tecnológica*, vol. 25, no. 1, pp. 33–40, 2014, doi: 10.4067/S0718-07642014000100005.
- [176] L. Kamensky *et al.*, "Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software," *Bioinformatics*, vol. 27, no. 8, pp. 1179–1180, Apr. 2011, doi: 10.1093/bioinformatics/btr095.
- [177] L. Kamensky *et al.*, "Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software," *Bioinformatics*, vol. 27, no. 8, pp. 1179–1180, Apr. 2011, doi: 10.1093/bioinformatics/btr095.
- [178] A. T. Szafran and M. A. Mancini, "The myImageAnalysis Project: A Web-Based Application for High-Content Screening," *ASSAY Drug Dev. Technol.*, vol. 12, no. 1, pp. 87–99, Jan. 2014, doi: 10.1089/adt.2013.532.
- [179] W. Georgescu, J. P. Wikswo, and V. Quaranta, "CellAnimation: an open source MATLAB framework for microscopy assays," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 1, pp. 138–139, Jan. 2012, doi: 10.1093/bioinformatics/btr633.
- [180] E. T. Arena, C. T. Rueden, M. C. Hiner, S. Wang, M. Yuan, and K. W. Eliceiri, "Quantitating the cell: turning images into numbers with IMAGEJ," *WIREs Dev. Biol.*, vol. 6, no. 2, p. e260, Mar. 2017, doi: 10.1002/wdev.260.
- [181] A. Shariff, J. Kangas, L. P. Coelho, S. Quinn, and R. F. Murphy, "Automated Image Analysis for High-Content Screening and Analysis," *SLAS Discov.*, vol. 15, no. 7, pp. 726–734, Aug. 2010, doi: 10.1177/1087057110370894.
- [182] T. Ahmad *et al.*, "Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state," *Cell Death Dis.*, vol. 4, no. 1, pp. e461–e461, Jan. 2013, doi:

- 10.1038/cddis.2012.213.
- [183] A. Lucchi, K. Smith, R. Achanta, G. Knott, and P. Fua, "Supervoxel-Based Segmentation of Mitochondria in EM Image Stacks With Learned Shape Features," *IEEE Trans. Med. Imaging*, vol. 31, no. 2, pp. 474–486, Feb. 2012, doi: 10.1109/TMI.2011.2171705.
- [184] A. Lucchi, C. Becker, P. Márquez Neila, and P. Fua, "Exploiting Enclosing Membranes and Contextual Cues for Mitochondria Segmentation," in *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2014*, vol. 8673, P. Golland, N. Hata, C. Barillot, J. Hornegger, and R. Howe, Eds., in Lecture Notes in Computer Science, vol. 8673, Cham: Springer International Publishing, 2014, pp. 65–72. doi: 10.1007/978-3-319-10404-1\_9.
- [185] G. A. Perkins, M. G. Sun, and T. G. Frey, "Chapter 2 Correlated Light and Electron Microscopy/Electron Tomography of Mitochondria In Situ," in *Methods in Enzymology*, vol. 456, Elsevier, 2009, pp. 29–52. doi: 10.1016/S0076-6879(08)04402-9.
- [186] F. J. Timmermans and C. Otto, "Contributed Review: Review of integrated correlative light and electron microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 86, no. 1, p. 011501, Jan. 2015, doi: 10.1063/1.4905434.
- [187] S. Jakobs, "High resolution imaging of live mitochondria," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1763, no. 5–6, pp. 561–575, May 2006, doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.04.004.
- [188] S. Jakobs, S. Stoldt, and D. Neumann, "Light Microscopic Analysis of Mitochondrial Heterogeneity in Cell Populations and Within Single Cells," in *High Resolution Microbial Single Cell Analytics*, vol. 124, S. Müller and T. Bley, Eds., in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol. 124, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, pp. 1–19. doi: 10.1007/10\_2010\_81.
- [189] S. Jakobs and C. A. Wurm, "Super-resolution microscopy of mitochondria," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 20, pp. 9–15, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.cbpa.2014.03.019.
- [190] W. Zou *et al.*, "Application of super-resolution microscopy in mitochondria-dynamic diseases," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 200, p. 115043, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.addr.2023.115043.
- [191] K. Tanji and E. Bonilla, "Light microscopic methods to visualize mitochondria on tissue sections," *Methods*, vol. 46, no. 4, pp. 274–280, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.ymeth.2008.09.027.
- [192] K. Tanji, "Morphological Assessment of Mitochondrial Respiratory Chain Function on Tissue Sections," in *Mitochondrial Disorders*, vol. 837, L.-J. C. Wong, Ph.D., Ed., in Methods in Molecular Biology, vol. 837, Totowa, NJ: Humana Press, 2012, pp. 181–194. doi: 10.1007/978-1-61779-504-6\_12.
- [193] S. Franco-Iborra and K. Tanji, "Histochemical and immunohistochemical staining methods to visualize mitochondrial proteins and activity," in *Methods in Cell Biology*, vol. 155, Elsevier, 2020, pp. 247–270. doi: 10.1016/bs.mcb.2019.11.024.
- [194] P. Irigoyen, P. Pintos-Polasky, L. Rosa-Villagran, M. F. Skowronek, A. Cassina, and R. Sapiro, "Mitochondrial metabolism determines the functional status of human sperm and correlates with semen parameters," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 10, p. 926684, Aug. 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.926684.
- [195] M. Courtade, C. Lagorce, L. Bujan, C. Caratero, and R. Mieuisset, "Clinical characteristics and light and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia," *Fertil. Steril.*, vol. 70, no. 2, pp. 297–304, Aug. 1998, doi: 10.1016/S0015-0282(98)00152-6.
- [196] F. Gallon, C. Marchetti, N. Jouy, and P. Marchetti, "The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability," *Fertil. Steril.*, vol. 86, no. 5, pp. 1526–1530, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.03.055.
- [197] A. Amaral and J. Ramalho-Santos, "Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function," *Int. J. Androl.*, vol. 33, no. 1, Feb. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.00987.x.
- [198] J. Schindelin *et al.*, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis," *Nat.*

- Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jul. 2012, doi: 10.1038/nmeth.2019.
- [199] G. van Rossum and F. L. Drake, *The Python language reference*, Release 3.0.1 [Repr.]. in Python documentation manual / Guido van Rossum; Fred L. Drake [ed.], no. Pt. 2. Hampton, NH: Python Software Foundation, 2010.
- [200] S. Van Der Walt *et al.*, “scikit-image: image processing in Python,” *PeerJ*, vol. 2, p. e453, Jun. 2014, doi: 10.7717/peerj.453.
- [201] J. Liu, “Erratum to ‘A Cosmological Model and Modifications to Einstein’s Theory of Relativity’ [Open Access Library Journal, 3: e2394],” *OALib*, vol. 09, no. 01, pp. 1–24, 2022, doi: 10.4236/oalib.1108286.
- [202] R. Beare, B. Lowekamp, and Z. Yaniv, “Image Segmentation, Registration and Characterization in R with **SimpleITK**,” *J. Stat. Softw.*, vol. 86, no. 8, 2018, doi: 10.18637/jss.v086.i08.
- [203] J. N. Kapur, P. K. Sahoo, and A. K. C. Wong, “A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram,” *Comput. Vis. Graph. Image Process.*, vol. 29, no. 1, p. 140, Jan. 1985, doi: 10.1016/S0734-189X(85)90156-2.
- [204] C. E. Shannon, “A Mathematical Theory of Communication,” *Bell Syst. Tech. J.*, vol. 27, no. 3, pp. 379–423, Jul. 1948, doi: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x.
- [205] J. Broeke, J. M. Mateos Pérez, and J. Pascau, *Image processing with ImageJ: extract and analyze data from complex images with ImageJ, the world’s leading image processing tool, second edition*, 2nd ed. in Community Experience Distilled. Birmingham: Packt Publishing, 2015.
- [206] S. Grunewald and U. Paasch, “Sperm Selection for ICSI Using Annexin V,” in *Spermatogenesis*, vol. 927, D. T. Carrell and K. I. Aston, Eds., in *Methods in Molecular Biology*, vol. 927. , Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 257–262. doi: 10.1007/978-1-62703-038-0\_23.
- [207] J. L. Fernández *et al.*, “Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test,” *Fertil. Steril.*, vol. 84, no. 4, pp. 833–842, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.089.
- [208] F. H. Van Der Merwe, T. F. Kruger, S. C. Oehninger, and C. J. Lombard, “The Use of Semen Parameters to Identify the Subfertile Male in the General Population,” *Gynecol. Obstet. Invest.*, vol. 59, no. 2, pp. 86–91, 2005, doi: 10.1159/000082368.
- [209] S. C. Esteves, “Evolution of the World Health Organization semen analysis manual: where are we?,” *Nat. Rev. Urol.*, vol. 19, no. 7, pp. 439–446, Jul. 2022, doi: 10.1038/s41585-022-00593-2.
- [210] S. Benedetti *et al.*, “Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality,” *Reprod. Biomed. Online*, vol. 25, no. 3, pp. 300–306, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.rbmo.2012.05.011.
- [211] M. Kleshchev, L. Osadchuk, and A. Osadchuk, “Age-Related Changes in Sperm Morphology and Analysis of Multiple Sperm Defects,” *Front. Biosci.-Sch.*, vol. 15, no. 3, p. 12, Sep. 2023, doi: 10.31083/j.fbs1503012.
- [212] G. Van Der Horst, “Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis,” *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 220, p. 106350, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106350.
- [213] E. R. S. Roldan, “Assessments of sperm quality integrating morphology, swimming patterns, bioenergetics and cell signalling,” *Theriogenology*, vol. 150, pp. 388–395, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.017.
- [214] S. E. M. Lewis, “Is sperm evaluation useful in predicting human fertility?,” *Reproduction*, vol. 134, no. 1, pp. 31–40, Jul. 2007, doi: 10.1530/REP-07-0152.
- [215] R. C. Firman and L. W. Simmons, “Sperm midpiece length predicts sperm swimming velocity in house mice,” *Biol. Lett.*, vol. 6, no. 4, pp. 513–516, Aug. 2010, doi: 10.1098/rsbl.2009.1027.
- [216] C. Baro Graf *et al.*, “Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 518, p. 110992, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.mce.2020.110992.
- [217] G. A. Abruzzese, A. Sanchez-Rodriguez, and E. R. S. Roldan, “Sperm Metabolism,”

- Mol. Reprod. Dev.*, vol. 91, no. 10, p. e23772, Oct. 2024, doi: 10.1002/mrd.23772.
- [218] M. Jabłoński *et al.*, “Reorganization of the flagellum scaffolding induces a sperm standstill during fertilization,” *eLife*, vol. 13, p. RP93792, Nov. 2024, doi: 10.7554/eLife.93792.3.
- [219] E. B. Smithwick and L. G. Young, “Ultrastructural Evaluation of the Isolation of Mitochondria-Free Bull Sperm Flagella,” *Biol. Reprod.*, vol. 19, no. 2, pp. 280–290, Sep. 1978, doi: 10.1095/biolreprod19.2.280.
- [220] D. W. Fawcett, “The mammalian spermatozoon,” *Dev. Biol.*, vol. 44, no. 2, pp. 394–436, Jun. 1975, doi: 10.1016/0012-1606(75)90411-X.
- [221] M. Ren *et al.*, “Condensed Mitochondria Assemble Into the Acrosomal Matrix During Spermiogenesis,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 10, p. 867175, Apr. 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.867175.
- [222] L. J. Schiavi-Ehrenhaus, A. Romarowski, M. Jabłoński, D. Krapf, G. M. Luque, and M. G. Buffone, “The early molecular events leading to COFILIN phosphorylation during mouse sperm capacitation are essential for acrosomal exocytosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 298, no. 6, p. 101988, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.jbc.2022.101988.
- [223] E. Brener, S. Rubinstein, G. Cohen, K. Shternall, J. Rivlin, and H. Breitbart, “Remodeling of the Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Capacitation and Acrosome Reaction1,” *Biol. Reprod.*, vol. 68, no. 3, pp. 837–845, Mar. 2003, doi: 10.1095/biolreprod.102.009233.
- [224] A. Romarowski, G. M. Luque, F. A. La Spina, D. Krapf, and M. G. Buffone, “Role of Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis,” in *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*, vol. 220, M. G. Buffone, Ed., in *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, vol. 220, Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 129–144. doi: 10.1007/978-3-319-30567-7\_7.
- [225] A. Romarowski *et al.*, “Super-resolution imaging of live sperm reveals dynamic changes of the actin cytoskeleton during acrosomal exocytosis,” *J. Cell Sci.*, vol. 131, no. 21, p. jcs218958, Nov. 2018, doi: 10.1242/jcs.218958.
- [226] M. G. Gervasi, X. Xu, B. Carbajal-Gonzalez, M. G. Buffone, P. E. Visconti, and D. Krapf, “The actin cytoskeleton of the mouse sperm flagellum is organized in a helical structure,” *J. Cell Sci.*, vol. 131, no. 11, p. jcs215897, Jun. 2018, doi: 10.1242/jcs.215897.
- [227] A. Hinton *et al.*, “Mitochondrial Structure and Function in Human Heart Failure,” *Circ. Res.*, vol. 135, no. 2, pp. 372–396, Jul. 2024, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.124.323800.
- [228] B. Baccetti *et al.*, “Notulae Seminologicae. 5. Mathematical Evaluation of Interdependent Submicroscopic Sperm Alterations,” *J. Androl.*, vol. 16, no. 4, pp. 356–371, Jul. 1995, doi: 10.1002/j.1939-4640.1995.tb00541.x.
- [229] B. Baccetti, S. Capitani, G. Collodel, E. Strehler, and P. Piomboni, “Recent advances in human sperm pathology,” *Contraception*, vol. 65, no. 4, pp. 283–287, Apr. 2002, doi: 10.1016/S0010-7824(02)00290-1.
- [230] B. Baccetti, G. Collodel, and P. Piomboni, “Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9),” *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, vol. 28, no. 4, pp. 587–596, Oct. 1996.
- [231] G. Curti *et al.*, “Morphological evaluation of sperm from infertile men selected by magnetic activated cell sorting (MACS),” *Reprod. Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 289–292, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.repbio.2014.07.002.
- [232] M. Teranishi, J. H. Spodonik, M. Karbowski, C. Kurono, T. Soji, and T. Wakabayashi, “Swelling of free-radical-induced megamitochondria causes apoptosis,” *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 68, no. 2, pp. 104–123, Apr. 2000, doi: 10.1006/exmp.1999.2288.
- [233] M. M. Giaccagli *et al.*, “Capacitation-Induced Mitochondrial Activity Is Required for Sperm Fertilizing Ability in Mice by Modulating Hyperactivation,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, p. 767161, Oct. 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.767161.
- [234] N. Moscatelli *et al.*, “Single-cell-based evaluation of sperm progressive motility via fluorescent assessment of mitochondria membrane potential,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 17931, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-18123-1.



## Morphometric analysis of the sperm midpiece during capacitation

M.F. Skowronek<sup>a,1</sup>, S. Pietroroia<sup>a,1</sup>, D. Silvera<sup>b</sup>, M. Ford<sup>a</sup>, A. Cassina<sup>c,d</sup>, F. Lecumberry<sup>b</sup>, R. Sapiro<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad Académica Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Departamento de Procesamiento de Señales, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>d</sup> Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Sperm midpiece  
Mitochondria  
Image processing  
Capacitation  
Acrosome reaction

### ABSTRACT

In mammalian sperm, mitochondria are very densely packed and form a helical sheath in the midpiece of the flagellum. Mitochondria from somatic cells can rapidly change shape to adapt to environmental conditions. During capacitation, mammalian spermatozoa undergo morphological and physiological changes to acquire fertilization ability, evidenced by changes in sperm motility patterns (hyperactivation) and the ability to perform the acrosome reaction. Whether there are changes in sperm mitochondrial morphology during capacitation is unknown. This work aimed to quantify morphometric changes in the sperm midpiece during capacitation. Using mitochondrial fluorescent probes and a combination of freely available software, we quantified the dimensions and fluorescence intensity of the midpiece. After capacitation, the area occupied by the mitochondria decreased due to a reduction in the width but not the length of the midpiece. The decrease in the area of the midpiece occurred in spermatozoa that underwent the acrosome reaction, suggesting a reorganization of the mitochondria during capacitation. Ultrastructural analysis supported these results. The application of image processing to fluorescence microscopy images may help to identify morphological changes during capacitation.

### 1. Introduction

Mitochondria play several roles in the cell, including oxidative phosphorylation, the coupled production of ATP, lipid metabolism, the control of programmed cell death, calcium buffering, and the production of various signaling metabolites (Rohani et al., 2020; Sprenger and Langer, 2019). Mitochondria morphology is variable and frequently changes accompanying cell metabolism. On the one hand, the shape of the mitochondria significantly influences these functions; on the other hand, cells can rapidly change their mitochondrial shape to adapt to environmental conditions (Zemirli et al., 2018). Furthermore, in different cell types, mitochondria exhibit dynamic behaviors such as fusion, fission, or movement within the cell (Cicero and Manor, 2025; Mishra and Chan, 2016).

In mammalian spermatozoa, the mitochondria are unique, forming a noticeable helical mitochondrial sheath in the flagellum's midpiece

(Amaral et al., 2013; Ho and Wey, 2007). This capsule-like structure provides mechanical stability, protection, and resistance to osmotic changes (Amaral et al., 2013). Furthermore, sperm mitochondria are connected to their neighbors via inter-mitochondrial linkers and to the underlying cytoskeleton through conserved protein arrangements on the outer mitochondrial membrane (Leung et al., 2021). Therefore, sperm mitochondria are prevented from undergoing the same dynamic changes observed in other cell types. Despite these properties, some changes in mitochondrial sperm morphology have been described in both normal and pathological situations (Pelliccione et al., 2011; Vorup-Jensen et al., 1999).

Mammalian sperm acquire fertilization ability during their passage to the female reproductive tract, a process known as capacitation (Austin, 1952; Puga Molina et al., 2018). At the cell biological level, sperm capacitation is recognized by changes in the motility pattern of sperm, known as hyperactivation, and by the preparation of the sperm to

**Abbreviations:** AR, acrosome reaction; COCs, Cumulus-oocyte complexes; IVF, In vitro fertilization; OMM, Outer mitochondrial membrane; SMP, Sperm midpiece; CAP, Capacitated; NC, Non-capacitated; PMSG, Pregnant Mare Serum Gonadotropin; ROI, Region of interest; R, Reacted; NR, Non-reacted; PSA, Pisum sativum Agglutinin lectin; MMP, Mitochondrial membrane potential; St.dev, Standard deviation; TEM, Transmission Electron Microscopy.

\* Correspondence to: Unidad Académica Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, General Flores 2125, Montevideo CP:11800, Uruguay.

E-mail addresses: [rossanasapiro@gmail.com](mailto:rossanasapiro@gmail.com), [rsapiro@fmed.edu.uy](mailto:rsapiro@fmed.edu.uy) (R. Sapiro).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.tice.2025.102866>

Received 4 May 2024; Received in revised form 14 March 2025; Accepted 15 March 2025

Available online 22 March 2025

0040-8166/© 2025 Elsevier Ltd. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

undergo the acrosome reaction (AR) (Stival et al., 2016). Mature sperm carry a secretory vesicle on the apical head surface: the acrosome. Prior to fertilization, the acrosome and the plasma membrane of the sperm fuse through a calcium-dependent event of exocytosis, the AR. Both hyperactivation and AR are required to penetrate the oocyte and achieve fertilization (Cordero-Martínez et al., 2022; Puga Molina et al., 2018; Stival et al., 2016).

In the first electron microscopy studies of the 1960s, the consensus was that capacitation did not cause any morphological changes, except those induced by acrosome loss (García-Herreros and Leal, 2015). Most works are still focused on the sperm head and AR modifications of the cytoskeleton and plasma membrane (Balestrini et al., 2020; García-Herreros and Leal, 2015; Romarowski et al., 2018; Stival et al., 2016). However, limited data indicate that mitochondrial morphology in human sperm undergoes changes during capacitation, possibly due to increased mitochondrial volume (Vorup-Jensen et al., 1999). Wang et al. further demonstrated that capacitated sperm exhibit more defined mitochondrial cristae, potentially linked to changes in the sperm's redox state (Wang et al., 2022). Consequently, and despite the proven importance of mitochondria in the capacitation process (Ferramosca and Zara, 2014; Ferreira et al., 2021; Giaccagli et al., 2021; Irigoyen et al., 2024; Stendardi et al., 2011), little is known about the general structure of the midpiece and mitochondria in capacitated sperm.

Moreover, the growing interest in understanding mitochondrial structure is accompanied by the use of a wealth of new reagents and computational tools to study mitochondrial structure and function. The application of image processing to fluorescence microscope images, as well as the advent of fluorescent probes, can reveal subtle changes in mitochondrial morphology during functional processes. In this work, we developed a tool for analyzing the size, shape, and fluorescence intensity of mitochondria-labeled midpieces of capacitated (CAP) and non-capacitated (NC) mouse sperm. The tool is based on the analysis and quantification of fluorescence images performed with a custom image processing method based on ImageJ/Fiji. Using this tool, we detected a decrease in the midpiece area of CAP sperm, which was associated with a reduction in the width of the midpiece in sperm that underwent the AR. At the ultrastructural level, CAP sperm exhibited a reduction in the width of midpiece cross-sections, consistent with the results obtained through fluorescence microscopy.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and sperm preparation

Sperm were obtained from F1 hybrids in male B6Bc/JF1 mice (12–18 weeks old). (mean  $\pm$  st. dev.). F1 was generated at the School of Medicine, Montevideo-Uruguay by crossbreeding the BALB/c mouse strain with C57BL/6. Both strains were purchased at Jackson Laboratory. The body weight of the F1 animals was  $26.8 \pm 1.8$  g (mean  $\pm$  St. dev.).

All animals were maintained on a 12-hour/12-hour dark-light cycle at a constant temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  with free access to food and water. The mice were killed by cervical dislocation. Sperm were collected from the epididymis of the mice after 15 minutes in 1.5 ml of Global Total GT® medium (Fertilization/LifeGlobal Europe, Brussels Belgium, Ref: LGTF-100) (swim-out). The "Comisión Honoraria de Experimentación Animal" (Uruguay-CHEA) approved the protocol for these experiments.

GT® medium was used for sperm capacitation. GT® was previously placed in a CO<sub>2</sub> incubator to equilibrate the pH according to the manufacturer's instructions.

The sperm suspensions were transferred to preheated CELL-VU chambers (with a depth of 20  $\mu\text{m}$ ) (DRM-600, Millennium Sciences, Inc., CELL-VU®, NY). The sperm concentration and motility were analyzed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system (SCA, Microptic, Barcelona, Spain) under a Nikon (Japan) Eclipse E200 with 100X phase contrast system equipped with a Basler acA780–75gc camera (Germany). The settings used were as follows: acquisition, 30

frames/second; frequency, 60 Hz; head size, 5–70. Sperm cells with hyperactivated motility were classified using the following sperm kinetic parameters: ALH > 8  $\mu\text{m}$ , VCL > 180  $\mu\text{m}/\text{s}$ , and LIN < 50  $\mu\text{m}$ . At least 500 sperm cells were analyzed in each assay.

After motility analysis, the samples were divided into three tubes. One of them was processed immediately (Time 0) and was considered the NC condition. The sperm in the other tubes were incubated for 90 minutes (Time 90') at 37°C in Global Total GT® medium to induce capacitation. In one tube, progesterone (Sigma-Aldrich) (100  $\mu\text{M}$ ) was added to induce AR (Supplementary Figure 1).

### 2.2. Evaluation of the AR by Coomassie Blue

The percentage of acrosome-reacted sperm was determined by placing 15  $\mu\text{l}$  of each sample on glass slides, fixing it in 4 % paraformaldehyde for 30 min, and washing it twice with phosphate-buffered saline (PBS). After washing, the slides were incubated with 0.22 % Coomassie blue (Coomassie Blue G-250; Thermo Scientific, Massachusetts), 50 % methanol, 10 % glacial acetic acid, and 40 % water for 2 min. Excess dye was removed by washing with distilled water. Slides were air-dried, and coverslips were placed on the slides using mounting medium. The stained spermatozoa were examined under a bright field microscope at 400X (Nikon E100, Japan) to verify the percentage of sperm that had undergone AR. At least 200 spermatozoa were evaluated in each experiment. AR was expressed as the percentage of spermatozoa that underwent AR relative to the total number of spermatozoa counted.

### 2.3. In vitro fertilization (IVF)

In brief, female B6Bc/JF1 mice (4 weeks old) were superovulated by intraperitoneal injections of 7.5 IU of PMSG (Syntex, Argentina) or 7.5 IU of HCG (Intervet International B. V-Holanda) 48 hours later. After 24 h, the oviducts were removed, and the cumulus-oocyte complexes (COCs) were transferred to a dish containing a 200  $\mu\text{l}$  drop of GT® (1 M). Sperm was added to IVF drops containing COCs and incubated in 5 % CO<sub>2</sub> at 37°C. Twenty-four hours later, the fertilization rates were recorded. A portion of the cleaved oocytes was transferred into GT® (Ref: LGGT-060) with CO<sub>2</sub> to reach a more advanced stage of embryonic development, confirming the capacitation of the sperm fraction used.

### 2.4. Sperm mitochondria and AR preparation for epifluorescence microscopy

For morphometric analysis of the sperm midpiece (SMP), spermatozoa were incubated with 200 nM MitoTracker™ Red CMXRos-M7512 (Invitrogen, USA) for 30 minutes at 37°C, immediately after swim-out or after the capacitation period (90 minutes) (Supplementary Figure 1).

Then, 50  $\mu\text{l}$  of each sperm sample was added to a glass slide. The sperm were fixed with 4 % PAF for 30 minutes and washed three times in PBS. After fixation, the sperm were incubated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PSA lectin (Pisum Sativum Agglutinin, Biotinylated B-1055-5), an acrosomal marker that allows differentiation between reacted and non-reacted spermatozoa. The nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride.

### 2.5. Microscopy

Slides were observed using an epifluorescent Nikon Eclipse E400 microscope with a 100X, 1.4 NA oil objective (excitation:  $\lambda=488$  nm and  $\lambda=543$  nm). Fluorescence images of at least 100 sperm for each condition were taken and merged with transmitted light microscopy photographs to verify that the head and midpiece were included. Digital photographs were taken with a Nikon DS-Fi3, 5.9 megapixel digital camera and subsequently processed.

## 2.6. Image processing

Between 80 and 100 images were analyzed for each condition and each mouse. Images acquired under the epifluorescence microscope were processed using ImageJ/Fiji (Schindelin et al., 2012) routines implemented in Python (Van Rossum and Drake, 2009).

The images were processed as 8-bit images Gaussian filtered for noise reduction, and automatic segmentation of spermatozoa midpieces was obtained from the MitoTracker channel using the MaxEntropy thresholding method (Kapur et al., 1985). The obtained regions of interest (ROIs) were user-validated and analyzed to obtain only isolated and well-defined midpieces. Mathematical morphology operations were performed to remove sharp peaks and smooth the ROIs. This procedure allows well-defined ROI segmentation of sperm midpieces without the need to know in advance whether they are reacted or not. The results of this process were also validated by the user (see [Supplementary Figure 2](#). a) Several descriptors for shape and fluorescence intensity were automatically calculated for each ROI. These parameters quantify morphological and intensity descriptors such as area, perimeter, circularity, integrated density, and mean fluorescence intensity values. In addition, the average length and width of the SMP were estimated by averaging the distances of selected points in the skeleton of the SMP to its contour ([Supplementary Figure 2](#). b). The following libraries were also used: scikit-image (van der Walt et al., 2014), OpenCV (Bradski, 2000), and SimpleITK (Beare et al., 2018).

Spermatozoa were manually classified as reacted (R) by visual inspection if the green PNA label was absent and as non-reacted (NR) if a clear green cap was present in the sperm head. The morphometric measurements obtained from the SMP were grouped and compared between the R and NR sperm. The means and standard deviations of the measures in each condition were computed and compared ([Supplementary Figure 2](#). c).

Finally, to objectively quantify the fluorescence intensity of the SMPs and normalize the data given by the ROI, a script was created to automatically determine the fluorescence intensity of the background of each image. For this purpose, the sperm structure was isolated from the image, and the average background fluorescence intensity was calculated. This average value was then subtracted from each pixel in the original images to obtain the real fluorescence intensity value of the SMP.

The mean fluorescence intensity of each SMP detected in the background was analyzed and compared under the investigated conditions ([Supplementary Figure 2](#). b and c).

## 2.7. Sperm preparation for transmission electron microscopy (TEM)

Sperm obtained from the epididymis of five mice were analyzed and separated in three conditions (NC, CAP, and CAP with progesterone) as previously described. After that, they were fixed and processed for TEM. The fixation was performed using a mixed solution of 4 % w/v paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer containing 2.5 % v/v glutaraldehyde (pH 7.4) overnight at 4°C, post-fixed in 1 % osmium tetroxide (w/v) for one hour, dehydrated in alcohols of increasing concentration and acetone, and finally embedded in Araldite resin. After polymerization, thin (500 nm) and ultrathin (50–70 nm) sections were obtained on a Leica EM UC6 ultramicrotome with a DIATOME diamond knife. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate followed by lead citrate and examined with a JEOL JEM-1010 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 90 kV. Images of approximately fifty transversal sections across the sperm midpiece were obtained for each condition, recorded, and stored. Images were captured and processed using a Hamamatsu C4742-95 digital camera to obtain qualitative and quantitative information on SMP and mitochondrial morphology. Between 32 and 48 images of the SMP were obtained and semiautomatically processed in each condition by the Fiji ROI manager.

## 2.8. Statistical analysis

After checking the normal distribution of the data using the Shapiro–Wilk normality test, the fluorescence and morphometric values of the ROIs of the midpieces of the NC, CAP, and acrosome-reacted and non-reacted sperm were compared using paired t-tests. The effect of progesterone on NC and CAP sperm was analyzed via ANOVA.  $p < 0.05$  indicated statistical significance. In the case of the percentage of AR and perimeter of midpieces of TEM sections, values were not normally distributed and medians were analyzed with the Kruskal-Wallis test. GraphPad Prism version 9 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA <http://www.graphpad.com>) was used for all analyses.

## 3. Results

### 3.1. Capacitation-associated events after sperm incubation in capacitating media

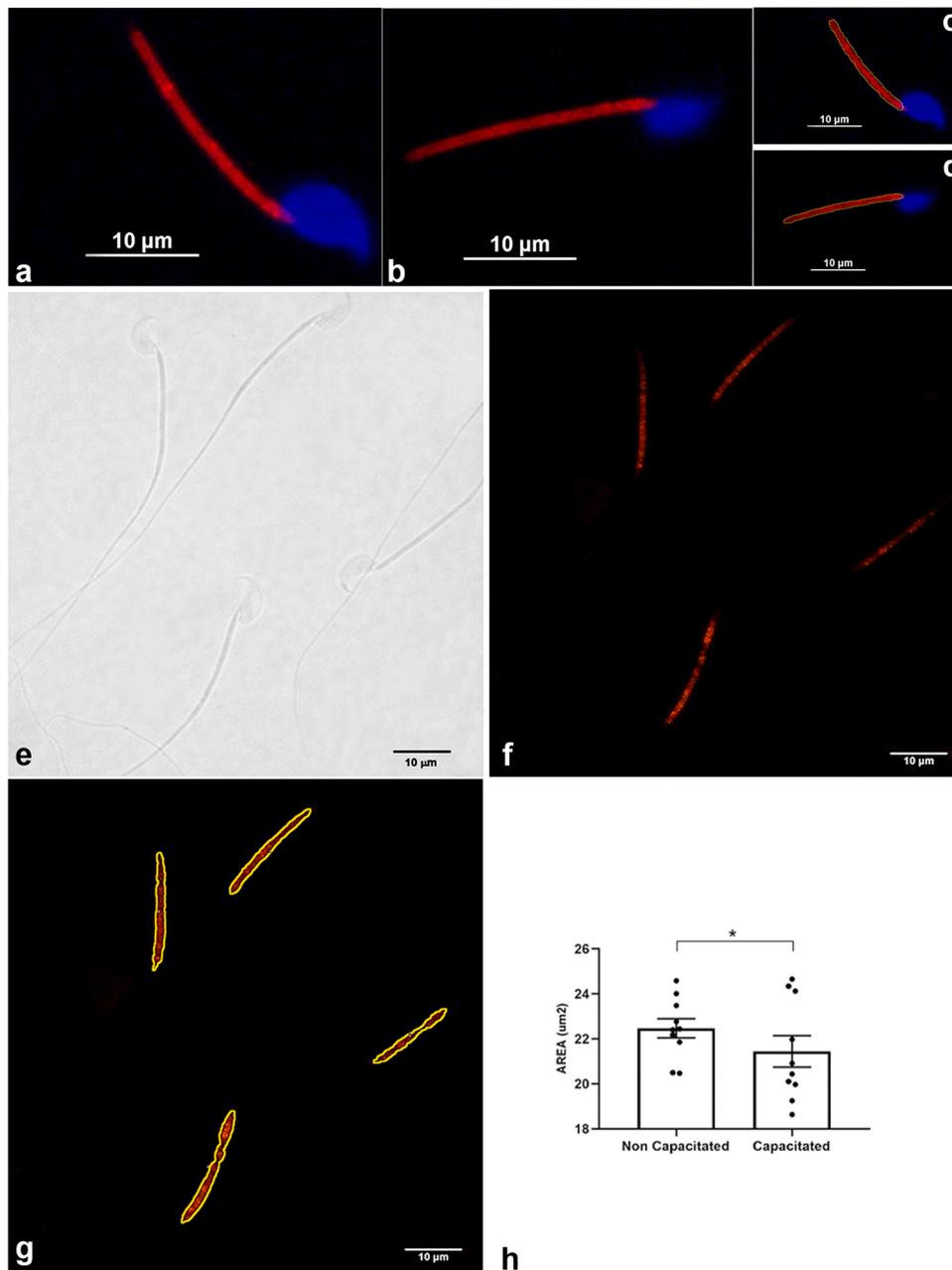
Sperm capacitation is characterized by several events that enable the cell to reach and fertilize the oocytes (Stival et al., 2016). To test sperm capacitation, we first examined three hallmarks of capacitation after 90 minutes of incubation in BSA- and bicarbonate-enriched medium (CAP condition) (see [Supplementary Figure 3](#)). A greater percentage of hyperactivated cells were detected in spermatozoa incubated under capacitating conditions than in those incubated in non-capacitating medium ([Supplementary Figure 3.c](#)) (mean  $\pm$  St. dev. in NC:  $1.3 \pm 0.8$  vs in CAP:  $12.2 \pm 1.8$ ,  $n = 4$ ,  $p = 0.0012$ , paired *t*-test). The mean  $\pm$  St. dev. of the percentage of acrosome-reacted spermatozoa increased in CAP spermatozoa ([Supplementary Figure 3](#). b) (NC:  $6.6 \pm 1.0$ , CAP:  $38.3 \pm 15.9$ . and after induction with progesterone (CAPi):  $49.0 \pm 18.9$ ,  $n = 9$ ,  $p < 0.001$ , Kruskal-Wallis test). In addition, embryo viability was also assessed by obtaining two-cell embryos after 24 hours of FIV (arrows in [Supplementary Figure 3.c](#)) and blastocysts after 96 hours ([Supplementary Figure 3.c](#), image below). Based on these results, we confirmed that the sperm fraction incubated for 90 minutes in a medium enriched with BSA and bicarbonate represented CAP spermatozoa.

### 3.2. The sperm mitochondrial area is reduced under capacitation conditions

Most sperm midpieces were labeled with MitoTracker under both capacitating and NC conditions ([Fig. 1a](#), b, and f). Representative images of NC and CAP sperm are shown in [Fig. 1a](#) and b. Their ROIs were generated ([Fig. 1c](#) and d, respectively). The red fluorescent labeling was confined to the midpiece region of each sperm, consistent with the beginning of the tail in the transmitted light images ([Fig. 1](#). e). The specificity of the labeling allowed us to precisely match the ROIs to the region of the flagellum where the mitochondria are located ([Fig. 1](#) g). The area and width of sperm decreased twenty percent in the representative CAP sperm ([Fig. 1b](#) and d) compared with NC ([Fig. 1a](#) and c). Morphometric analysis of the ROIs provided by the Fiji script showed that the mean  $\pm$  St. dev. of the area of NC sperm was greater than that of CAP sperm ( $22.47 \pm 1.37$  vs.  $21.44 \pm 2.26 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 10$ ,  $p = 0.01$ ), suggesting shrinkage of the midpiece during the process of capacitation ([Fig. 1](#). h).

### 3.3. The area of the sperm midpiece is larger in non-acrosome-reacted sperm than in reacted sperm

To test whether the remodeling of the midpiece is related to the changes that occurred simultaneously in the head of the sperm during capacitation, the area of the midpiece was measured in acrosome-reacted and non-reacted sperm. For this purpose, the population of PSA-labeled spermatozoa was classified by the observer into intact and acrosome-reacted spermatozoa. The latter was performed based on the

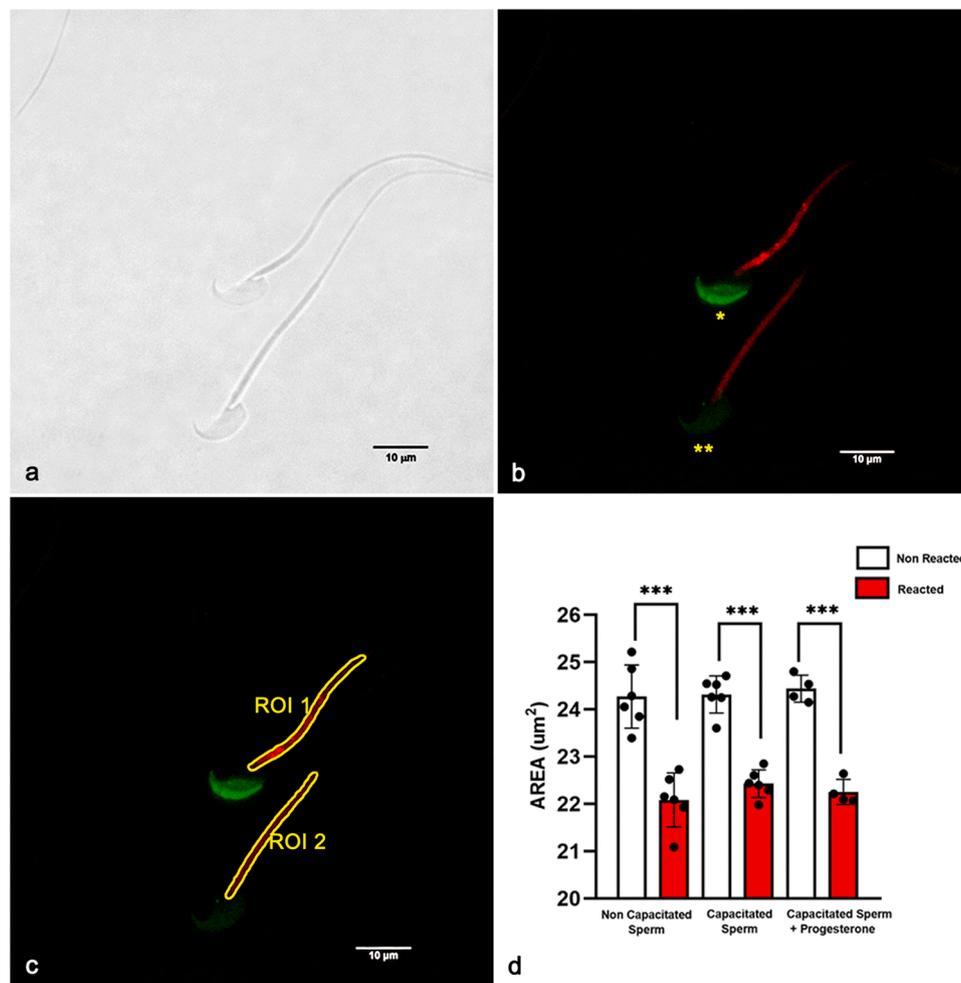


**Fig. 1.** Image processing and morphometric analysis of mouse sperm midpieces under non-capacitated and capacitated conditions. a. Representative image of non-capacitated sperm. b. Capacitated sperm. c. In yellow, the ROI of non-capacitated sperm is shown. d. ROI of capacitated sperm. e. Mouse spermatozoa in a bright field. f. Mouse spermatozoa were loaded with MitoTracker Red, and the sperm midpieces are shown in red. g. Segmentation of the sperm midpiece and determination of ROIs. h. Morphometric parameters (area) in comparison between non-capacitated and capacitated conditions of ten mice. \* $p < 0.05$  paired  $t$ -test.

presence or absence of the green comma-shaped structure covering the sperm head (Fig. 2. b). ROIs were measured in both situations: non-acrosome-reacted sperm (ROI 1 in Fig. 2. c) and acrosome-reacted sperm (ROI 2 in Fig. 2. c).

The area of the midpiece in acrosome-reacted sperm decreased by 8.5 % compared to that in non-acrosome-reacted spermatozoa (mean  $\pm$  St. dev. of non-AR:  $24.33 \pm 0.47$  vs. AR:  $22.25 \pm 0.21 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.0001$ , paired  $t$ -test). A decrease was observed in spontaneous AR occurring in NC spermatozoa (non-AR:  $24.27 \pm 0.66$  vs. AR:  $22.08 \pm 0.56$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 6$ ; paired  $t$ -test) and after the incubation of spermatozoa in CAP medium (non-AR:  $24.31 \pm 0.39$  vs. AR:  $22.43 \pm 0.29$ ,  $p < 0.0001$ , paired  $t$ -test) or in progesterone-induced ARs (non-AR:  $24.44 \pm 0.29$  vs. AR:  $22.25 \pm 0.26$ ,  $p < 0.0001$ , paired  $t$ -test) (Fig. 2d).

We then examined which of the dimensions of the midpiece could explain the observed decrease in the area of acrosome-reacted sperm. Skeletonization of the ROIs allowed us to measure the width and length of the labeled regions (Fig. 3. a - d). The mean  $\pm$  St. dev. of the width decreased in the acrosome-reacted sperm (non-AR:  $0.54 \pm 0.014 \mu\text{m}$  vs. AR:  $0.50 \pm 0.13 \mu\text{m}$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0.001$ , paired  $t$ -test), while the length remained similar (non-AR:  $19.50 \pm 0.49 \mu\text{m}$  vs. AR:  $19.36 \pm 0.68 \mu\text{m}$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.3$ , paired  $t$ -test). A decrease in the width of the midpiece was observed in the three conditions analyzed: NC (non-AR:  $0.53 \pm 0.02 \mu\text{m}$  vs. AR:  $0.51 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.2$ ); CAP (non-AR:  $0.53 \pm 0.00 \mu\text{m}$  vs. AR:  $0.49 \pm 0.00 \mu\text{m}$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0.001$ ); and CAP with progesterone (non-AR:  $0.52 \pm 0.01 \mu\text{m}$  vs. AR:  $0.49 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ,  $n = 4$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 3. f and g).



**Fig. 2. Image processing and morphometric analysis of the mouse sperm midpiece and acrosome reaction.** a. Mouse spermatozoa in a bright field. b. Mouse sperm loaded with MitoTracker Red (sperm midpieces are shown in red) and PSA lectin revealing the state of the acrosomes (acrosomes are shown in green = \*non-acrosome reacted, \*\* acrosome-reacted). c. Segmentation of sperm midpieces and determination of ROIs. d. Morphometric parameters (area) corresponding to the acrosome state of the spermatozoa at the different stages of sperm capacitation (n = 4–6 mice). \*p < 0.05 paired t-test.

### 3.4. Analysis of the mean fluorescence value of the sperm midpiece

The ROIs of the images obtained in Sections 3.2 and 3.3 were reanalyzed after background subtraction (see section M&M and Supplementary Figure 2) to obtain the mean fluorescence value of the sperm midpieces. There were no significant differences between the mean  $\pm$  St. dev. of fluorescence intensity under CAP and NC conditions (NC:  $15.29 \pm 5.64$  vs. under CAP:  $19.23 \pm 7.86$ , n = 10, p = 0.2, paired t-test) Fig. 4. a.

When spermatozoa were classified as non-acrosome reacted or acrosome reacted, as described in 3.3, the mean fluorescence intensity of MitoTracker-labeled flagella was similar between non-acrosome reacted and acrosome-reacted spermatozoa (mean  $\pm$  St. dev. of non-AR:  $31.54 \pm 10.47$  vs. AR:  $31.04 \pm 13.91$ , n = 16 paired t-test; Fig. 4. b) regardless of sperm condition (Fig. 4. c).

### 3.5. Ultrastructural analysis of the sperm midpiece

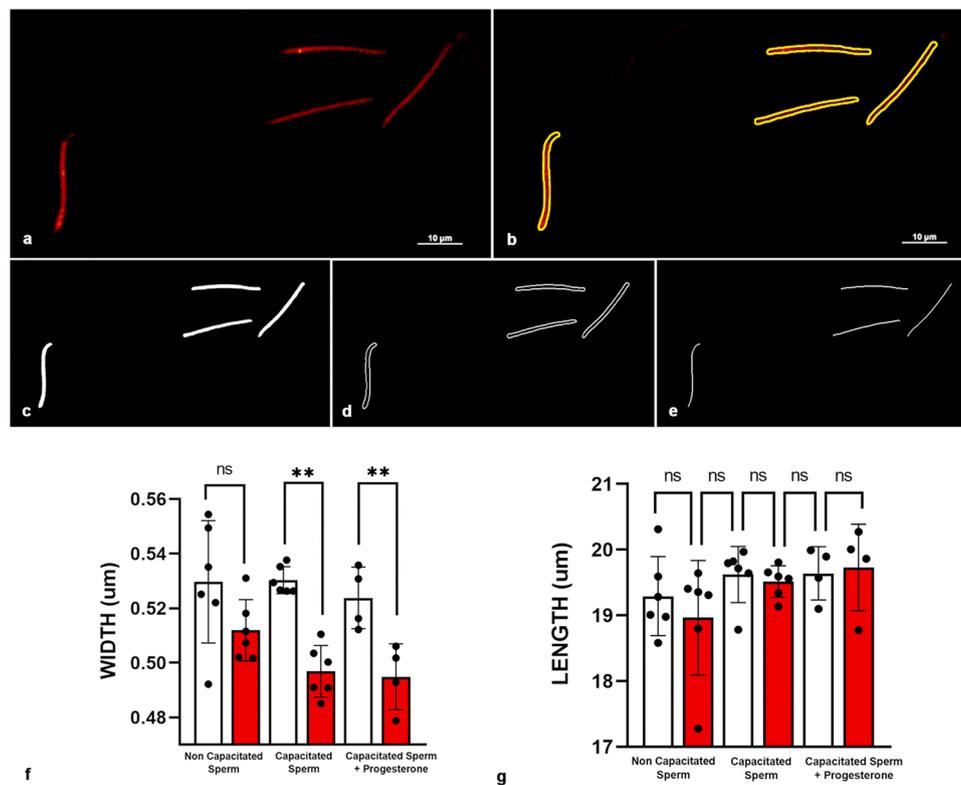
To study the ultrastructural characteristics of the midpiece, sperm from five mice were processed for electron microscopy. Images of between thirty two and forty eight cross-sections of the sperm midpiece were measured and analyzed in each condition (Supplementary Figure 4). In most of the sections studied, the mitochondria were regular and well organized around the axoneme (Fig. 5. a-d). In many of the sections mitochondria from CAP sperm were more proximal to the

axoneme (Fig. 5. c) compared with the NC condition (Fig. 5. a). Some sperm midpiece sections from NC as well as CAP sperm, showed mitochondria with electron-lucent areas between the membranes of the mitochondrial cristae (Fig. 5. b and d).

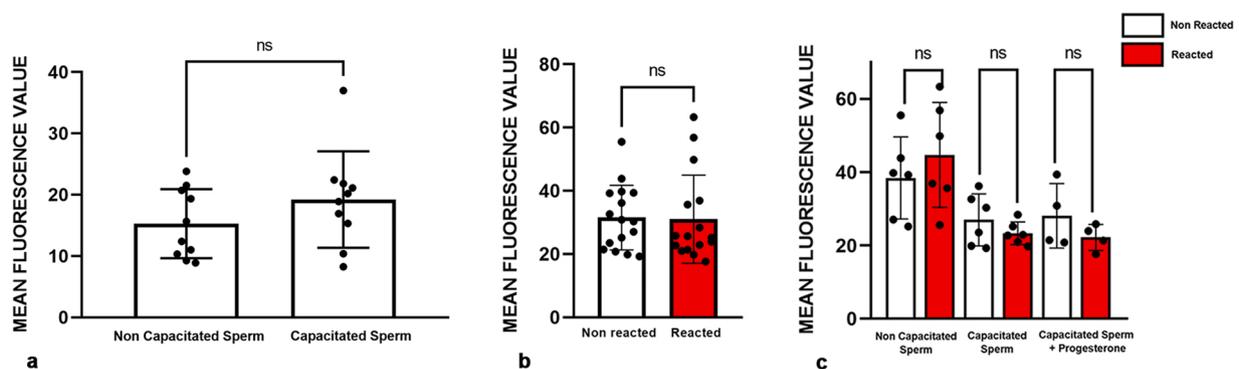
To perform morphometric analysis of the sperm midpiece, the cross-section of each SMP was segmented manually and ROIs were defined (Supplementary Figure 4) Descriptors for shape and size were obtained and statistically analyzed. Ultrastructural quantitative analysis of the sperm midpiece size descriptors confirmed a decrease in the area and perimeter of the SMP of CAP spermatozoa, the mean  $\pm$  Std dev of SMP area and perimeter was smaller in CAP sperm than in NC sperm ( $1,494,687 \pm 360,867$  n = 48 vs  $2,026,211 \pm 607,794$  nm<sup>2</sup>, n = 39 p < 0.0001 and  $4678 \pm 603.8$  n = 48 vs  $5526 \pm 1042$  nm n = 39, p = 0.0002, ANOVA) Supplementary Figure 4 c and d.

## 4. Discussion

The quantification of sperm morphology is critical for assessing sperm quality and predicting fertility success in vivo and in vitro (Benedetti et al., 2012; Björndahl, Kirkman Brown, 2022; Kleshchev et al., 2023; Roldan, 2020, 2018; van der Horst, 2020). In particular, variations in the size and morphology of the midpiece and mitochondria have been associated with male infertility in men with asthenozoospermia (Pelliccione et al., 2011), specifically when genetic conditions are involved (Chang et al., 2024; Li et al., 2024; Rahim et al., 2024;



**Fig. 3.** Image processing and analysis of the dimensions of MitoTracker®-labeled sperm midpiece. a - e: Skeletonization of the ROIs of the sperm midpiece of acrosome-reacted and non-reacted sperm, allowing the determination of the d-width and e-length of the sperm midpiece. Statistical analysis of sperm midpiece width (f) and length (g) comparing reacted and non-reacted spermatozoa under different capacitated conditions (n = 4–6 mice). \* \*p < 0.001, ns: not statistically significant, paired t-test. Clear bars: non-reacted, red bars: reacted sperm.

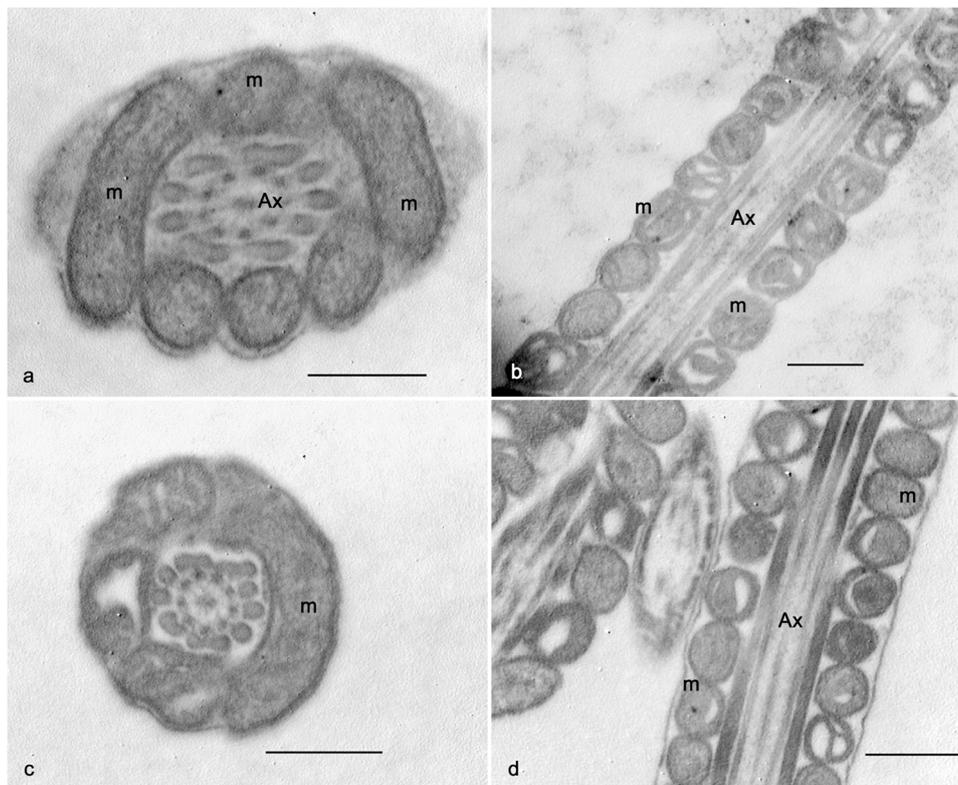


**Fig. 4.** Analysis of the fluorescence of the Mitotracker®-labeled sperm midpiece. a. Mean + /-St. dev. of the mean fluorescence values of the sperm midpiece under CAP and non-CAP conditions (n = 10 mice) b. The sum of the mean fluorescence in AR and non-AR sperm (n = 16 mice) c. Mean fluorescence after CAP condition (n = 4–6 mice). ns= not statistically significant; p = 0.2, paired t-test.

Wang et al., 2025). In addition, midpiece length affects sperm motility and competitiveness in other mammalian species (Boguenet et al., 2021; Firman and Simmons, 2010; Gu et al., 2019). However, the data regarding structural modifications on capacitated sperm are scarce. To bridge this knowledge gap, we performed a morphometric analysis of fluorescently labeled mouse sperm midpieces and mitochondria. Through this analysis we identified modifications of these organelle under CAP and NC conditions but also developed tools for assessing mitochondrial morphology that can detect subtle modifications in sperm regions.

Fluorescence imaging has been extensively used to quantitatively evaluate mitochondrial morphology in other cell types (Landoni et al., 2024; Shan et al., 2024; Sprenger and Langer, 2019; Tronstad et al.,

2014). Computational tools have facilitated the study of mitochondrial network dynamics and changes in mitochondrial area under different conditions (Rohani et al., 2020; Valente et al., 2017). Image processing free software such as Fiji (Schindelin et al., 2012) converts large amounts of complex multichannel image data into quantitative information (Schindelin et al., 2012). However, concerning a specific analysis, the built-in plugins usually do not fulfill all the user requirements. A customized procedure based on the building blocks provided by the software platforms is often required. This is particularly important in the case of the sperm midpiece, where the singular characteristics of mitochondrial organization force the creation of specific tools to analyze the organelle. Due to their size and spiral distribution (Ho and Wey, 2007), mitochondria in sperm are more difficult to distinguish as separate



**Fig. 5.** Ultrastructural analysis of the sperm midpiece. a. and b. Cross and longitudinal sections, respectively, of the midpiece of a non-capacitated sperm. Mitochondria are well organized around the axoneme and the mitochondrial cristae are defined. c. Midpiece of a capacitated sperm. Mitochondria are condensed around the axoneme. No mitochondrial disorganization or ultrastructural alterations are observed. d. Longitudinal section of part of the midpiece of a capacitated sperm. Mitochondrial organization and ultrastructural features are similar to those observed in non-capacitated spermatozoa. m= mitochondria, Ax = axoneme. Bars: 500 nm. m.

entities. To address this, we have developed tools that generate ROIs that encompass the entire midpiece. MitoTracker® diffuses passively through the plasma membrane and accumulates in active mitochondria. The dye is permanently bound to the mitochondria and therefore remains after the cell has died or been fixed (Chazotte, 2011; Kilgore et al., 2013; Poot et al., 1996). Since the probe targets mitochondria, modifications in the midpiece accurately reflect changes in the organelle. Our pipeline enables to semi-automatically process all collected data with a systematic and objective procedure that minimizes or completely avoids human interaction and bias.

Although quantifying structural sperm characteristics is crucial for understanding sperm physiology, few studies have analyzed midpiece morphological changes during capacitation. This is likely due to the assumption that mitochondria in mature sperm are constrained by disulfide bonds, preventing morphological changes. Our findings indicate significant differences in midpiece dimensions between CAP and NC sperm. These results suggest that sperm capacitation involves not only changes at the biochemical (Baro Graf et al., 2020), metabolic (Abruzzese et al., 2024; Balbach et al., 2020) and molecular levels (Delgado-Bermúdez et al., 2025; Puga Molina et al., 2018; Yang et al., 2024) but also morphological modifications. These modifications involve the sperm midpiece and in particular the mitochondria there located. Rather than being static, tightly packed organelles, sperm mitochondria exhibit a degree of dynamism, reorganizing or constricting around the axoneme under specific conditions such as capacitation and the AR. When live cells were imaged during *in vitro* fertilization (Jabłoński et al., 2023), a decrease in the diameter of the midpiece was observed over time after acrosomal exocytosis (Jabłoński et al., 2023). This observation aligns with our results in fixed cells where a decrease in the area of the midpiece, particularly width, was evident in CAP sperm (Fig. 3). A similar decrease in midpiece area was observed in

spontaneous AR or AR induced by a physiological agonist such as progesterone (Fig. 2d and Fig. 3f), which is also consistent with the results of the mentioned authors (Jabłoński et al., 2023).

Our findings do not establish whether these morphological changes result from remodeling of the mitochondria themselves, or involve interactions with other structures present in the SMP. To further investigate mitochondrial modifications during capacitation, we performed TEM and observed that mitochondria in CAP sperm were positioned closer to the axoneme (Fig. 5c). Additionally, the area and perimeter of the midpiece were reduced in CAP spermatozoa compared to NC sperm, corroborating fluorescence microscopy finding. Although expensive and time-consuming, TEM analysis remains the gold standard for analyzing plasma membranes and organelles. TEM has been extensively used to analyze sperm flagella in mammals (Fawcett, 1975; Gu et al., 2019) and has revealed mitochondrial shape changes spermiogenesis (Ren et al., 2022) and cristae variations during capacitation (Wang et al., 2022). Cryo-electron tomography has provided insight into mitochondrial interactions with both other mitochondria and cytoskeleton (Leung et al., 2021). These interactions may be altered during capacitation, warranting further investigation.

Both fluorescence and TEM analyses support the existence of midpiece remodeling during capacitation. We hypothesize that these modifications may be associated with changes in mitochondrial function, which can be assessed via fluorescence labeling of the midpiece, using the same tools developed for morphometry. In our study, MitoTracker® Red labeling revealed no statistical differences in mean fluorescence between NC and CAP sperm midpieces. These data appear contradictory to other studies (Giaccagli et al., 2021), and our previous research (Ferreira et al., 2021), which revealed an increase in the MMP level in CAP sperm compared to that in NC sperm. Sperm capacitation entails increased energy demands. Despite the efficiency of oxidative

phosphorylation, glycolysis is considered the preferred metabolic pathway for capacitation and hyperactivation (Abuzzese et al., 2024; Goodson et al., 2012; Tourmente et al., 2022). Consequently, the source of ATP in this process remains a subject of ongoing debate. Our group has previously shown that mitochondrial activity including oxygen consumption, membrane potential and ATP/ADP exchange increases during sperm capacitation (Ferreira et al., 2021). These findings suggest that the observed changes in mitochondrial morphology may be associated with enhanced mitochondrial function. The MMP depends on mitochondrial function and dysfunction and has already been monitored in spermatozoa with different cationic fluorescent probes using flow cytometry, epifluorescence, or confocal microscopy (Amaral and Ramalho-Santos, 2010). For instance, Moscatelli et al. used MitoTracker Green to distinguish between sperm with active and non-active mitochondria (Moscatelli et al., 2017). Each of the chemicals in the “mitotracker” family has different properties, and there is not complete consistency in the use of all these probes to determine the functional status of the cells. For microscopy images of fixed spermatozoa, Amaral and Ramalho-Santos suggested monitoring the MMP of sperm while coincubating the cells with viability probes and expressing the results as a percentage of live spermatozoa (Amaral and Ramalho-Santos, 2010). Although the lack of specificity in monitoring the MMP of the chosen probe (without the combination with other functional markers) may be considered a weakness of this work, the fact that we were able to quantify the mitochondrial morphology and fluorescence simultaneously is proof of the instrument’s function. In the future, the developed tools should be tested with other probes that can monitor both the form and function of sperm mitochondria.

Additionally, we did not investigate the underlying mechanisms responsible for the observed reduction in sperm midpiece width during capacitation. However, our findings suggest that this contraction is associated with the AR (Figs. 2d and 3f). Cytoskeletal remodeling is a well-documented feature of the AR (Schiavi-Ehrenhaus et al., 2022), yet little is known about possible changes in the flagellar cytoskeleton during capacitation (Jabłoński et al., 2024; Brener et al., 2003; Jabłoński et al., 2023; Romarowski et al., 2018). The flagellar cytoskeleton consists primarily of the axoneme, composed of nine doublets and a central pair of microtubules (Fawcett, 1975). Recent findings have shown that a double helix arrangement of polymerized actin accompanies the mitochondria in the midpiece of the mouse sperm flagellum. This spatial distribution does not extend to the principal piece, where actin is evenly distributed between the axoneme and the plasma membrane (Gervasi et al., 2018). The regulation of acrosomal exocytosis involves changes in the actin cytoskeleton in addition to other signaling pathways (Brener et al., 2003; Romarowski et al., 2018, 2016). The actin cytoskeleton of flagella is a plausible candidate for involvement in the observed constraint of the midpiece during AR. Although our ultrastructural analysis did not delve into the cytoskeletal analysis, a more exhaustive and better-resolution study should be performed. Moreover, it was also observed that the midpiece contraction is calcium-dependent and required for motility cessation after initiating sperm-oocyte fusion (Jabłoński et al., 2023). Our previous work demonstrated increased mitochondrial calcium concentration during capacitation (Ferreira et al., 2021), raising the possibility that mitochondrial activity influences midpiece remodeling. This remodeling may alter the metabolic status of mitochondria, which are integral to sperm function. Future studies will explore these hypotheses to uncover novel mechanisms underlying mammalian fertilization.

## 5. Conclusions

The evaluation of sperm morphology and function is crucial for estimating sperm fertilization capacity. This study provides quantitative evidence that mammalian sperm mitochondria undergo morphological changes during capacitation. Specifically, we observed a decrease in the midpiece area, primarily due to a reduction in its width, which was

associated with spermatozoa undergoing the acrosome reaction. These findings suggest that mitochondrial reorganization may be a previously unrecognized aspect of capacitation, potentially influencing sperm function and fertilization success. Ultrastructural analysis further supported these observations, reinforcing the significance of mitochondrial dynamics in sperm physiology, despite the anatomical constraints of mitochondria existing in the midpiece. Our study highlights the utility of fluorescence microscopy combined with image processing techniques in detecting subtle morphological changes of the organelle. Future research should investigate the molecular mechanisms driving these mitochondrial changes and their functional implications for sperm motility and fertilization. Importantly, the tools and findings presented in this work hold potential for research and clinical applications and, more importantly, suggest novel roles for mitochondrial morphology during capacitation.

## Ethics approval and consent to participate

Animal data were obtained under protocols that were approved by "Comisión Honoraria de Experimentación Animal" CHEA as is stated in M&M: The "Comisión Honoraria de Experimentación Animal" (Uruguay-CHEA) approved the protocol for these experiments. All methods were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011): Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council, Eighth Edition. <http://www.nap.edu/catalog/12910.html> and FELASA Ecuer E, Boxall J, Louwerse AL, Mikkelsen LF, Moons CP, Roth M, Spiri AM. FELASA recommendations for the rehoming of animals used for scientific and educational purposes following Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and Lab Anim. 2023 Oct;57(5):572–582. doi: 10.1177/00236772231158863.

## Funding

Financial support for this work was received from:

Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC I+D 2020, ID23), Espacio Interdisciplinario, Núcleos 2015, Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Universidad de la República (UdelaR).

Chan Zuckerberg Initiative. Expanding Global Access to Bioimaging. Grant: Bioimage Acquisition and Processing Core: Building Skills in Biomedicine.

## CRediT authorship contribution statement

**Rossana Sapiro:** Writing – original draft, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Federico Lecumberry:** Software, Resources, Project administration, Investigation, Data curation. **Adriana Cassina:** Validation, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Mariana Ford:** Methodology, Investigation, Conceptualization. **Diego Silvera:** Software, Methodology, Data curation. **Santiago Pietroroia:** Software, Methodology, Investigation, Conceptualization. **María Fernanda Skowronek:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization.

## Authors' contributions

**S.P.** collected the samples. **M.F.** evaluated the AR by Coomassie blue and IVF. **M.F.S.** performed the sperm mitochondria and AR preparation for epifluorescence microscopy and microscopy. **S.P.**, **D.S.**, **F.L.** and **M.F.S.** performed image processing. **R.S.**, **F.L.** and **M.F.S.** drafted the manuscript. **R.S.**, **M.F.S.**, **F.L.**, and **A.C.** revised the manuscript. **R.S.** conceived and supervised the project. All the authors have read and approved the final manuscript.

## Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work the authors used Chat GPT (<https://chatgpt.com/>) in order to improve language and correct grammar mistakes. After using this tool, the author reviewed and edited the content as needed and take full responsibility for the content of the publication.

## Declaration of Competing Interest

The authors do not declare conflict of interest.

## Acknowledgments

Not applicable.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.tice.2025.102866](https://doi.org/10.1016/j.tice.2025.102866).

## Data availability

Data will be made available on request.

## References

- Abruzzese, G.A., Sanchez-Rodriguez, A., Roldan, E.R.S., 2024. Sperm metabolism. *Mol. Reprod. Dev.* 91, e23772.
- Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M., Ramalho-Santos, J., 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0178>.
- Amaral, A., Ramalho-Santos, J., 2010. Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function. *Int. J. Androl.* 33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00987.x>.
- Austin, C.R., 1952. The "Capacitation" of the Mammalian Sperm. *Nature* 170, 326.
- Balbach, M., Gervasi, M.G., Hidalgo, D.M., Visconti, P.E., Levin, L.R., Buck, J., 2020. Metabolic changes in mouse sperm during capacitation. *Biol. Reprod.* 103, 791–801.
- Balestrini, P.A., Jablonski, M., Schiavi-Ehrenhaus, L.J., Marín-Briggiler, C.I., Sánchez-Cárdenas, C., Darszon, A., Krapf, D., Buffone, M.G., 2020. Seeing is believing: current methods to observe sperm acrosomal exocytosis in real time. *Mol. Reprod. Dev.* 87, 1188–1198.
- Baro Graf, C., Ritagliati, C., Stival, C., Luque, G.M., Gentile, I., Buffone, M.G., Krapf, D., 2020. Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 518, 110992.
- Beare, R., Lowekamp, B., Yaniv, Z., 2018. Image segmentation, registration and characterization in R with SimpleTK. *J. Stat. Softw.* 86. <https://doi.org/10.18637/jss.v086.i08>.
- Benedetti, S., Tagliamonte, M.C., Catalani, S., Primiterra, M., Canestrari, F., Stefani, S.D., Palini, S., Bulletti, C., 2012. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reprod. Biomed. Online* 25, 300–306.
- Björndahl, L., Kirkman Brown, J., 2022. The sixth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: ensuring quality and standardization in basic examination of human ejaculates (other Editorial Board Members of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen). *Fertil. Steril.* 117, 246–251.
- Boguenet, M., Bouet, P.-E., Spiers, A., Reynier, P., May-Panloup, P., 2021. Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility. *Hum. Reprod. Update* 27, 697–719.
- Bradski, G., 2000. The OpenCV library. *Dr. Dobb's J. Softw. Tools*.
- Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J., Breitbart, H., 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 68, 837–845.
- Chang, T., Tang, H., Zhou, X., He, J., Liu, N., Li, Y., Xiang, W., Yao, Z., 2024. A novel homozygous nonsense variant of AK7 is associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Reprod. Biomed. Online* 48, 103765.
- Chazotte, B., 2011. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011, 990–992.
- Cicero, J., Manor, U., 2025. Beyond static snapshots: mitochondria in action. *Curr. Opin. Cell Biol.* 92, 102460.
- Cordero-Martínez, J., Jiménez-Gutiérrez, G.E., Aguirre-Alvarado, C., Alacántara-Farfán, V., Chamorro-Cevallos, G., Roa-Espitia, A.L., Hernández-González, E.O., Rodríguez-Páez, L., 2022. Participation of signaling proteins in sperm hyperactivation. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 68, 315–330.
- Delgado-Bermúdez, A., Yeste, M., Bonet, S., Pinart, E., 2025. 184-201 10.1111/andr.13606 i Physiological role of potassium channels in mammalian germ cell differentiation, maturation, and capacitation. 2024 03 04. *Andrology* 13, 184–201.
- Fawcett, D.W., 1975. The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 44, 394–436.
- Ferramosca, A., Zara, V., 2014. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed. Res. Int.* 2014, 902953.
- Ferreira, J.J., Cassina, A., Irigoyen, P., Ford, M., Pietroroia, S., Peramsetty, N., Radi, R., Santi, C.M., Sapiro, R., 2021. Increased mitochondrial activity upon CatSper channel activation is required for mouse sperm capacitation. *Redox Biol.* 48, 102176.
- Firman, R.C., Simmons, L.W., 2010. Sperm midpiece length predicts sperm swimming velocity in house mice. *Biol. Lett.* 6, 513–516.
- García-Herreros, M., Leal, C.L.V., 2015. Sperm volumetric dynamics during in vitro capacitation process in bovine spermatozoa. *Animal* 9, 1016–1024.
- Gervasi, M.G., Xu, X., Carbajal-Gonzalez, B., Buffone, M.G., Visconti, P.E., Krapf, D., 2018. The actin cytoskeleton of the mouse sperm flagellum is organized in a helical structure. *J. Cell Sci.* 131. <https://doi.org/10.1242/jcs.215897>.
- Giaccagli, M.M., Gómez-Elías, M.D., Herzfeld, J.D., Marín-Briggiler, C.I., Cuasnicú, P.S., Cohen, D.J., Da Ros, V.G., 2021. Capacitation-induced mitochondrial activity is required for sperm fertilizing ability in mice by modulating hyperactivation. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 767161.
- Goodson, S.G., Qiu, Y., Sutton, K.A., Xie, G., Jia, W., O'Brien, D.A., 2012. Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 87, 75.
- Gu, N.-H., Zhao, W.-L., Wang, G.-S., Sun, F., 2019. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 17, 66.
- Ho, H.C., Wey, S., 2007. Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 70, 719–723.
- Irigoyen, P., Mansilla, S., Castro, L., Cassina, A., Sapiro, R., 2024. Mitochondrial function and reactive oxygen species production during human sperm capacitation: unraveling key players. *FASEB J.* 38, e23486.
- Jablonski, M., Luque, G.M., Gómez-Elías, M.D., Sanchez-Cardenas, C., Xu, X., de la Vega-Beltran, J.L., Corkidi, G., Linares, A., Abonza Amaro, V.X., Krapf, D., Krapf, D., Darszon, A., Guerrero, A., Buffone, M.G., 2023. Reorganization of the flagellum scaffolding induces a sperm standstill during fertilization. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.06.22.546073>.
- Jablonski, M., Luque, G.M., Gómez-Elías, M.D., Sanchez-Cardenas, C., Xu, X., de la Vega-Beltran, J.L., Corkidi, G., Linares, A., Abonza Amaro, V.X., Krapf, D., Krapf, D., Darszon, A., Guerrero, A., Buffone, M.G., 2024. Reorganization of the Flagellum Scaffolding Induces a Sperm Standstill during Fertilization. *eLife* 13, RP93792. <https://doi.org/10.7554/eLife.93792>.
- Kapur, J.N., Sahoo, P.K., Wong, A.K.C., 1985. A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Comput. Vis. Graph Image Process.* 29, 273–285.
- Kilgore, J.A., Dolman, N.J., Davidson, M.W., 2013. A review of reagents for fluorescence microscopy of cellular compartments and structures, Part II: reagents for non-vesicular organelles. *Curr. Protoc. Cytom.* 66, 12.31.1–12.31.24.
- Kleshchev, M., Osadchuk, L., Osadchuk, A., 2023. Age-related changes in sperm morphology and analysis of multiple sperm defects. *Front. Biosci. (Sch. Ed.)* 15, 12.
- Landoni, J.C., Kleele, T., Winter, J., Stepp, W., Manley, S., 2024. Mitochondrial structure, dynamics, and physiology: light microscopy to disentangle the network. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 40, 219–240.
- Leung, M.R., Zenezini Chiozzi, R., Roelofs, M.C., Hevler, J.F., Ravi, R.T., Maitan, P., Zhang, M., Henning, H., Bromfield, E.G., Howes, S.C., Gadella, B.M., Heck, A.J.R., Zeev-Ben-Mordehai, T., 2021. In-cell structures of conserved supramolecular protein arrays at the mitochondria-cytoskeleton interface in mammalian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110996118>.
- Li, Q., Huang, Y., Zhang, S., Gong, F., Lu, G., Lin, G., Dai, J., 2024. Homozygous ACTL9 mutations cause irregular mitochondrial sheath arrangement and abnormal flagellum assembly in spermatozoa and male infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 41, 2271–2278.
- Mishra, P., Chan, D.C., 2016. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* 212, 379–387.
- Moscattelli, N., Spagnolo, B., Pisanello, M., Lemma, E.D., De Vittorio, M., Zara, V., Pisanello, F., Ferramosca, A., 2017. Single-cell-based evaluation of sperm progressive motility via fluorescent assessment of mitochondria membrane potential. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18123-1>.
- Pelliccione, F., Micillo, A., Cordeschi, G., D'Angeli, A., Necozione, S., Gandini, L., Lenzi, A., Francavilla, F., Francavilla, S., 2011. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. *Fertil. Steril.* 95, 641–646.
- Poot, M., Zhang, Y.Z., Krämer, J.A., Wells, K.S., Jones, L.J., Hanzel, D.K., Lugade, A.G., Singer, V.L., Haugland, R.P., 1996. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 1363–1372.
- Puga Molina, L.C., Luque, G.M., Balestrini, P.A., Marín-Briggiler, C.I., Romarowski, A., Buffone, M.G., 2018. Molecular basis of human sperm capacitation. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 72.
- Rahim, F., Tao, L., Khan, K., Ali, I., Zeb, A., Khan, I., Dil, S., Abbas, T., Hussain, A., Zubair, M., Zhang, H., Hui, M., Khan, M.A., Shah, W., Shi, Q., 2024. A homozygous ARMC3 splicing variant causes asthenozoospermia and flagellar disorganization in a consanguineous family. *Clin. Genet.* 106, 437–447.
- Ren, M., Xu, Y., Phoon, C.K.L., Erdjument-Bromage, H., Neubert, T.A., Rajan, S., Hussain, M.M., Schlame, M., 2022. Condensed mitochondria assemble into the acrosomal matrix during spermiogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 867175.

- Rohani, A., Kashatus, J.A., Sessions, D.T., Sharmin, S., Kashatus, D.F., 2020. Mito Hacker: a set of tools to enable high-throughput analysis of mitochondrial network morphology. *Sci. Rep.* 10, 18941.
- Roldan, E.R.S., 2020. Assessments of sperm quality integrating morphology, swimming patterns, bioenergetics and cell signalling. *Theriogenology* 150, 388–395.
- Roldan, E.R.S., 2018. Male fertility overview. in: *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier, pp. 408–415.
- Romarowski, A., Luque, G.M., La Spina, F.A., Krapf, D., Buffone, M.G., 2016. Role of actin cytoskeleton during mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 220, 129–144.
- Romarowski, A., Velasco Félix, Á.G., Torres Rodríguez, P., Gervasi, M.G., Xu, X., Luque, G.M., Contreras-Jiménez, G., Sánchez-Cárdenas, C., Ramírez-Gómez, H.V., Krapf, D., Visconti, P.E., Krapf, D., Guerrero, A., Darszon, A., Buffone, M.G., 2018. Super-resolution imaging of live sperm reveals dynamic changes of the actin cytoskeleton during acrosomal exocytosis. *J. Cell Sci.* 131. <https://doi.org/10.1242/jcs.218958>.
- Schiavi-Ehrenhaus, L.J., Romarowski, A., Jabłoński, M., Krapf, D., Luque, G.M., Buffone, M.G., 2022. The early molecular events leading to COFILIN phosphorylation during mouse sperm capacitation are essential for acrosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* 298, 101988.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Shan, X., Ren, J., Han, X., Wang, Q., Huang, K., Du, B., Liang, L., 2024. A red emission tetraphenyl ethylene-fused rhodamine dye for viscosity sensing and mitochondria-targeted cell imaging. *J. Mol. Struct.* 1310, 138280.
- Sprenger, H.-G., Langer, T., 2019. The good and the bad of mitochondrial breakups. *Trends Cell Biol.* 29, 888–900.
- Stendardi, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Palumberi, D., Serafini, F., Ferramosca, A., Zara, V., 2011. Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 34, 247–255.
- Stival, C., Puga Molina, L. del C., Paudel, B., Buffone, M.G., Visconti, P.E., Krapf, D., 2016. Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. In: Buffone, M.G. (Ed.), *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. Springer International Publishing, Cham, pp. 93–106.
- Tourmente, M., Sansegundo, E., Rial, E., Roldan, E.R.S., 2022. Capacitation promotes a shift in energy metabolism in murine sperm. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 950979.
- Tronstad, K.J., Nootboom, M., Nilsson, L.I.H., Nikolaisen, J., Sokolewicz, M., Grefte, S., Pettersen, I.K.N., Dyrstad, S., Hoel, F., Willems, P.H.G.M., Koopman, W.J.H., 2014. Regulation and quantification of cellular mitochondrial morphology and content. *Curr. Pharm. Des.* 20, 5634–5652.
- Valente, A.J., Maddalena, L.A., Robb, E.L., Moradi, F., Stuart, J.A., 2017. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. *Acta Histochem.* 119, 315–326.
- van der Horst, G., 2020. Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: current status, three D tracking and flagellar analysis. *Anim. Reprod. Sci.* 220, 106350.
- van der Walt, S., Schönberger, J.L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J.D., Yager, N., Gouillart, E., Yu, T., 2014. scikit-image: image processing in Python. *scikit-image: image processing in Python*. PeerJ 2, e453.
- Van Rossum, G., Drake Jr, F.L., 2009. Python 3 Reference Manual. Createspace.
- Vorup-Jensen, T., Hjort, T., Abraham-Peskir, J.V., Guttman, P., Jensenius, J.C., Uggerhøj, E., Medenwaldt, R., 1999. X-ray microscopy of human spermatozoa shows change of mitochondrial morphology after capacitation. *Hum. Reprod.* 14, 880–884.
- Wang, H., Dou, Q., Jeong, K.J., Choi, J., Gladyshev, V.N., Chung, J.-J., 2022. Redox regulation by TXNRD3 during epididymal maturation underlies capacitation-associated mitochondrial activity and sperm motility in mice. *J. Biol. Chem.* 298, 102077.
- Wang, H.-Y., Chen, K.-R., Yeh, B.-C., Li, W.-D., Wu, S.-R., Ching, Y.-H., Wang, C.-Y., Kuo, P.-L., 2025. SEPT14 complexes maintain sperm morphogenesis and function. *FASEB J.* 39, e70414.
- Yang, Y., Yang, L., Han, X., Wu, K., Mei, G., Wu, B., Cheng, Y., 2024. The regulation role of calcium channels in mammalian sperm function: a narrative review with a focus on humans and mice. *PeerJ* 12, e18429.
- Zemirli, N., Morel, E., Molino, D., 2018. Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19020564>.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Anthony Valverde,  
Costa Rica Institute of Technology, Costa Rica

## REVIEWED BY

Matias Daniel Gomez-Elias,  
Fecundis Lab, Spain  
Sabrina Gacem,  
Autonomous University of Barcelona, Spain  
Francisco Sevilla Benavides,  
Instituto Tecnológico de Costa Rica  
(ITCR), Costa Rica  
Belisario Dominguez-Mancera,  
Universidad Veracruzana, Mexico

## \*CORRESPONDENCE

Rossana Sapiro,  
✉ [rsapiro@fmed.edu.uy](mailto:rsapiro@fmed.edu.uy)

RECEIVED 09 April 2025

ACCEPTED 21 May 2025

PUBLISHED 10 June 2025

## CITATION

Skowronek MF, Pietroroia S, de Cola G,  
Ramos M, Silvera D, Casanova G,  
Lecumberry F, Cassina A and Sapiro R (2025)  
Mitochondrial morphology in fertile and  
infertile men: image processing and  
morphometric analysis of the sperm  
midpiece.  
*Front. Cell Dev. Biol.* 13:1609081.  
doi: 10.3389/fcell.2025.1609081

## COPYRIGHT

© 2025 Skowronek, Pietroroia, de Cola,  
Ramos, Casanova, Lecumberry, Cassina and  
Sapiro. This is an open-access article  
distributed under the terms of the [Creative  
Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The  
use, distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original publication in  
this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# Mitochondrial morphology in fertile and infertile men: image processing and morphometric analysis of the sperm midpiece

María Fernanda Skowronek<sup>1</sup>, Santiago Pietroroia<sup>1</sup>, Gabriel de Cola<sup>2</sup>, Mauricio Ramos<sup>2</sup>, Diego Silvera<sup>2</sup>, Gabriela Casanova<sup>3</sup>, Federico Lecumberry<sup>2</sup>, Adriana Cassina<sup>4,5</sup> and Rossana Sapiro<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad Académica de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, <sup>2</sup>Departamento de Procesamiento de Señales, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, <sup>3</sup>Unidad de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, <sup>5</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

**Introduction:** The male factor is responsible for 50% of infertility cases. Numerous studies have explored the relationship between human sperm morphology assessed via optical and electron microscopy and reproductive outcomes. In the sperm midpiece, mitochondria are arranged in a helical shape, forming a compact sheath. Disruptions in this precise mitochondrial structure, size, or organization may contribute to infertility. However, despite established links between abnormal sperm morphology and pathology, mitochondrial abnormalities in sperm remain relatively understudied.

**Methods:** In this study, we employed computational image analysis and fluorescence labelling to quantitatively assess morphometric changes in the sperm midpiece and correlate these findings with mitochondrial ultrastructure in fertile and infertile men.

**Results:** Our results revealed a significant increase in midpiece area, width, and roundness in sperm from men with teratozoospermia. These findings were further validated by electron microscopy. The ultrastructural morphometric analysis demonstrated disassembled, enlarged, and irregularly shaped mitochondria in sperm from infertile men. Additionally, we applied ultrastructural morphometric analyses to apoptotic sperm samples, observing similar qualitative and quantitative mitochondrial alterations, particularly in those from infertile individuals.

**Discussion:** Traditional sperm morphology assessments are inherently subjective, but this limitation can be addressed through quantitative morphometric analysis. Enhancing the objectivity and precision of such evaluations is essential for elucidating the biological mechanisms of male infertility and optimizing assisted reproductive technologies. In our study, spermatozoa with poor morphology (<4%) and proximal flagellar abnormalities displayed significantly shorter and wider midpieces. Ultrastructural analysis further revealed that mitochondria in sperm from infertile men were significantly larger and more irregular in shape compared to those from

fertile men. These findings indicate an association between altered midpiece morphometry, mitochondrial ultrastructure, and male infertility. The integration of computational tools for automated detection and quantification of these morphological changes offers a promising avenue to improve diagnostic accuracy and deepen our understanding of male reproductive disorders.

#### KEYWORDS

human infertility, sperm midpiece, sperm mitochondria, fluorescent probes, electron microscopy, image processing

## 1 Introduction

Infertility, the failure to become pregnant within a year despite unprotected sexual intercourse, is a widespread problem that affects an estimated 70 million people worldwide (Fainberg and Kashanian, 2019). The World Health Organization (WHO) estimates that the male factor plays a role in 50% of the cases (World Health Organization, 2021).

Standard semen parameters are crucial for the assessment of male fertility and overall reproductive health. They provide important information about the quantity and quality of sperm, but rarely shed light on the causes or indicate possible treatments (World Health Organization, 2021; Björndahl and Kirkman Brown, 2022). Although there is currently controversy (Pelzman and Sandlow, 2024; Keegan et al., 2007), sperm morphology is consistently a good indicator of male fertility. Many authors have even gone so far as to claim that sperm morphology reflects the functional competence of spermatozoa (Coetzee et al., 1998; Menkveld et al., 2011). Even though it should be interpreted in the context of multiple parameters, sperm morphology correlates with sperm fertilization ability in medical-assisted reproduction when strict criteria are applied (Van Waart et al., 2001; Grow et al., 1994; Kruger et al., 1986; Menkveld et al., 1990). Concerning the ultrastructural morphology of the male gamete, sperm functionality appears to be directly related to the integrity of gamete morphology (Bartoov et al., 1999; Reichart et al., 2009). Although attempts have been made to link alterations in subcellular components such as the sperm head (Moretti et al., 2005; Lalonde et al., 1988; Chemes et al., 1999a), acrosome (Lalonde et al., 1988; Albert et al., 1992), and flagellar cytoskeleton (Chemes et al., 1999b; Rawe et al., 2001; Escalier, 2006; Escalier and Serres, 1985) to infertility, the results obtained were not convincing. In previous work, we have described ultrastructural alterations more prevalent in infertile patients than in controls, such as gross alterations of the head and neck and large disorganizations of the axoneme (Skowronek et al., 2010; Skowronek et al., 2012). Despite the many ultrastructural phenotypes responsible for abnormal sperm function and pathology, mitochondrial abnormalities

have received relatively little attention (Bartoov et al., 1999; Chemes and Rawe, 2003).

During spermiogenesis, the mitochondria, initially located in the peripheral cytoplasm, migrate and gather around the proximal part of the forming axoneme, which later develops into the sperm midpiece (Lehti and Sironen, 2017). The number of mitochondria varies depending on the species (Gage, 1998; Cummins and Woodall, 1985). They are arranged in a spiral (Ho and Wey, 2007) and form a compact sheath where the mitochondria remain connected by disulfide bridges (Otani et al., 1988; Olson and Winfrey, 1990). Disturbances in this precise arrangement of mitochondria could lead to changes in sperm motility in patients with asthenozoospermia (Mundy et al., 1995). Similarly, the organization, volume, and changes in the ultrastructure of the mitochondrial membrane have also been reported as determinants of flagellar movement and flagellar beating, and therefore associated with asthenozoospermia and infertility (Pelliccione et al., 2011; Cardullo and Baltz, 1991; Folgerø et al., 1993), especially in cases of probable genetic origin (Rawe et al., 2007; Collodel et al., 2011; Moretti et al., 2008).

On the other hand, mitochondria *per se* can undergo morphological changes. Dynamic changes associated with fusion and fission phenomena and apoptosis have been described (Yoon and Wang, 2015). Previously, our group developed a series of scripts to measure morphometric features of the mouse sperm midpiece (SMP) using images obtained by fluorescence microscopy (Skowronek et al., 2025). These tools have proven useful in quantifying the morphometric changes in the mouse sperm midpiece during sperm capacitation. Additionally, we have previously demonstrated that the structure of the human sperm midpiece correlates with semen parameters. Using electron microscopy, we also observed that spermatozoa from samples with a low percentage of normal cells exhibited dilatation of the inner mitochondrial matrix (Irigoyen et al., 2022). In this study, we aim to validate scripts to quantify these variations. We propose that mitochondrial shape alterations can be studied through morphometric analysis of the human sperm midpiece labeled with fluorescent probes. We correlated these results with the quantification of the morphometric features detected by transmission electron microscopy (TEM) in the mitochondria of sperm midpieces from both fertile and infertile men. Our ultimate goal is to identify precise tools to improve the analysis of sperm morphology and explore its implications for male fertility.

---

**Abbreviations:** WHO, World Health Organization; TEM, Transmission Electron Microscopy; SMP, Sperm Midpiece; PB, Phosphate Buffer; PBS, Phosphate Buffer Saline; BWW, (Biggers-Whitten-Whittingham) Medium; ROI, Region of Interest; SD, Standard Deviation; FL Images, Fluorescent Images; NPF, Normal Proximal region of the Flagella; APF, Altered Proximal region of the Flagella; Ax, Axoneme; SCD, Sperm Chromatin Dispersion.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Subjects and human samples

Men attending the Fertilab andrology clinic for sperm testing and the Unit of Human Reproduction, Pereira-Rossell Hospital Center (Montevideo, Uruguay) for fertility testing were included in the study.

Samples for morphometric analysis by fluorescence microscopy ( $n = 37$ ) were randomly selected, while samples for TEM analysis ( $n = 12$ ) were chosen according to the conceiving capacity of each subject.

Inclusion criteria for classifying a man as infertile were: a clinical history with an unknown cause of infertility, an abnormal spermogram, and the absence of a female factor in the couple. None of the infertile men ( $n = 7$ ) had a child of their own, and all of them had at least two examinations of semen samples showing abnormal sperm morphology according to WHO criteria. Patients with varicocele, history of genital tract infections, endocrine disorders, post-vasectomy control or cryptorchidism were specifically excluded. No genetic or family history of male infertility was identified. Possible causes of infertility in their female partners (ovulatory disorders, anatomical or cervical factors) were also excluded. These men were classified as idiopathic infertility.

Fertile men ( $n = 5$ ) were selected from age-matched men who had fathered at least one child and presented normal semen parameters.

The semen samples were collected from March 2018 to November 2022 at the School of Medicine, Montevideo, Uruguay.

The Ethics Committee of the School of Medicine, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay approved the study. Before sample collection, all participants signed an informed consent form. The laboratory staff assured the anonymity of the participants.

### 2.2 Routine semen analysis

The semen samples were collected after 3 days of sexual abstinence by masturbation in sterile and disposable containers and delivered to the laboratory immediately after ejaculation. The semen was allowed to stand in a laboratory oven (Heratherm™ General Protocol, Thermo Scientific™, Massachusetts, US) at 37°C for 30 min. After liquefaction, the volume, viability, pH, and normal morphology of the semen were analyzed according to WHO guidelines (World Health Organization, 2021). For microscopic analysis, two sperm counting chambers CELL-VU® (Millennium Sciences, Inc., New York, United States) were loaded with each semen sample. Ten different fields per chamber were randomly examined (moving the microscope stage from top to bottom and then to the right, thus avoiding the same optical field) using a Nikon microscope at 37°C. Concentration and motility parameters were analysed using an automated analyzer from SCA-Microoptics (CASA) (Barcelona, Spain) with standard settings according to WHO criteria (World Health Organization, 2021). To assess sperm morphology, semen smears were stained using

the Shorr method (IVD: *In Vitro* Diagnostic Medical Device Merck KGaA, Germany) and viewed with a Nikon ECLIPSE E200 bright field microscope at 1000x magnification (under oil immersion). At least 200 consecutive spermatozoa were observed and analyzed per sample. Morphological evaluation was performed in several systematically selected areas of the slide, focusing up and down in different and separated microscopic fields. Following morphological WHO criteria (World Health Organization, 2021) all normal spermatozoa were assessed and scored, and the head, neck-midpiece and tail defects of the abnormal spermatozoa were noted.

Samples were discarded if they showed leukocytospermia (World Health Organization, 2021). The sperm cultures were negative for microorganisms.

### 2.3 Non-apoptotic and apoptotic sperm separation

Semen samples were processed by Magnetic activated cell sorting -MACS. Briefly, first swim-up was performed in PureCeption™ Sperm Washing Medium (SAGE *In Vitro* Fertilization, Inc., California, USA). An aliquot of the swim-up selected sperm was centrifuged, incubated with Annexin V-conjugated microbeads (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany), and processed by MACS according to the manufacturer's (Miltenyi Biotec) and the procedure described by Grunewald and Paasch (2013). The unlabeled cells that ran through the column were collected (non-apoptotic fraction). The magnetic field was removed, and the magnetically retained Annexin V-conjugated sperm cells were eluted (apoptotic selected cell fraction). The sperm chromatin dispersion test was performed in both fractions according to Fernández et al., (2005). An aliquot of each fraction was fixed and processed to be analyzed by TEM.

### 2.4 Evaluation of sperm midpiece morphology by confocal and epifluorescence microscopy

After liquefaction, 37 semen samples were centrifuged at 400 g for 10 min, at room temperature, and the supernatant was discarded. Sperms were resuspended in BWW (Biggers-Whitten-Whittingham) medium (Calvo et al., 1993) and incubated with 50 nM MitoTracker® Red CMXRos - M7512 - (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, United States) at 37°C for 30 min in a digital laboratory incubator, Thermo Scientific - Heratherm IMC-18 model. Sperms were then spread on a glass slide and fixed in a mixed solution of 4% w/v paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 30 min and washed thoroughly in phosphate buffer saline (PBS). Sperm nuclei were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride). After mounting the slides, they were observed using a Leica spectral confocal microscope model TCS SP5 II and a Nikon Eclipse E400 epifluorescent microscope with a 100X, 1.4 NA oil objective (excitation:  $\lambda = 488$  nm and  $\lambda = 543$  nm). Several

digital images of the spermatozoa of each individual were taken and processed.

## 2.5 Ultrastructural evaluation of sperm mitochondrial morphology by transmission electron microscopy

Semen samples from five fertile control men and seven infertile patients were processed for TEM. Following liquefaction, each sample was centrifuged at 400 g for 10 min. The supernatant was discarded, and the resulting sperm pellet was fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde, and stored overnight at 4 °C. Samples were then rinsed in PB (pH 7.4), post-fixed in 1% (w/v) osmium tetroxide for 1 hour, dehydrated through a graded ethanol series and acetone, and embedded in Araldite resin. Polymerization was carried out at 58°C–60°C for 48 h. Sectioning was performed using an RMC MT-X ultramicrotome equipped with a DIATOME diamond knife. Semithin sections (500 nm) were stained with 1% (w/v) toluidine blue and examined under a Nikon ECLIPSE E200 light microscope. Adjacent ultrathin sections (50–70 nm) were stained with uranyl acetate followed by lead citrate and examined using a JEOL JEM-1010 transmission electron microscope operated at 80 kV. For each sample, digital images were captured from at least 100 midpiece-level sections, including both longitudinal (through the central axis of the axoneme) and transverse views. Images were acquired and processed using a Hamamatsu C-4742-95 digital camera to obtain both qualitative and quantitative data on mitochondrial morphology.

## 2.6 Image processing

To analyze the fluorescence and electron microscopy images, we developed two software applications that allowed the analysis of the morphometric characteristics of the sperm midpiece and the mitochondria in an automated and semi-automated manner. For each individual, at least 100 fluorescence images of sperm midpieces and 100 electron microscopy images were quantified. To assess the mitochondrial ultrastructure, only longitudinal sections at the level of the sperm midpiece, passing through the central axis of the axoneme, were analysed. Images were processed using the ImageJ/Fiji (Schindelin et al., 2012) routines implemented in Python (Van Rossum and Drake, 2009).

### 2.6.1 Fluorescence microscopy image processing

Fluorescence microscopy images were processed as 8-bit images. Noise reduction was obtained by a Gaussian filter, and automatic segmentation of spermatozoa midpieces was obtained from the images labeled with MitoTracker™ using the MaxEntropy thresholding method (Kapur et al., 1985). The MaxEntropy method automatically defines a threshold value  $h$  in the intensity value that maximises  $\psi(h)$  based on Shannon's Entropy (Shannon, 1948) where

$$\psi(s) = \ln P_s(1 - P_s) + \frac{H_s}{P_s} + \frac{H_n - H_s}{1 - P_s}, \text{ with } H_k = \sum_{i=1}^k p_i \ln(p_i), P_s = \sum_{i=1}^s p_i$$

$p_i = \frac{f_i}{N} \forall i \in \{1, \dots, n\}$  is the fraction of pixels with value  $f_i$ ,  $N$  is the total number of pixels, and  $n$  is the total number of grey values observed in the image. Using this method, we maximized the information extracted from the image by enhancing the contrast between the foreground (object) and background distributions. This enabled the automated generation of regions of interest (ROIs) (see Figure 2), from which multiple shape and fluorescence intensity descriptors were calculated. Using a dialog box in ImageJ/Fiji: "Set Measurements" we could select between a lot of morphometric descriptors (area, mean gray value, centroid, X and Y coordinates, center of mass, perimeter, bounding rectangle, fit ellipse, circularity, aspect ratio, roundness, solidity, Feret's diameter, integrated density, etc. (Schindelin et al., 2012). We used only the parameters that best fit the description of the sperm midpiece and mitochondria. These parameters included morphological features such as area, X and Y coordinates to calculate length and width, roundness, circularity, and solidity, as well as fluorescence metrics such as integrated density and mean intensity to evaluate the fluorescence intensity. All ROIs were user-validated to ensure the selection of isolated and well-defined sperm midpieces. Image processing and segmentation were further supported by additional libraries, including: scikit-image (van der Walt et al., 2014), OpenCV (Bradski, 2000), and SimpleITK (Beare et al., 2018).

### 2.6.2 Electron microscopy image processing

Electron microscopy images were manually processed, and all mitochondria were individually segmented. Each closed region of interest (ROI) was added to the ROI Manager in ImageJ/Fiji (see Figure 5). These ROIs enabled the automated computation of quantitative morphological parameters (see Supplementary Figure S1). Among the available measurements in ImageJ/Fiji, we selected the following for analysis: *Area*, *Perimeter*, *Circularity*, *Roundness*, *X coordinate*, and *Mean Gray Value*. In ImageJ/Fiji, *Circularity* and *Roundness* (Beare et al., 2018) are calculated as follows:

$$\text{Circularity} = \frac{4\pi \text{Area}}{\text{Perimeter}^2}, \quad \text{Roundness} = \frac{4\text{Area}}{\pi M^2}$$

where  $M$  is the major axis of an ellipse fitted to the ROI. Although both parameters sound alike, they have differences. Consider an ellipse and a rectangle ROIs with the same fitted ellipse, they have similar areas, major and minor axes, and angles. Since they have the same major axis ( $M$ ) the *Roundness* is the same for both ROIs, however, the *Circularity* is higher for the ellipse than for the rectangle.

## 2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism statistical package version 8.0.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, United States, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Data were expressed by arithmetic means and the corresponding standard deviation. The normal distribution of the data was tested using the Shapiro-Wilk normality test. Regression lineal analysis was performed between morphometric and sperm morphology. Comparisons between means were performed using Student's t-test or Mann-Whitney test, depending on the normal distribution

TABLE 1 Age and descriptive characteristics of subjects' sperm parameters.

Parameter	Mean	SD	Median	Max	Min	Lower reference value (WHO, 2021)
Subject age (yr)	35.4	5.8	36.0	50.0	21.0	—
Sperm concentration (million/mL)	45.5	38.4	35.0	159.0	1.6	16.0
Progressive Motility (a + b) (%)	47.5	20.3	52.0	82.0	3.0	30.0
Normal Sperm Morphology (%)	6.6	3.4	7.0	15.0	0.0	4.0
Alterations of the sperm head (%)	34.9	11.4	35.0	60.0	16.0	—
Alterations of the sperm midpiece (%)	1.9	1.4	2.0	5.0	0.0	—
Alterations of the sperm principal piece (%)	2.7	2.1	3.0	8.0	0.0	—

Data were obtained by analyzing the first spermogram of 37 individuals who attended the andrology clinic. SD, standard deviation; Max, maximum value; Min, minimum value.

of the data (two groups). Hypotheses were compared with two tails, and a *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## 3 Results

### 3.1 Clinical data and semen analysis

A total of 49 men aged 21–50 years were included in the study. Of these, 25 were normozoospermic, and 24 had abnormal semen parameters, including asthenozoospermia (*n* = 2), teratozoospermia (*n* = 4), oligozoospermia (*n* = 6), oligo-asthenozoospermia (*n* = 1), terato-asthenozoospermia (*n* = 2), oligo-terato-asthenozoospermia (*n* = 5), and oligo-teratozoospermia (*n* = 4).

The age of the participants and semen characteristics analyzed in the morphometric study using fluorescence microscopy are presented in Table 1 and Supplementary Data S1 *n* = 37. Age and semen characteristics from five fertile and seven infertile men analyzed by TEM are shown in Table 2. Descriptive statistics (mean, standard deviation, median, minimum, and maximum) for sperm concentration, progressive motility, and normal morphology are reported for participants in both experiments (Tables 1, 2).

### 3.2 Analysis of the sperm midpiece by confocal or epifluorescence microscopy

Great heterogeneity was observed in the morphological characteristics and dimensions of the sperm midpieces. Most sperm midpieces were labelled with MitoTracker™, and the red fluorescent labelling was specifically confined to this sperm region (Figure 1).

Different labeling patterns were observed, indicating a large heterogeneity in the morphometry of the midpiece of human spermatozoa and possible differences in mitochondrial organization. Details in the distribution of red fluorescence within the sperm midpiece can also be observed (Figures 1A–D).

### 3.3 Morphometric analysis of the sperm midpiece

To determine the morphometric characteristics of the sperm midpieces, we developed a script that automatically detects the MitoTracker™-labeled areas, segments them, and generates ROIs for analysis (Figure 2 and Supplementary Data S1).

Initially, we manually verified that MitoTracker™ specifically labeled the midpiece, allowing accurate identification of the mitochondrial region along the flagellum (Figures 2A–C). Next, we assessed the relationship between conventional sperm morphology (strict criteria) and morphometric measures obtained from our script (Figure 2 and Supplementary Data S1). Linear regression revealed no significant association between sperm morphology and either the mean area ( $R^2 = 0.013$ ,  $p = 0.5$ ) or the mean fluorescence intensity ( $R^2 = 0.025$ ,  $p = 0.4$ ) of ROIs in samples from the 37 men. However, negative correlations were found between the percentage of morphologically normal sperm and midpiece roundness ( $R^2 = 0.37$ ,  $p = 0.0001$ ), length ( $R^2 = 0.14$ ,  $p = 0.03$ ), and width ( $R^2 = 0.27$ ,  $p = 0.001$ ). Samples were further grouped based on global sperm morphology, using WHO strict criteria and a 4% threshold. We included 28 samples with  $\geq 4\%$  normal morphology and 9 samples with  $< 4\%$ . No difference in midpiece area was observed between groups ( $6.68 \pm 0.86$  vs.  $6.82 \pm 0.88 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0.68$ ; Figure 2D). However, samples with  $< 4\%$  normal morphology had wider and rounder midpieces (width:  $1.97 \pm 0.16$  vs.  $1.79 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ,  $p = 0.0042$ ; roundness:  $0.48 \pm 0.06$  vs.  $0.40 \pm 0.05$ ,  $p = 0.0002$ ), along with shorter lengths ( $4.4 \pm 0.42$  vs.  $4.8 \pm 0.38 \mu\text{m}$ ,  $p = 0.026$ ; Figures 2E,F). No differences were found in circularity, solidity, or fluorescence intensity ( $31.6 \pm 7.3$  vs.  $25.7 \pm 12.2$ ;  $p = 0.18$ ; Figure 2G).

To further investigate midpiece morphology, we manually classified sperm from eleven subjects (7 normozoospermic and four teratozoospermic) as having either a normal (NPF) or altered (APF) proximal flagellar region (Figure 3 and Supplementary Data S2). For each subject, 50–100 sperm images were analyzed. Sperm with APF exhibited increased midpiece area ( $7.42 \pm 0.69$  vs.  $6.37 \pm 0.53 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0.0007$ ), width ( $2.06 \pm 0.12$  vs.  $1.61 \pm 0.11 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.0001$ ), and roundness ( $0.47 \pm 0.05$  vs.  $0.33 \pm 0.005$ ,  $p < 0.0001$ ), as well as decreased length ( $4.60 \pm 0.35$  vs.  $5.05 \pm 0.39 \mu\text{m}$ ,  $p = 0.0097$ ; Figures 3A–C). No differences were observed in circularity,

TABLE 2 Age and descriptive characteristics of semen parameters belonging to fertile and infertile men analyzed by TEM.

Parameter	Fertile men					Infertile men					Lower reference value (WHO, 2021)
	Mean	SD	Median	Max	Min	Mean	SD	Median	Max	Min	
Men age (yr)	42.2	2.3	43.0	44.0	38.0	34.7	4.8	35.0	44.0	29.0	—
Sperm concentration (million/mL)	76.2	56.1	71.0	147.0	12.0	71.2	97.1	21.3	214.0	6.9	16.0
Progressive Motility (a+b) (%)	58.0	14.6	63.0	71.0	35.0	50.3	23.8	54.0	74.0	13.0	30.0
Normal sperm morphology (%)	20.4	5.6	21.0	28.0	14.0	2.9	1.9	2.0	7.0	1.0	4.0

Data were obtained by analyzing the first spermogram of 12 individuals who attended the andrology clinic. SD, standard deviation; Max, maximum value; Min, minimum value; LRV, Low reference Value (World Health Organization, 2021).

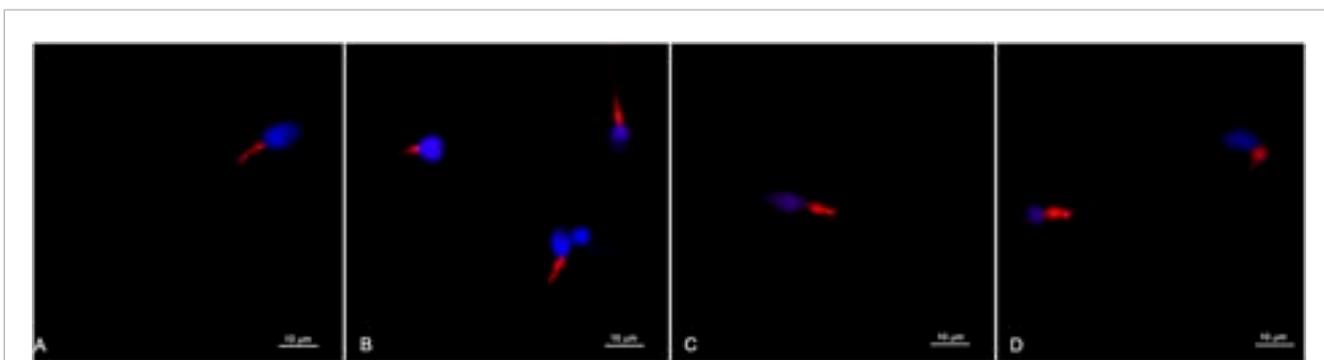


FIGURE 1 Representative images of sperm labelled with MitoTracker™ and observed with a confocal microscope (A–D). The red fluorescent labelling is confined to the sperm midpiece and different marking patterns are observed. The sperm head and nuclear chromatin are labelled in blue.

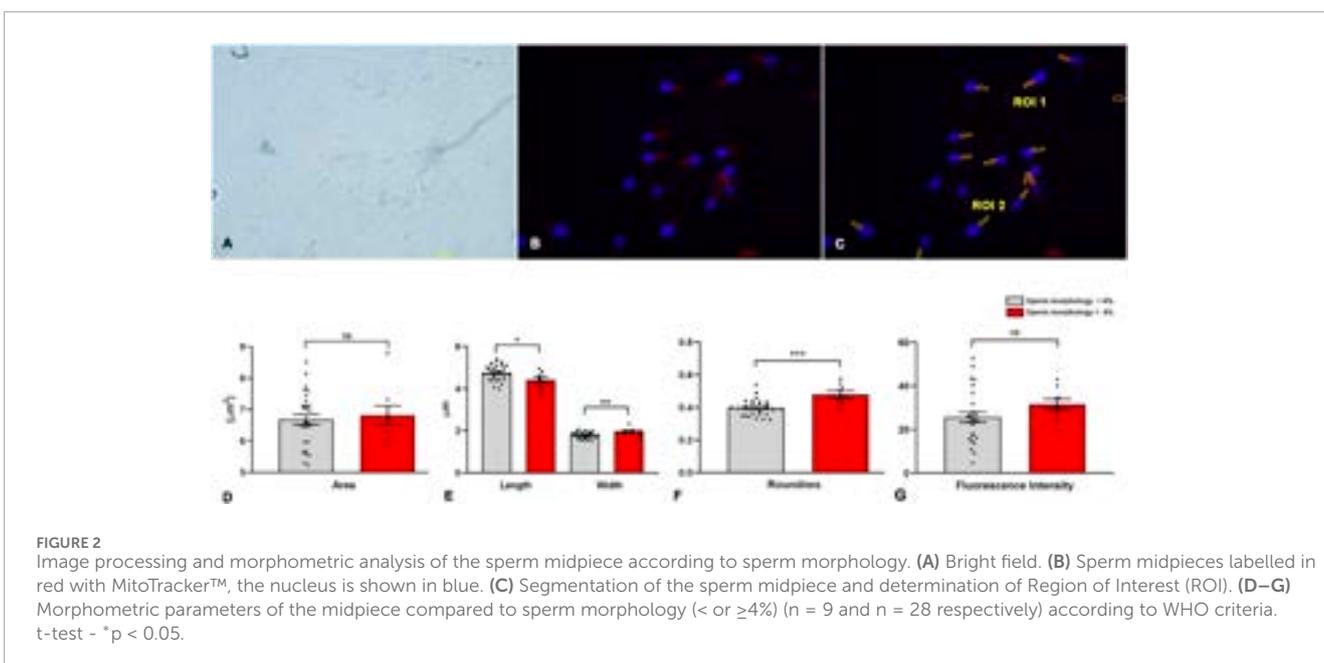
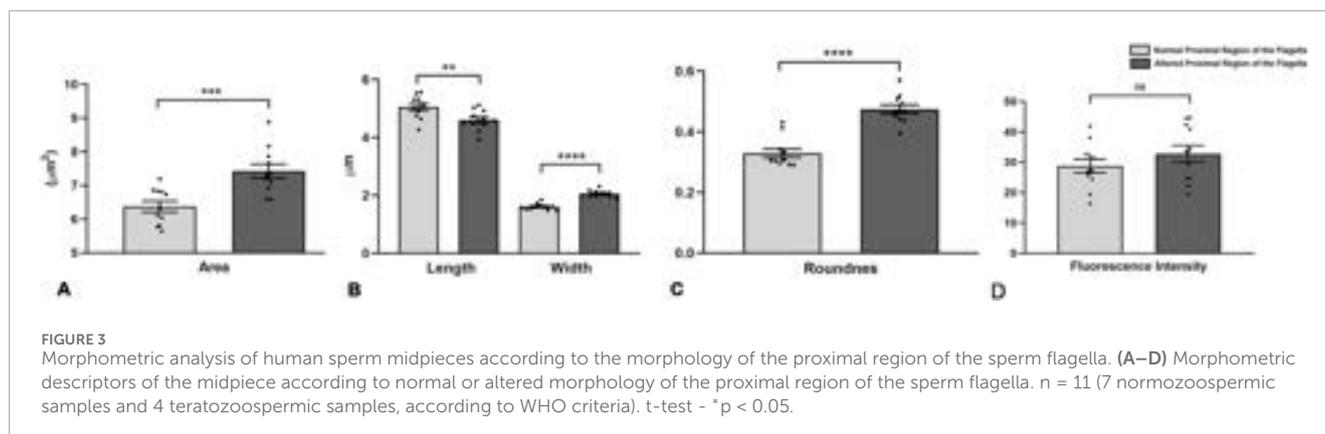


FIGURE 2 Image processing and morphometric analysis of the sperm midpiece according to sperm morphology. (A) Bright field. (B) Sperm midpieces labelled in red with MitoTracker™, the nucleus is shown in blue. (C) Segmentation of the sperm midpiece and determination of Region of Interest (ROI). (D–G) Morphometric parameters of the midpiece compared to sperm morphology ( $< \ge 4\%$ ) ( $n = 9$  and  $n = 28$  respectively) according to WHO criteria. t-test - \* $p < 0.05$ .



solidity, or mean fluorescence intensity ( $32.8 \pm 9.3$  vs.  $28.7 \pm 7.5$ ;  $p = 0.28$ ; Figure 3D).

### 3.4 Analysis of the sperm midpiece by transmission electron microscopy

The ultrastructural analysis was performed on samples from seven subjects with infertility and five fertile men. Images of at least 100 sections were analyzed at the level of the sperm midpiece, both longitudinally and transversely. In some of the analyzed sections, the mitochondria were round, regular, and well-organized around the axoneme. Their cristae are easily recognizable, and the regular separation of the outer and inner mitochondrial membranes can be observed (Figures 4A, B). In other sections, these organelles show abnormal profiles with irregular shapes, a disorganized arrangement around the axoneme, and large electron-lucent areas in the mitochondrial matrix that often prevent the cristae from being visible (Figures 4C, D). Although normal (Figures 4A, B) and altered mitochondrial profiles (Figures 4C, D) were observed in fertile and infertile men, the latter group had the highest proportion of abnormal forms.

### 3.5 Ultrastructural morphometric analysis

To perform the ultrastructural morphometric analysis, we developed a new script that semi-automatically recognizes the mitochondria in the sperm midpiece and generates image descriptors. Segmentation was performed manually, and ROIs were defined (Figures 5A–D). The descriptors for shape and size were determined by the script (Figures 5E, F and Supplementary Data S3). To perform the morphometric study, only the mitochondria in the longitudinal sections passing through the central axis of the axoneme were analyzed (almost 100 sections and a total of about 1,000 mitochondria per subject).

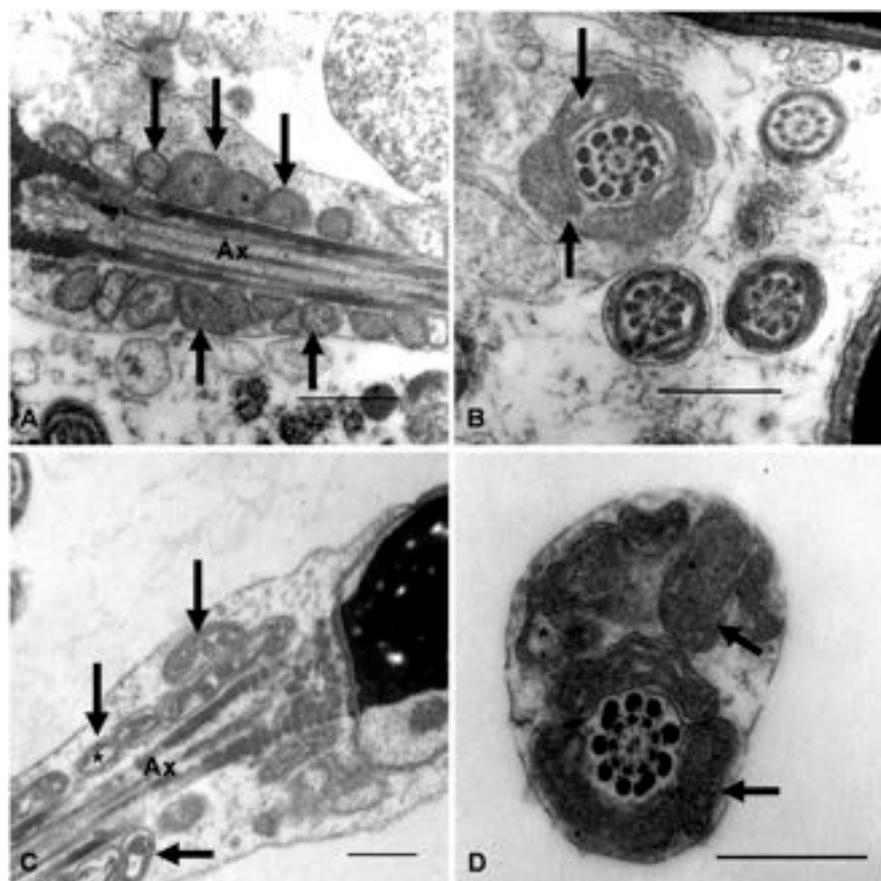
A quantification analysis of the observed characteristics confirmed an increase in mitochondrial size and heterogeneity in infertile men. The mean  $\pm$  SD of mitochondrial area was smaller in fertile than in infertile men ( $93.085 \pm 28.907$  vs.  $124.191 \pm 18.471$  nm<sup>2</sup>,  $p = 0.045$ ) (Figure 5E), while the mean  $\pm$  SD of

mitochondrial circularity was higher in fertile men ( $0.83 \pm 0.02$  vs.  $0.78 \pm 0.04$ ,  $p = 0.046$ ) (Figure 5F). No differences were observed for other mitochondrial morphological parameters (perimeter, mean gray value, X coordinate).

### 3.6 Mitochondrial morphology in apoptotic spermatozoa

We proposed to analyze morphological changes in the mitochondria in spermatozoa subjected to a sperm selection method (magnetic activated cell sorting -MACS) that can separate apoptotic and non-apoptotic spermatozoa. We use the same scripts and computer programs developed by our group to analyze and quantify these morphological changes. Semen from five infertile men with a total sperm count of more than 20 million sperm (an amount high enough to perform TEM), normal sperm morphology between 1% and 7% and sperm DNA fragmentation, measured by the sperm chromatin dispersion (SCD) assay, of more than 16%, underwent the separation method based on the use of annexin V columns. The ultrastructural analysis of these apoptotic and non-apoptotic spermatozoa is shown in Figure 6. Changes similar to those described above were observed. In non-apoptotic spermatozoa, mitochondria were mainly arranged around the axoneme and were homogeneous in shape and size (Figures 6A, B). In apoptotic spermatozoa, mitochondria appeared mostly disorganized around the axoneme, larger and more heterogeneous than in non-apoptotic spermatozoa (Figures 6C, D). Gross dilations, or clear spaces between mitochondrial membranes, were observed more frequently (Figure 6D).

The morphometric analysis of the manually determined ROIs is shown in Figure 7 and Supplementary Data S3. The mean  $\pm$  SD of mitochondrial area was smaller in non-apoptotic than in apoptotic spermatozoa ( $45.651 \pm 25.334$  vs.  $130.228 \pm 62.117$  nm<sup>2</sup>,  $p < 0.0001$ ,  $n = 251/82$ ) (Figure 7E), whereas the mean  $\pm$  SD of mitochondrial circularity was higher in non-apoptotic spermatozoa ( $0.81 \pm 0.13$  vs.  $0.76 \pm 0.15$ ,  $p = 0.005$ ,  $n = 251/82$ ) (Figure 7F), which is consistent with the previously described ultrastructural differences between fertile and infertile males. No differences were found in other morphometric descriptors (mean gray value).



**FIGURE 4**

Ultrastructural characteristics of the sperm midpiece from fertile and infertile men. Different patterns of mitochondrial organisation and morphology are observed (arrows). Mitochondria in (A,B) are smaller, with more homogeneous profiles and regularly arranged around the axoneme. (C,D) show mitochondrial disorganisation about the axoneme, dilated and irregularly shaped mitochondria. Clear spaces between the mitochondrial membranes (\*) could suggest edema or mitochondrial swelling. Ax = axoneme. Bars = 500 nm.

## 4 Discussion

The evaluation of human sperm morphology provides important information on the functional status of the male reproductive organs, especially the testes and epididymis (Coetzee et al., 1998; van der Merwe et al., 2005; Esteves, 2022). Despite its historical relevance, the clinical utility of sperm morphology analysis is currently being reassessed, with conflicting evidence regarding its predictive value for pregnancy outcomes in patients with teratozoospermia undergoing assisted reproductive technologies (Pelzman and Sandlow, 2024; Keegan et al., 2007; Danis and Samplaski, 2019; Zhou et al., 2021). The morphological analysis of sperm using routine procedures is associated with a certain subjectivity that can be overcome using quantification techniques. Routine analyses often focus on overall sperm shape, but more detailed morphometric approaches can quantify specific subcellular regions. Improving the accuracy and objectivity of morphological analysis can help elucidate the mechanisms underlying infertility and support various assisted reproductive techniques (Khatun et al., 2018).

In this study, we have analyzed the morphology of the midpiece and sperm mitochondria. Although the association between changes in mitochondrial morphology and infertility is well known (Chemes and Rawe, 2003; Pelliccione et al., 2011; Rawe et al., 2007), there is a lack of systematization of the characteristics of the organelle in males. We present a novel approach based on the automated and systematic analysis of fluorescence images, specifically labelling the sperm midpiece and extracting morphometric descriptors. Delineation of the sperm midpiece and determination of its dimensions is difficult with conventional light microscopy and labelling routine methods. The use of a fluorescent marker specifically directed at the mitochondria, such as MitoTracker™, improves the procedure. MitoTracker™ diffuses passively through the plasma membrane and accumulates in active mitochondria. The dye is permanently bound to the mitochondria and remains after the cell has been fixed (Chazotte, 2009; Poot et al., 1996) so that changes in the midpiece accurately reflect modifications in the morphology of the organelles. The specific labelling of the midpiece allows, through the use of ImageJ/Fiji (Schindelin et al., 2012) and a segmentation protocol, the identification of ROIs from which morphometric descriptors were extracted. Using our

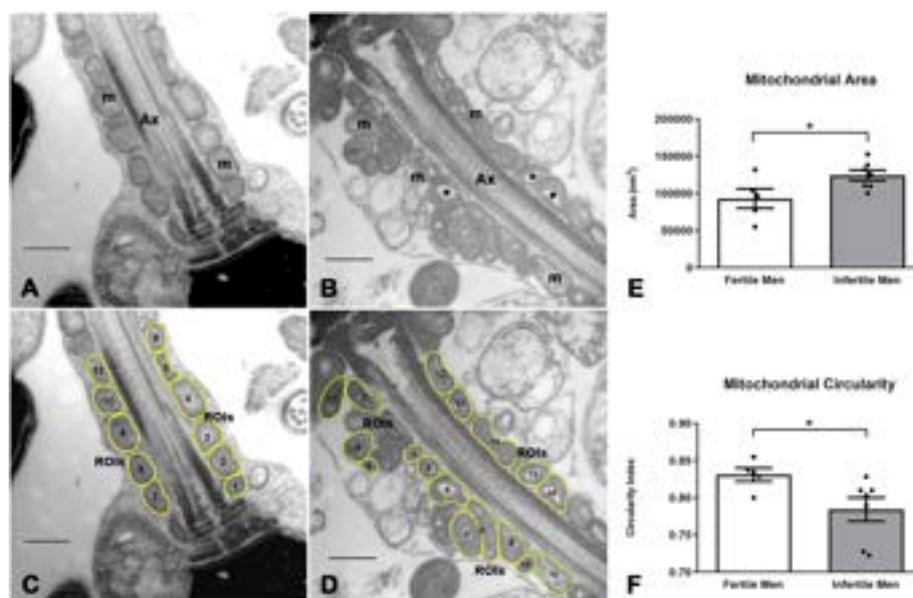


FIGURE 5

Image processing and morphometric analysis of the mitochondrion in the sperm midpiece of fertile and infertile men. (A,B) Ultrastructural characteristics of the mitochondria in fertile and infertile men, respectively. (C,D) Segmentation of the mitochondrion in the sperm midpiece and determination of ROIs. (E,F) Quantitative analysis of morphometric descriptors.  $n = 5$  fertile men and  $n = 7$  infertile men.  $t$ -test -  $*p < 0.05$ . Bars 500 nm  $m$  = mitochondria, Ax = axoneme,  $*$  = mitochondrial matrix dilation.

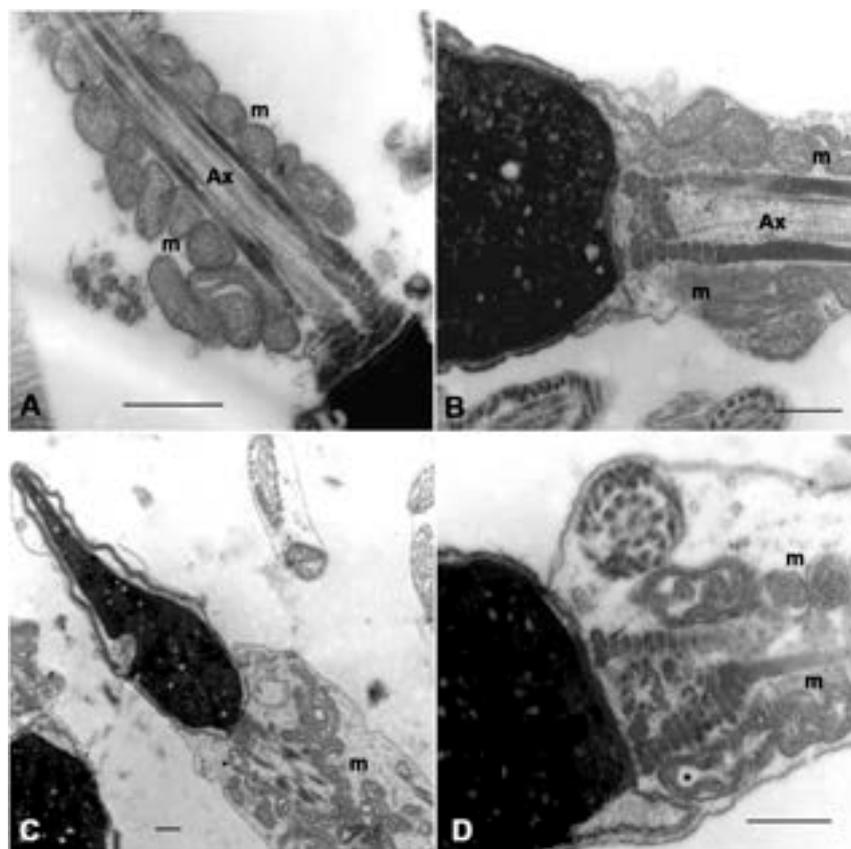
custom-developed script, we analyzed large sets of images in a fast, automated, accurate, and reproducible manner, generating a rich dataset of quantitative descriptors. In manually segmented sperm midpieces, we previously observed a correlation between the length and width of the midpiece and normal sperm morphology according to WHO criteria (Irigoyen et al., 2022). Consistent with these findings, we now observed significant differences in midpiece dimensions: spermatozoa with poor morphology (<4%) and characteristic malformations of the proximal flagellum exhibited shorter and wider midpieces.

These results support earlier findings reported by other authors, correlating specific morphometric parameters with male fertility status (García-Vázquez et al., 2016; Mossman et al., 2013). For example, higher sperm head width and lower length/width ratios were detected in spermatozoa from fertile than infertile men (Morales et al., 1988; Boyle et al., 1992). Mean flagellum length and the mean total sperm length were positively associated with semen characteristics measured manually (Mossman et al., 2013).

Sperm organelles, such as mitochondria, are difficult to visualize using standard staining techniques or optical microscopy due to their small size and complex structure. Electron microscopy offers a high-resolution alternative that allows for detailed examination of these organelles (Baccetti et al., 1995). Numerous ultrastructural studies have attempted to detect subcellular changes, particularly in the flagellum, which could clarify the mechanisms underlying alterations in sperm parameters and, thus, infertility (Bartoov et al., 1999; Reichart et al., 2009; Chemes et al., 1999b; Chemes and Rawe, 2003; Rawe et al., 2007; Berkovitz et al., 1999; Rawe et al., 2000; Baccetti et al., 2002; Curti et al., 2014). However, pathologies affecting the sperm midpiece and mitochondrial sheath have received less attention (Chemes and Alvarez, 2012). In the present

study, we proposed a systematic computational analysis of the morphology of the sperm mitochondria. In contrast to other studies (Mundy et al., 1995; Pelliccione et al., 2011; Baccetti et al., 1995), we used image processing to obtain various morphometric descriptors and measurements of the size (area) and shape (roundness) of each mitochondrion in the sections of the sperm midpiece. As in other studies, we observed swollen and irregularly assembled mitochondria, but our method allowed us to demonstrate quantitatively that mitochondria were significantly larger and more irregularly shaped. These findings align with analysis under the fluorescence microscope, where sperm classified as having poor morphology according to WHO criteria exhibited larger and broader midpieces.

Although automation through CASA has the potential of improving the morphometric analysis of sperm, the evaluation of sperm morphology by CASA is not yet an established method (Esteves, 2022). The integration of machine learning and deep learning offers new opportunities to enhance classification accuracy. These tools are starting to be applied in sperm classification (Marín and Chang, 2021; Chandra et al., 2022; Mahali et al., 2023; Riordon et al., 2019). Given the heterogeneity in sperm morphology—ranging in shape, size, and texture—analysis tools must be adaptable (Shaker et al., 2017). The open-source nature of ImageJ/Fiji allowed us to tailor our segmentation scripts to address these complexities. Our approach minimizes user-dependent variability and converts qualitative assessments into reliable, objective data. These tools facilitated automated and semi-automated extraction of morphometric descriptors in a reproducible and objective manner. The collection and processing of large numbers of images with minimal human intervention strengthened the reliability and credibility of our results. Our algorithm converts



**FIGURE 6**

Sperm mitochondrial morphology in spermatozoa subjected to MACS (Magnetic Cell Sorting). In non-apoptotic sperm (A,B) the mitochondria (m) are arranged around the axoneme (Ax) and show no gross changes in the organization of the inner membranes. In apoptotic sperm (C,D), dispersed and swollen mitochondria (m) are observed, heterogeneous in shape and size, with gross dilations between the mitochondrial membranes (\*). Bars: 500 nm.

qualitative observations of the sperm midpiece and mitochondria into objective numerical data that validates and supports our conclusions.

Apoptosis in the spermatozoon is questioned and the morphological changes in the mitochondria during this process are poorly known. Interestingly, apoptotic spermatozoa displayed large and irregularly shaped mitochondria similar to those observed in infertile men. The presence of spermatozoa with submicroscopic features similar to those of somatic apoptosis has been reported in human ejaculates (Baccetti et al., 1996). Many studies have linked ultrastructural sperm defects to human sperm apoptosis and pathology (Baccetti et al., 1995; Curti et al., 2014; Baccetti et al., 1996). Specifically, the sperm midpiece in apoptotic cells frequently contains swollen and poorly organized mitochondria (Engel et al., 2018; Grunewald et al., 2017; Muratori et al., 2000). In the early stages of apoptosis, phosphatidylserine is externalized to the outer leaflet and can bind to annexin V. Annexin V, coupled with submicroscopic, biodegradable superparamagnetic beads (MACS), has been used to separate apoptotic from non-apoptotic sperm when applied to a column exposed to a strong magnetic field (Said et al., 2005; Esbert et al., 2017; Lin et al., 2019). The method is considered sufficiently specific to separate both types of cells and has already been used

to correlate apoptosis to sperm morphology (Aziz et al., 2007). Morphometric analysis of apoptotic spermatozoa, selected using this specific enrichment technique, revealed a similar frequency and pattern of mitochondrial defects to those seen in samples from men with unexplained infertility. Consequently, the algorithm developed here holds promise for application in diverse contexts beyond infertility, including the assessment of sperm quality and apoptosis. The current data highlight the algorithm's potential as a robust tool for the quantitative analysis of mitochondrial morphology.

While TEM remains a gold standard for ultrastructural assessment, its cost and labor intensity limit its clinical application (Chemes and Rawe, 2003). Our semi-automated method offers a scalable alternative that retains analytical depth. Measuring and analyzing large numbers of mitochondria with minimal user intervention represents a significant advancement in the study of sperm morphology and male infertility. Nevertheless, validation in larger and more diverse cohorts is essential.

A limitation of the study is the lack of a functional analysis to explain the presence of altered sperm mitochondria in the ejaculate, which may trigger mitochondrial malformations. For example, it is known that oxidative stress triggers mitochondrial

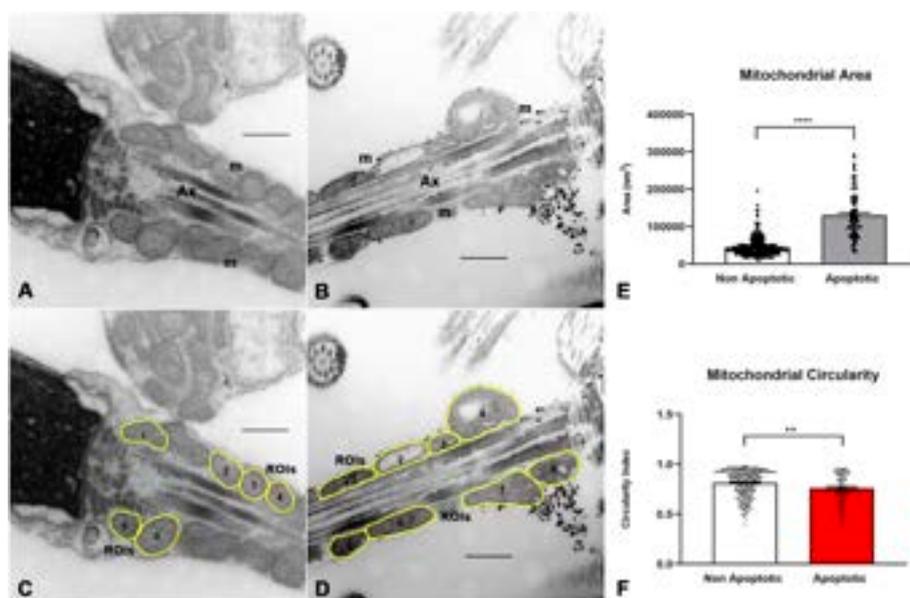


FIGURE 7

Image processing and morphometric analysis of the mitochondrion in the sperm midpiece of non-apoptotic and apoptotic spermatozoa. (A,B) Ultrastructural features of the mitochondria in non-apoptotic and apoptotic spermatozoa respectively. (C,D) Segmentation of the mitochondrion in the sperm midpiece and determination of ROIs. (E,F) Quantitative analysis of morphometric descriptors. Mann Whitney test,  $n = 251$  non apoptotic sperm and 82 apoptotic sperm.  $p < 0.05$ . Bars 500 nm m = mitochondria, Ax = axoneme.

swelling, reduced mitochondrial membrane potential, release of cytochrome C, activation of caspases, and apoptosis (Teranishi et al., 2000; Karbowski et al., 1999). This mechanism could underlie both the sperm alterations and the infertility in the individuals studied. To investigate this further, future studies should include functional assessments of mitochondrial activity, measurements of oxidative stress markers in seminal fluid, and correlation with morphometric parameters.

Another important limitation of the study is the sample size. Though the number of patients is adequate as a tool to prove the method to achieve mitochondrial and midpiece morphometric analysis, it requires validation in larger cohorts. Specifically, the size of the group of fertile and infertile men in the TEM analysis limits the universality of the conclusions to other types of male infertile conditions other than idiopathic, e.g., genetic disorders or mitochondrial diseases. Forthcoming studies with diverse populations, larger sample sizes, and specific groups of patients are needed to confirm these findings and their diagnostic value.

Although our findings indicate a higher incidence of mitochondrial and midpiece abnormalities in teratozoospermic subjects, the teratozoospermia is primarily attributable to morphological defects in the sperm head (Table 1 and Supplementary Data S1), rather than in the midpiece. We propose that the mitochondrial alterations observed are not a direct consequence of an increased prevalence of midpiece abnormalities. This represents a potential limitation, as the ultrastructural mitochondrial analyses were not specifically conducted on spermatozoa with confirmed midpiece defects. Nevertheless, when we used image analysis to select spermatozoa exhibiting an altered morphology of the flagellum, morphometric alterations in the

sperm midpiece became more significant. To clarify this issue, the goal would be to perform morphometric analyses using both fluorescence microscopy and electron microscopy on the same sample. The implementation of single-cell selection or analysis techniques specifically targeting spermatozoa with midpiece abnormalities, along with the adoption of advanced high-resolution microscopy technologies capable of examining cells *in vivo*, would represent important objectives for future research.

## 5 Conclusion

The morphological remodeling of mitochondria reflects detectable changes within the sperm midpiece that appears to be closely associated with impaired sperm quality and male infertility. In this study, we introduced a novel, automated image analysis pipeline capable of quantifying sperm midpiece and mitochondria morphology alterations with high precision and reproducibility. Our results demonstrated that infertile men and apoptotic spermatozoa share similar mitochondrial abnormalities—namely, increased size and irregular morphology—suggesting a potential link between mitochondrial dysfunction, apoptosis, and male infertility.

Our study demonstrates that computational morphometric analysis of sperm midpieces and mitochondria provides valuable, objective data that correlate with sperm quality and fertility status. This methodology could support clinical diagnostics, assist in evaluating sperm apoptosis, be useful for the development of targeted treatments, and potentially serve as a training foundation for AI-based classification systems. Future work combining

morphometric, functional, and genomic data will be critical for advancing our understanding of male infertility.

## Data availability statement

Scripts and a minimal working example image dataset are publicly available at <https://gitlab.fing.edu.uy/imagina/mitomorph/>.

## Ethics statement

The studies involving humans were approved by Ethics Committee of the Facultad de Medicina de la Universidad de la República Montevideo, Uruguay. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

MS: Conceptualization, Investigation, Visualization, Writing – review and editing, Formal Analysis, Methodology, Data curation, Writing – original draft. SP: Software, Investigation, Writing – original draft. GD: Conceptualization, Software, Writing – review and editing. MR: Writing – review and editing, Software. DS: Investigation, Methodology, Writing – review and editing, Software. GC: Methodology, Writing – review and editing. FL: Investigation, Writing – review and editing, Conceptualization. AC: Writing – original draft, Funding acquisition, Methodology, Supervision, Investigation, Conceptualization, Writing – review and editing. RS: Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Writing – review and editing, Writing – original draft, Project administration, Methodology.

## Funding

The author(s) declare that financial support was received for the research and/or publication of this article. Financial support for this work was received from: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC I + D 2016, ID23), Universidad de la República (UdelaR), UdelaR Espacio Interdisciplinario, Núcleos 2015, UdelaR, Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Chan Zuckerberg Initiative Expanding Global Access to Bioimaging

## References

- Albert, M., Gallo, J. M., Escalier, D., Parseghian, N., Jouannet, P., Schrevel, J., et al. (1992). Unexplained *in-vitro* fertilization failure: implication of acrosomes with a small reacting region, as revealed by a monoclonal antibody. *Hum. Reprod.* 7 (9), 1249–1256. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137836
- Aziz, N., Said, T., Paasch, U., and Agarwal, A. (2007). The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum. Reprod.* 22 (5), 1413–1419. doi:10.1093/humrep/dem016
- Baccetti, B., Bernieri, G., Burrini, A. G., Collodel, G., Crisà, N., Mirolli, M., et al. (1995). Notulae seminologicae. 5. Mathematical evaluation of interdependent

Bioimage Acquisition and Processing Core: Building Skills in Biomedicine.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Generative AI statement

The authors declare that no Generative AI was used in the creation of this manuscript.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2025.1609081/full#supplementary-material>

### SUPPLEMENTARY FIGURE S1

Representative block diagram of image processing.

### SUPPLEMENTARY DATA S1

Semen parameters including sperm abnormalities, defect type and measures of morphometric ROIs under MO.

### SUPPLEMENTARY DATA S2

Total data of morphometric study of 11 samples analyzed under MO according the alteration of flagella.

### SUPPLEMENTARY DATA S3

Electron microscopy analysis. Raw data of seminal characteristics of fertile and infertile men (n=12). TEM data of apoptotic and non-apoptotic sperm.

submicroscopic sperm alterations. *J. Androl.* 16 (4), 356–371. doi:10.1002/j.1939-4640.1995.tb00541.x

Baccetti, B., Capitani, S., Collodel, G., Strehler, E., and Piomboni, P. (2002). Recent advances in human sperm pathology. *Contraception* 65 (4), 283–287. doi:10.1016/s0010-7824(02)00290-1

Baccetti, B., Collodel, G., and Piomboni, P. (1996). Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 28 (4), 587–596.

Barthoov, B., Eltes, F., Reichart, M., Langzam, J., Lederman, H., and Zabludovsky, N. (1999). Quantitative ultramorphological analysis of human sperm: fifteen years of

- experience in the diagnosis and management of male factor infertility. *Arch. Androl.* 43 (1), 13–25. doi:10.1080/014850199262698
- Beare, R., Lowekamp, B., and Yaniv, Z. (2018). Image segmentation, registration and characterization in R with SimpleITK. *J. Stat. Softw.* 86, 8. doi:10.18637/jss.v086.i08
- Berkovitz, A., Eltes, F., Soffer, Y., Zabludovsky, N., Beyth, Y., Farhi, J., et al. (1999). ART success and *in vivo* sperm cell selection depend on the ultramorphological status of spermatozoa. *Andrologia* 31 (1), 1–8. doi:10.1046/j.1439-0272.1999.00229.x
- Björndahl, L., and Kirkman Brown, J. (2022). The sixth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: ensuring quality and standardization in basic examination of human ejaculates. *Fertil. Steril.* 117 (2), 246–251. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.12.012
- Boyle, C. A., Khoury, M. J., Katz, D. F., Annett, J. L., Kresnow, M. J., DeStefano, F., et al. (1992). The relation of computer-based measures of sperm morphology and motility to male infertility. *Epidemiology* 3 (3), 239–246. doi:10.1097/00001648-199205000-00009
- Bradski, G. (2000). The OpenCV library. *Dr. Dobbs J. Softw. Tools.* doi:10.4236/oalib.1108286
- Calvo, L., Dennison-Lagos, L., Banks, S. M., Fugger, E. F., and Sherins, R. J. (1993). Chemical composition and protein source in the capacitation medium significantly affect the ability of human spermatozoa to undergo follicular fluid induced acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 8 (4), 575–580. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a138099
- Cardullo, R. A., and Baltz, J. M. (1991). Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motil. Cytoskelet.* 19 (3), 180–188. doi:10.1002/cm.970190306
- Chandra, S., Gourisaria, M. K., Gm, H., Konar, D., Gao, X., Wang, T., et al. (2022). Prolificacy assessment of spermatozoan via state-of-the-art deep learning frameworks. *IEEE Access* 10, 13715–13727. doi:10.1109/access.2022.3146334
- Chazotte, B. (2009). Labeling mitochondria with fluorescent dyes for imaging. *Cold Spring Harb. Protoc.* 4 (6), pdb.prot4948. doi:10.1101/pdb.prot4948
- Chemes, E. H., and Rawe, Y. V. (2003). Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum. Reprod. Update* 9 (5), 405–428. doi:10.1093/humupd/dmg034
- Chemes, H. E., and Alvarez, S. C. (2012). Tales of the tail and sperm head aches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian J. Androl.* 14 (1), 14–23. doi:10.1038/aja.2011.168
- Chemes, H. E., Olmedo, S. B., Carrere, C., Osés, R., Carizza, C., Leisner, M., et al. (1999b). Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *J. Urol.* 161 (5), 1725. doi:10.1016/s0022-5347(05)69031-3
- Chemes, H. E., Puigdomenech, E. T., Carizza, C., Olmedo, S. B., Zanchetti, F., and Hermes, R. (1999a). Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum. Reprod.* 14 (7), 1811–1818. doi:10.1093/humrep/14.7.1811
- Coetzee, K., Kruger, T. F., and Lombard, C. J. (1998). Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum. Reprod. Update* 4 (1), 73–82. doi:10.1093/humupd/4.1.73
- Collodel, G., Federico, M. G., Pascarelli, N. A., Geminiani, M., Renieri, T., and Moretti, E. (2011). A case of severe asthenozoospermia: a novel sperm tail defect of possible genetic origin identified by electron microscopy and immunocytochemistry. *Fertil. Steril.* 95 (1), 289.e11–e16. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.05.029
- Cummins, J. M., and Woodall, P. F. (1985). On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil.* 75 (1), 153–175. doi:10.1530/jrf.0.0750153
- Curti, G., Skowronek, F., Vernochi, R., Rodriguez-Buzzi, A. L., Rodriguez-Buzzi, J. C., Casanova, G., et al. (2014). Morphological evaluation of sperm from infertile men selected by magnetic activated cell sorting (MACS). *Reprod. Biol.* 14 (4), 289–292. doi:10.1016/j.repbio.2014.07.002
- Danis, R. B., and Samplaski, M. K. (2019). Sperm morphology: history, challenges, and impact on natural and assisted fertility. *Curr. Urol. Rep.* 20 (8), 43. doi:10.1007/s11934-019-0911-7
- Engel, K. M., Springsguth, C. H., and Grunewald, S. (2018). What happens to the unsuccessful spermatozoa? *Andrology* 6 (2), 335–344. doi:10.1111/andr.12467
- Esbert, M., Godo, A., Soares, S. R., Florensa, M., Amorós, D., Ballesteros, A., et al. (2017). Spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities are more prone to be retained by Annexin V-MACS columns. *Andrology* 5 (4), 807–813. doi:10.1111/andr.12376
- Escalier, D. (2006). Arrest of flagellum morphogenesis with fibrous sheath immaturity of human spermatozoa. *Andrologia* 38 (2), 54–60. doi:10.1111/j.1439-0272.2006.00711.x
- Escalier, D., and Serres, C. (1985). Aberrant distribution of the peri-axonemal structures in the human spermatozoon: possible role of the axoneme in the spatial organization of the flagellar components. *Biol. Cell* 53 (3), 239–250. doi:10.1111/j.1768-322x.1985.tb00372.x
- Esteves, S. C. (2022). Evolution of the World Health Organization semen analysis manual: where are we? *Nat. Rev. Urol.* 19, 439–446. doi:10.1038/s41585-022-00593-2
- Fainberg, J., and Kashanian, J. A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res* 8, F1000 Faculty Rev-670. doi:10.12688/f1000research.17076.1
- Fernández, J. L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., et al. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil. Steril.* 84 (4), 833–842. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.089
- Folgerø, T., Bertheussen, K., Lindal, S., Torbergsen, T., and Øian, P. (1993). Andrology: mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum. Reprod.* 8 (11), 1863–1868. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137950
- Gage, M. J. (1998). Mammalian sperm morphometry. *Proc. Biol. Sci.* 265 (1391), 97–103. doi:10.1098/rspb.1998.0269
- García-Vázquez, F. A., Gadea, J., Matás, C., and Holt, W. V. (2016). Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian J. Androl.* 18 (6), 844–850. doi:10.4103/1008-682X.186880
- Grow, D. R., Oehninger, S., Seltman, H. J., Toner, J. P., Swanson, R. J., Kruger, T. F., et al. (1994). Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large *in vitro* fertilization population. *Fertil. Steril.* 62 (3), 559–567. doi:10.1016/s0015-0282(16)56946-5
- Grunewald, S., Fitzl, G., and Springsguth, C. (2017). Induction of ultra-morphological features of apoptosis in mature and immature sperm. *Asian J. Androl.* 19 (5), 533–537. doi:10.4103/1008-682X.180974
- Grunewald, S., and Paasch, U. (2013). Sperm selection for ICSI using annexin V. *Methods Mol. Biol.* 927, 257–262. doi:10.1007/978-1-62703-038-0\_23
- Ho, H. C., and Wey, S. (2007). Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 70 (8), 719–723. doi:10.1002/jemt.20457
- Irigoyen, P., Pintos-Polasky, P., Rosa-Villagran, L., Skowronek, M. F., Cassina, A., and Sapiro, R. (2022). Mitochondrial metabolism determines the functional status of human sperm and correlates with semen parameters. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 926684. doi:10.3389/fcell.2022.926684
- Kapur, J. N., Sahoo, P. K., and Wong, A. K. C. (1985). A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Comput. Vis. Graph. Image Process.* 29 (3), 140–185. doi:10.1016/s0734-189x(85)90156-2
- Karbowski, M., Kurono, C., Wozniak, M., Ostrowski, M., Teranishi, M., Nishizawa, Y., et al. (1999). Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 26 (3-4), 396–409. doi:10.1016/s0891-5849(98)00209-3
- Keegan, B. R., Barton, S., Sanchez, X., Berkeley, A. S., Krey, L. C., and Grifo, J. (2007). Isolated teratozoospermia does not affect *in vitro* fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 88 (6), 1583–1588. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.01.057
- Khatun, A., Rahman, M. S., and Pang, M. G. (2018). Clinical assessment of the male fertility. *Obstet. Gynecol. Sci.* 61 (2), 179–191. doi:10.5468/ogs.2018.61.2.179
- Kruger, T. F., Menkveld, R., Stander, F. S., Lombard, C. J., Van der Merwe, J. P., van Zyl, J. A., et al. (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 46 (6), 1118–1123. doi:10.1016/s0015-0282(16)49891-2
- Lalonde, L., Langlais, J., Antaki, P., Chapdelaine, A., Roberts, K. D., and Bleau, G. (1988). Male infertility associated with round-headed acrosomeless spermatozoa. *Obstet. Gynecol. Surv.* 43 (9), 561–562. doi:10.1097/00006254-198809000-00020
- Lehti, M. S., and Sironen, A. (2017). Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biol. Reprod.* 97 (4), 522–536. doi:10.1093/biolre/iox096
- Lin, H. L., Chen, Y. H., and Chen, L. R. (2019). Application of Annexin V magnetic beads enriches boar sperm of high quality. *Theriogenology* 137, 132. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.065
- Mahali, M. I., Leu, J. S., Darmawan, J. T., Avian, C., Bachroin, N., Prakosa, S. W., et al. (2023). A dual architecture fusion and AutoEncoder for automatic morphological classification of human sperm. *Sensors (Basel)* 23 (14), 6613. doi:10.3390/s23146613
- Marín, R., and Chang, V. (2021). Impact of transfer learning for human sperm segmentation using deep learning. *Comput. Biol. Med.* 136 (104687), 104687. doi:10.1016/j.combiomed.2021.104687
- Menkveld, R., Holleboom, C. A. G., and Rhemrev, J. P. T. (2011). Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J. Androl.* 13 (1), 59–68. doi:10.1038/aja.2010.67
- Menkveld, R., Stander, F. S., Kotze, T. J., Kruger, T. F., and van Zyl, J. A. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum. Reprod.* 5 (5), 586–592. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137150
- Morales, P., Katz, D. F., Overstreet, J. W., Samuels, S. J., and Chang, R. J. (1988). The relationship between the motility and morphology of spermatozoa in human semen. *J. Androl.* 9 (4), 241–247. doi:10.1002/j.1939-4640.1988.tb01045.x
- Moretti, E., Collodel, G., Scapigliati, G., Cosci, I., Sartini, B., and Baccetti, B. (2005). 'Round head' sperm defect. Ultrastructural and meiotic segregation study sperm defect. *Ultrastruct. Meiotic Segreg. Study. J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37 (3-4), 297–303.

- Moretti, E., Pascarelli, N. A., Federico, M. G., Renieri, T., and Collodel, G. (2008). Abnormal elongation of midpiece, absence of axoneme and outer dense fibers at principal piece level, supernumerary microtubules: a sperm defect of possible genetic origin? *Fertil. Steril.* 90 (4), 1201.e3–e8. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.11.050
- Mossman, J. A., Pearson, J. T., Moore, H. D., and Pacey, A. A. (2013). Variation in mean human sperm length is linked with semen characteristics. *Hum. Reprod.* 28 (1), 22–32. doi:10.1093/humrep/des382
- Mundy, A. J., Ryder, T. A., and Edmonds, D. K. (1995). Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum. Reprod.* 10 (1), 116–119. doi:10.1093/humrep/10.1.116
- Muratori, M., Piomboni, P., Baldi, E., Filimberti, E., Pecchioli, P., Moretti, E., et al. (2000). Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J. Androl.* 21 (6), 903–912. doi:10.1002/j.1939-4640.2000.tb03421.x
- Olson, G. E., and Winfrey, V. P. (1990). Mitochondria-cytoskeleton interactions in the sperm midpiece. *J. Struct. Biol.* 103 (1), 13–22. doi:10.1016/1047-8477(90)90081-m
- Otani, H., Tanaka, O., Kasai, K., and Yoshioka, T. (1988). Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: regular dispositions and synchronized changes. *Anat. Rec.* 222 (1), 26–33. doi:10.1002/ar.1092220106
- Pelliccione, F., Micillo, A., Cordeschi, G., D'Angeli, A., Necozone, S., Gandini, L., et al. (2011). Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. *Fertil. Steril.* 95 (2), 641–646. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.07.1086
- Pelzman, D. L., and Sandlow, J. I. (2024). Sperm morphology: evaluating its clinical relevance in contemporary fertility practice. *Reprod. Med. Biol.* 23 (1), e12594. doi:10.1002/rmb2.12594
- Poot, M., Zhang, Y. Z., Krämer, J. a., Wells, K. S., Jones, L. J., Hanzel, D. K., et al. (1996). Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J. Histochem Cytochem* 44 (12), 1363–1372. doi:10.1177/44.12.8985128
- Rawe, V. Y., Galaverna, G. D., Acosta, A. A., Olmedo, S. B., and Chemes, H. E. (2001). Incidence of tail structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 16 (5), 879–886. doi:10.1093/humrep/16.5.879
- Rawe, V. Y., Galaverna, G. D., Olmedo, S. B., Acosta, A. A., and Chemes, H. E. (2000). Mitochondrial sheath configuration in abnormal human sperm. *Fertil. Steril.* 74 (3), S131. doi:10.1016/s0015-0282(00)01092-x
- Rawe, V. Y., Hermes, R., Nodar, F. N., Fiszbajn, G., and Chemes, H. E. (2007). Results of intracytoplasmic sperm injection in two infertile patients with abnormal organization of sperm mitochondrial sheaths and severe asthenoteratozoospermia. *Fertil. Steril.* 88 (3), 649–653. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.12.074
- Reichart, M., Eltes, F., Soffer, Y., Zigenreich, E., Yogev, L., and Bartoov, B. (2009). Sperm ultramorphology as a pathophysiological indicator of spermatogenesis in males suffering from varicocele. *Andrologia* 32 (3), 139–145. doi:10.1046/j.1439-0272.2000.00355.x
- Riordon, J., McCallum, C., and Sinton, D. (2019). Deep learning for the classification of human sperm. *Comput. Biol. Med.* 111 (103342), 103342. doi:10.1016/j.combiomed.2019.103342
- Said, T. M., Grunewald, S., Paasch, U., Rasch, M., Agarwal, A., and Glander, H. J. (2005). Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertil. Steril.* 83 (5), 1442–1446. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.052
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9 (7), 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Shaker, F., Monadjemi, S. A., and Alirezaie, J. (2017). “Classification of human sperm heads using elliptic features and LDA,” in *2017 3rd international conference on pattern recognition and image analysis (IPRIA)* (IEEE). doi:10.1109/pria.2017.7983036
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27 (3), 379–423. doi:10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x
- Skowronek, F., Casanova, G., Alciaturi, J., Capurro, A., Cantu, L., Montes, J. M., et al. (2012). DNA sperm damage correlates with nuclear ultrastructural sperm defects in teratozoospermic men. *Andrologia* 44 (1), 59–65. doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01106.x
- Skowronek, M. F., Alciaturi, J., Casanova, G., Capurro, A., Montes, J. M., and Sapiro, R. (2010). Value of quantitative ultramorphological sperm analysis in infertile men. *Reprod. Biol.* 10 (2), 125–139. doi:10.1016/s1642-431x(12)60055-2
- Skowronek, M. F., Pietroroia, S., Silvera, D., Ford, M., Cassina, A., Lecumberry, F., et al. (2025). Morphometric analysis of the sperm midpiece during capacitation. *Tissue Cell* 95 (102866), 102866. doi:10.1016/j.tice.2025.102866
- Teranishi, M., Spodonik, J. H., Karbowski, M., Kurono, C., Soji, T., and Wakabayashi, T. (2000). Swelling of free-radical-induced megamitochondria causes apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* 68 (2), 104–123. doi:10.1006/exmp.1999.2288
- van der Merwe, F. H., Kruger, T. F., Oehninger, S. C., and Lombard, C. J. (2005). The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecol. Obstet. Invest* 59 (2), 86–91. doi:10.1159/000082368
- van der Walt, S., Schönberger, J. L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J. D., Yager, N., et al. (2014). scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* 2, e453. doi:10.7717/peerj.453
- Van Rossum, G., and Drake, F. L., Jr (2009). Python 3 reference manual. *Createspace*, 244. Available online at <https://dl.acm.org/doi/book/10.5555/1593511>.
- Van Waart, J., Kruger, T. F., Lombard, C. J., and Ombelet, W. (2001). Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum. Reprod. Update* 7 (5), 495–500. doi:10.1093/humupd/7.5.495
- World Health Organization (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen,” in *Who laboratory manual for the examination and processing of human semen*.
- Yoon, Y., and Wang, L. (2015). Morphological control of mitochondrial bioenergetics. *Front. Biosci.* 20 (2), 229–246. doi:10.2741/4306
- Zhou, W. J., Huang, C., Jiang, S. H., Ji, X. R., Gong, F., Fan, L. Q., et al. (2021). Influence of sperm morphology on pregnancy outcome and offspring in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a matched case-control study. *Asian J. Androl.* 23 (4), 421–428. doi:10.4103/aja.aja\_91\_20



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Vanina Gabriela Da Ros,  
CONICET Instituto de Biología y  
Medicina Experimental (IBYME),  
Argentina

## REVIEWED BY

Sandra Amaral,  
University of Coimbra, Portugal  
Clara Isabel Marin-Briggiler,  
CONICET Instituto de Biología y  
Medicina Experimental (IBYME),  
Argentina

## \*CORRESPONDENCE

Rossana Sapiro,  
rsapiro@fmed.edu.uy

<sup>†</sup>These authors share seniorship and last authorship

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to Molecular and Cellular Reproduction, a section of the journal Frontiers in Cell and Developmental Biology

RECEIVED 22 April 2022

ACCEPTED 08 July 2022

PUBLISHED 30 August 2022

## CITATION

Irigoyen P, Pintos-Polasky P, Rosa-Villagran L, Skowronek MF, Cassina A and Sapiro R (2022), Mitochondrial metabolism determines the functional status of human sperm and correlates with semen parameters. *Front. Cell Dev. Biol.* 10:926684. doi: 10.3389/fcell.2022.926684

## COPYRIGHT

© 2022 Irigoyen, Pintos-Polasky, Rosa-Villagran, Skowronek, Cassina and Sapiro. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Mitochondrial metabolism determines the functional status of human sperm and correlates with semen parameters

Pilar Irigoyen<sup>1</sup>, Paula Pintos-Polasky<sup>1</sup>, Lucia Rosa-Villagran<sup>1</sup>, Maria Fernanda Skowronek<sup>1</sup>, Adriana Cassina<sup>2,3†</sup> and Rossana Sapiro<sup>1,3\*†</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, <sup>3</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

The diagnosis of male infertility is based essentially on the patient's medical history and a standard semen analysis. However, the latter rarely provides information on the causes of a possible infertility, emphasizing the need to extend the analysis of the sperm function. Mitochondrial function has been associated with sperm function and dysfunction, the latter primarily through the production of excessive amounts of reactive oxygen species (ROS). We hypothesized that analysis of sperm mitochondrial metabolism together with sperm ROS production could be an additional tool to improve routine semen analysis, after appropriate validations. To test our hypothesis, we performed several experiments using a non-routine method (high-resolution respirometry, HRR) to access mitochondrial function. First, we investigated whether mitochondrial function is related to human sperm motility and morphology. When mitochondrial metabolism was challenged, sperm motility decreased significantly. Additionally, morphological abnormalities in the sperm mid-piece and mitochondria were associated with global sperm defects evaluated by routine methods. Subsequently, sperm mitochondrial function was assessed by HRR. Respiratory control ratio (RCR) was determined and evaluated in the context of classical sperm analysis. In parallel, sperm hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production and seminal plasma (SP) antioxidant capacity were measured. The percentage of sperm with progressive motility correlated positively with RCR, SP antioxidant capacity, and negatively with the concentration of extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production ([H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]). The percentage of normal sperm morphology correlated positively with RCR and negatively with [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. Sperm morphology did not correlate with seminal plasma antioxidant capacity. Furthermore, Receiver Operating Characteristic curves were used for the first time to test the diagnostic ability of RCR, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], and SP antioxidant capacity as binary classifiers. An RCR cut off value of 3.2 was established with a sensitivity of 73% and a specificity of 61%, using reference values considered normal or abnormal in routine semen analysis. The cut off value for [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] was 0.2 μM/10<sup>6</sup> sperm (sensitivity = 65%, specificity = 60%). There were no reference values for SP

antioxidant capacity that distinguished between abnormal and normal sperm samples. We conclude that sperm mitochondrial function indices in combination with  $[H_2O_2]$  may be useful tools to complement the routine semen analysis.

#### KEYWORDS

mitochondria, sperm metabolism, antioxidant status, respirometry assay, reactive oxygen species, male fertility

## Introduction

Infertility is a growing problem worldwide, affecting up to 15% of couples of childbearing age (Vander Borgh and Wyns, 2018). Although the male factor is responsible for at least 30–40% of cases, the male contribution to infertility among couples has not traditionally been emphasized (Barratt et al., 2018; De Jonge and Barratt, 2019). Male infertility diagnosis is mainly based on the patient's clinical history, clinical examination, and the analysis of standard semen parameters according to the World Health Organization guidelines, which rarely determines the causes or point to possible treatments (WHO, 2010; WHO, 2021; Barratt et al., 2022; Björndahl and Kirkman Brown, 2022). In some cases of male infertility altered parameters in the spermogram have been detected during semen analysis, but even when endocrine, genetic, and biochemical laboratory tests are added to the male examination (Kliesch, 2014), no cause associated with male infertility is found. These cases are considered as idiopathic and may account for 30–40% of male infertility (Kliesch, 2014). This situation severely limits treatment strategies to rescue fertility, so the inclusion of laboratory advanced tests to the routine semen analysis may assist in accurately diagnosis of male infertility (Agarwal and Bui, 2017).

There are numerous data showing a correlation between semen parameters and both, mitochondrial morphology and function (Wilton et al., 1992; Gopalkrishnan et al., 1995; Mundy et al., 1995; Courtade et al., 1998; Marchetti et al., 2002; Gallon et al., 2006; Amaral and Ramalho-Santos, 2010; Pelliccione et al., 2011; Cassina et al., 2015; Uribe et al., 2017; Durairajanayagam et al., 2021; Tanga et al., 2021). Furthermore, fertilization rate might be related to the proportion of normal mitochondrial structure (Baccetti et al., 2002) and mitochondrial function has been associated to the ability of spermatozoa to fertilize oocytes in mice (Ferreira et al., 2021; Giaccagli et al., 2021) and in humans (Kasai et al., 2002; Malić Vončina et al., 2016; Boguenet et al., 2021).

Despite the large body of data pointing to the importance of mitochondria in sperm function, the mechanisms by which this organelle operates in the male gamete are not fully understood, mainly in what concerns metabolic aspects. Specifically, in many species, including mice (Miki et al., 2004; Mukai and Okuno 2004; Castellini et al., 2021) and humans (Nascimento et al., 2008), is claimed that glycolysis would be used as a preferential pathway to synthesize ATP for maintaining sperm motility. Yet,

we and others have previously shown that mitochondrial function is associated to sperm motility in men (Marchetti et al., 2002; Gallon et al., 2006; Amaral and Ramalho-Santos, 2010; Cassina et al., 2015; Uribe et al., 2017), and that coupling efficiency (that reflects the ability to produce mitochondrial ATP) is associated to the cell's ability to fertilize in mice (Ferreira et al., 2021). All in all, previous result, obtained independently, suggest that ATP produced by mitochondria can make an important contribution to sperm function. When producing ATP, in analogy to somatic cells, sperm mitochondria are the major source of reactive oxygen species (ROS) (Aitken et al., 2012b; Cassina et al., 2015). During cellular respiration, approximately 0.2% of the oxygen consumed is converted to superoxide anions through electron leakage from the mitochondrial electron transport chain (Boveris and Chance, 1973; Nohl et al., 2003; Quijano et al., 2007). In the mitochondrial matrix and intermembrane space, superoxide interacts with the antioxidant enzyme superoxide dismutase, which catalyzes the dismutation of superoxide to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (Messner and Imlay, 2002; Wang et al., 2018). The  $H_2O_2$  diffuses through biological membranes and can be measured in the extracellular space (Cardoso et al., 2012; Wang et al., 2018). The  $O_2^{\bullet-}$  reacts quickly with NO to form peroxynitrite. Low levels of  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  and peroxynitrite, modulate cellular functions, but when they are produced in excess cause nitro-oxidative damage (Quijano et al., 2007). Nitro-oxidative stress is associated with altered semen parameters and abnormalities in the process of fertilization and pregnancy (Twigg et al., 1998; Agarwal et al., 2014a; Walters et al., 2020). In addition, mitochondrial dysfunction is associated with an increase in nitro-oxidative damage in sperm and a decrease in sperm motility (Cassina et al., 2015).

Sperm lose most of their cytoplasm and its organelles during differentiation, including some of the cell's antioxidant defenses. It is postulated that the lack of antioxidant enzymes in spermatozoa is compensated by a high antioxidant capacity of seminal plasma (SP) (Agarwal and Deepinder, 2009). However, in clinical practice, neither ROS nor SP antioxidant capacity are usually tested (Agarwal et al., 2021a; 2021b). This may be because there is no consensus on appropriate tests and their clinically relevant cut off values, as well as an absence of standardization of laboratory techniques (Roychoudhury et al., 2016; Agarwal et al., 2021a, 2021b).

Considering the available information, we hypothesized that the analysis of sperm metabolic status and mitochondrial ROS production could provide additional information to complement routine semen evaluation. To prove our hypothesis, we analyzed sperm mitochondrial function using high-resolution respirometry (HRR) in the context of the routine semen analysis. Also, we standardized an assay to measure sperm  $H_2O_2$  production and the antioxidant capacity of SP. We found some cut off values of mitochondrial function and  $H_2O_2$  production that reflect the reference values of semen parameters established by World Health Organization (WHO). These tests could eventually be integrated into the andrology clinic after proper validation.

## Material and methods

### Reagents and media

Chemicals (unless otherwise indicated) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, United States).

### Selection of subjects and ethical guidelines

For this study, men who presented to the Fertilib andrology clinic (Montevideo, Uruguay) for semen testing were recruited. Recruitment was twice weekly, from August 2018 to December 2021. Unless otherwise stated, samples for the different studies were randomly selected (see below).

Clinical examination of patients and diagnostic semen analysis were performed at the andrology clinic according to the methods of WHO (WHO, 2010). Samples were discarded if they had a white blood cell count  $>0.5 \times 10^6/ml$  or leukocytospermia (WHO, 2010). Sperm cultures were negative for microorganisms. Men who had presented to the clinic for examination as sperm donors (e.g., semen donors for assisted reproduction procedures), that had genital tract infections, varicocele or control after vasectomy were excluded from the study. Not all men were tested for chromosomal, genetic or hormonal anomalies. None of these criteria constituted exclusion criteria.

A total of 339 men who met the inclusion criteria were finally enrolled in this study and randomly distributed as follows: 17 normozoospermic men were included in motility studies and ATP measurements only, 48 semen samples showing different semen parameters were selected for microscopic morphometric analysis. Between them, 5 normozoospermic healthy men who had conceived at least one child at the time of the study and 7 infertile patients were selected for electron microscopic analysis. Inclusion criteria for classifying a man as infertile were: A

clinical history of infertility diagnosed as idiopathic (with abnormal spermogram) and the absence of a female factor in the couple.

The remaining 274 samples were divided into two fractions to analyze HRR and sperm  $H_2O_2$  production when the number of cells was sufficient. Ninety-five SP (considering a wide range of motility and morphology) of these samples were reserved for measuring their antioxidant capacity. The classification criteria for the samples are shown in [Supplementary Figure S1](#). This categorization of samples was independent of fertility status.

The Ethics Committee of the Facultad de Medicina de la Universidad de la República Montevideo, Uruguay approved the experimental protocol. Before sample collection, all participants signed an informed consent form. The laboratory personnel assured the anonymity of the participants without the involvement of the researchers.

### Semen evaluation

Semen samples were obtained after 3 days of sexual abstinence by masturbation in special sterile containers. After liquefaction at room temperature for 30 min, semen volume, viability, pH, and normal morphology were analyzed according to the WHO guidelines.

Two sperm counting chambers CELL -VU<sup>®</sup> (Millennium Sciences, Inc., New York, United States) were loaded, and ten different fields per chamber were randomly examined using a Nikon microscope at 37°C. Concentration and motility parameters were analyzed using an SCA-Microoptics automated analyzer (CASA) (Barcelona, Spain) with default settings according to WHO criteria (WHO, 2010).

### Preparation of the samples

Liquefied samples were centrifuged at 400 g for 10 min at room temperature to separate sperm from SP. If a subsequent washing step was included is described below. The SP was aliquoted and frozen at  $-80^\circ C$ . Sperm were suspended in either of the following media: Biggers Whitten Whittingham medium (BWW: 95 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.7 mM  $CaCl_2$ , 1.2 mM  $KH_2PO_4$ , 1.2 mM  $MgSO_4$ , 5.6 mM glucose, 0.27 mM sodium pyruvate, 20 mM acid-free HEPES, 25 mM  $NaHCO_3$ , 44 mM lactic acid and 0.3% BSA, pH 7.4) for motility, morphology and respiratory experiments (Koppers et al., 2008), HAM-F10 medium (126 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 1.08 mM  $NaH_2PO_4$ , 0.6 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.3 mM  $CaCl_2$ , 6 mM glucose, 20 mM HEPES and 6 mM  $NaHCO_3$ , pH 7.4) for  $[H_2O_2]$  measurement or mitochondrial respiration medium (MRM: 0.1% BSA, 5 mM  $KH_2PO_4$ , 1 mM EGTA, 5 mM MOPS and 300 mM sucrose, pH 7.4) for motility studies and ATP analysis.

## Motility studies on the modulation of glycolysis and mitochondrial respiration

Sperm cells ( $35 \times 10^6$ ) were suspended in 1,500  $\mu\text{L}$  MRM and divided into seven aliquots. Aliquots were incubated at  $37^\circ\text{C}$  with: 1) 0.5% ethanol (OH), 2) 25 mM sodium oxamate (OXA) 3) 100 mM 2-deoxy-D-glucose (2DG), 4) 2.5  $\mu\text{M}$  of antimycin A (AA), 5) 5  $\mu\text{M}$  carbonil cyanide- p-(tri-fluoromethoxy) phenyl-hydrazone (FCCP), 6) 25 mM OXA and 2.5  $\mu\text{M}$  AA, 7) 100 mM 2DG and 2.5  $\mu\text{M}$  AA. After 30 min, motility was analyzed using CASA. Aliquots were then centrifuged at 500 g for 10 min. Pellets were resuspended in 500  $\mu\text{L}$  BWW and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 180 min, and sperm motility was measured. This study was performed on 11 normozoospermic men.

## ATP detection

ATP content was determined using a commercial kit (Cat #700410; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, United States). Spermatozoa ( $1 \times 10^6$ ) from 6 normozoospermic males were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min in MRM with the same drugs used in the motility studies (OH, OXA, 2DG, AA, FCCP, OXA + AA, and 2DG + AA). The medium was removed by centrifugation (600 g for 10 min), and the sperm pellet was washed twice with PBS at  $4^\circ\text{C}$ . Spermatozoa were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of ATP detection sample buffer (1X) at  $4^\circ\text{C}$ , homogenized by repeated pipetting, and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use. On the day of measurement, samples were thawed, diluted 1:10 with ATP detection sample buffer (1X), and stored on ice. ATP detection standards were prepared and the assay was performed according to the manufacturer's instructions. The luminescence signal was recorded using a luminometer plate reader (Lumistar Galaxy, BMG, LabTech). Each measurement was performed twice.

## Fluorescence evaluation of sperm mitochondrial morphology

Sperm cells from 36 sperm samples were incubated with 50 nM MitoTracker<sup>®</sup> Red CMXRos - M7512 - (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, United States) for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  in BWW and then spread on a glass slide. The slides were fixed in a mixed solution of 4% w/v paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 30 min and washed three times in PBS. Sperm nuclei were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride). Slides were mounted and observed using a Nikon Eclipse E400 epifluorescent microscope with a 100X, 1.4 NA oil objective (excitation:  $\lambda = 488$  nm and  $\lambda = 543$  nm). Digital images of 50–80 spermatozoa from each individual were acquired and processed. Manual segmentation of sperm intermediate pieces was performed

from the MitoTracker channel images using ImageJ/FIJI (Schindelin et al., 2012). Areas of interest (ROI) were defined semi-automatically. Only isolated and well-defined midsections were included in the analysis (Figure 2A). Width, length, and circumference were automatically calculated for each ROI. The mean  $\pm$  standard error (SE) was calculated for each sample.

## Electron microscopy

Semen from 5 fertile control men and 7 infertile men was analyzed by transmission electron microscopy (TEM). After liquefaction, the semen samples were centrifuged at 400g, the supernatant was discarded, and the pellets were fixed in a mixed solution of 4% w/v paraformaldehyde in 0.1 M PB containing 2.5% v/v glutaraldehyde (pH 7.4). Each preparation was then rinsed in PB (pH 7.4), post-fixed in 1% osmium tetroxide (w/v) for 1 h, dehydrated, and embedded in Araldite resin. After polymerization at  $58$ – $60^\circ\text{C}$  for 48 h, sections were made on an RMC MT -X ultramicrotome using a DIATOME diamond knife. Semi-thin sections were prepared, stained with toluidine blue 1% w/v and examined under a Nikon ECLIPSE E200 light microscope. Adjacent ultrathin sections (50–70 nm) were stained with uranyl acetate followed by lead citrate and examined using a JEOL JEM-1010 transmission electron microscope at 80 kV accelerating voltage. Images were captured with a Hamamatsu C-4742-95 digital camera and processed with Photoimpact<sup>®</sup> (Skowronek et al., 2012).

## Evaluation of sperm respiration control ratio by high-resolution respirometry

We analyzed mitochondrial function of spermatozoa from 171 men as previously described (Cassina et al., 2015). Oxygen consumption rate (OCR) of  $30 \times 10^6$  sperm resuspended in BWW was measured by high-resolution respirometry. HRR integrates highly sensitive oxygraphs (Oxygraph-2 K; Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, Austria) with software (DatLab, version 4.2; Oroboros Instruments GmbH) that displays respiration in terms of oxygen flux ( $\text{pmol O}_2/1 \times 10^6$  cells/sec). For all experiments, the stirrer speed was set to 750 rpm and the temperature was set to  $37^\circ\text{C}$ . Basal respiration was measured for 5–10 min before adding 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  oligomycin, an ATP synthetase inhibitor. Maximal respiration was achieved by subsequent stepwise addition of the uncoupling agent 0.1–1  $\mu\text{M}$  FCCP. Finally, a complex III inhibitor, 2.5  $\mu\text{M}$  AA, was added to distinguish mitochondrial from residual oxygen consumption (non-mitochondrial respiration). Three indices are described by HRR: Coupling efficiency, spare respiratory capacity, and respiratory control ratio (RCR). We calculated: coupling efficiency (ratio between respiration associated with ATP synthesis and basal respiration), spare

respiratory capacity (ratio between maximal and basal respiration rates), and finally respiratory control ratio (RCR, the ratio between maximal and oligomycin-resistant respiration rates) (Brand and Nicholls, 2011; Ferreira et al., 2021).

## Evaluation of sperm of hydrogen peroxide production

Hydrogen peroxide was measured using 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red). Amplex Red reacts in the presence horseradish peroxidase (HRP) with  $H_2O_2$  in a 1:1 (v:v) stoichiometry to produce a highly red-fluorescent oxidation product, resorufin (Zhou et al., 1997; Messner and Imlay, 2002; González-Perilli et al., 2013). Amplex Red was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to give a concentration of 1.25 mg/ml. This stock was frozen in aliquots and stored at  $-70^\circ C$  for several months. A 0.8 ml aliquot of the stock was mixed with 18 ml of 50 mM potassium phosphate, pH 7.4, and kept shielded from light; this preparation is good for several hours (Messner and Imlay, 2002).

During standardization of the method a time-lapse analysis with and without  $2.5 \mu M$  AA was done during 50 min (Figure 3A). Preliminary experiments were performed to determine the proper amount of human sperm cells and incubation time for  $H_2O_2$  determination (data not shown). Sperm from samples of 136 males were washed with PBS by centrifugation at 400 g and re-suspended in HAM-F10. Between  $2$  and  $6 \times 10^6$  spermatozoa in HAM-F10 were placed in 96-well Nunc F plates in a final volume of  $100 \mu L$  and exposed to HRP  $8 \mu g/ml$  and Amplex Red (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, United States)  $50 \mu M$ . The  $H_2O_2$  present in the sample was compared to a calibration curve of  $H_2O_2$  (final concentration  $0.03$ – $8 \mu M$ ). The measurements were performed for 30 min at  $37^\circ C$  in a Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, MA United States) at  $\lambda_{ex} = 530 nm$  and  $\lambda_{em} = 590 nm$ . Duplicates were performed in samples and triplicates to perform the standard curve.

## Evaluation of the antioxidant status of SP

The antioxidant capacity of SP from 95 men was determined by ferric-xylenol orange assay (FOX:  $100 \mu M$  xylenol orange,  $250 \mu M Fe^{2+}$ ,  $4 mM$  BHT,  $25 mM H_2SO_4$ , and  $90\%$  (v/v) methanol) (Jiang et al., 1990; Reyes et al., 2011) following the  $H_2O_2$  consumption after 30 min (Gay and Gebicki, 2002).  $H_2O_2$  oxidizes ferrous ions to ferric ions. To measure the ferric ions formed, we mixed  $35 \mu L$  of plasma in a final volume of  $1 ml$  of  $50 mM$  phosphate-sodium buffer, pH 7.4, containing  $100 \mu M H_2O_2$ . Aliquots of  $100 \mu L$  were taken from the reaction tube and mixed with  $900 \mu L$  of FOX at time points 0 and 30 min. All tubes were centrifuged at  $2000 g$  for 5 min to remove all residual

precipitate.  $H_2O_2$  consumption was monitored by tracking the changes in absorbance at  $560 nm$  at  $25^\circ C$  using a UV-Visible spectrophotometer UV-2450, Shimadzu. The  $H_2O_2$  extinction coefficient was determined as  $53.900 M^{-1}cm^{-1}$ . To determine the final concentration of  $H_2O_2$ , a standard curve of  $[H_2O_2]$  (concentration  $5$ – $200 \mu M$ ) was included in the assay. At least three independent measurements were performed for each sample. Proteins in SP were quantified using the Bradford method (Bradford, 1976). Note that the less residual hydrogen peroxide measured, the more antioxidant capacity SP has.

## Statistics

Statistical analysis was performed based on the GraphPad Prism statistical package version 8.0.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California United States, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com), and the statistical software JASP Team (2020), JASP (version 0.140). Data were expressed by arithmetic means, the corresponding standard errors, medians, and the 25th and 75th percentiles. Normal distribution of the data was tested using the Shapiro-Wilk normality test, which revealed that most sperm parameter values were not normally distributed. The Pearson test or Spearman correlation test was used to determine the relationship between the parameters and mitochondrial measurements. Comparisons between means were made using either the ANOVA test (multiple groups) or Student's t test or Mann-Whitney test as a function of the normal distribution of the data (two groups). Receiver operating characteristic curves (ROC) were used to show the ability of mitochondrial function,  $[H_2O_2]$  and/or antioxidants to discriminate between samples with progressive motility  $\geq$  vs.  $< 32\%$ , normal sperm morphology  $\geq$  vs.  $< 4\%$  or normal vs. abnormal spermiogram. Finally, cut off values were chosen to maximize the sum of sensitivity and specificity. Hypotheses were contrasted with two tails, and a  $p$ -value of less than 0.05 was considered statistically significant. For the experiments to determine the cut offs, the sample size was calculated with a confidence interval (CI) of 95%, a margin error of 5 and 10% of the population.

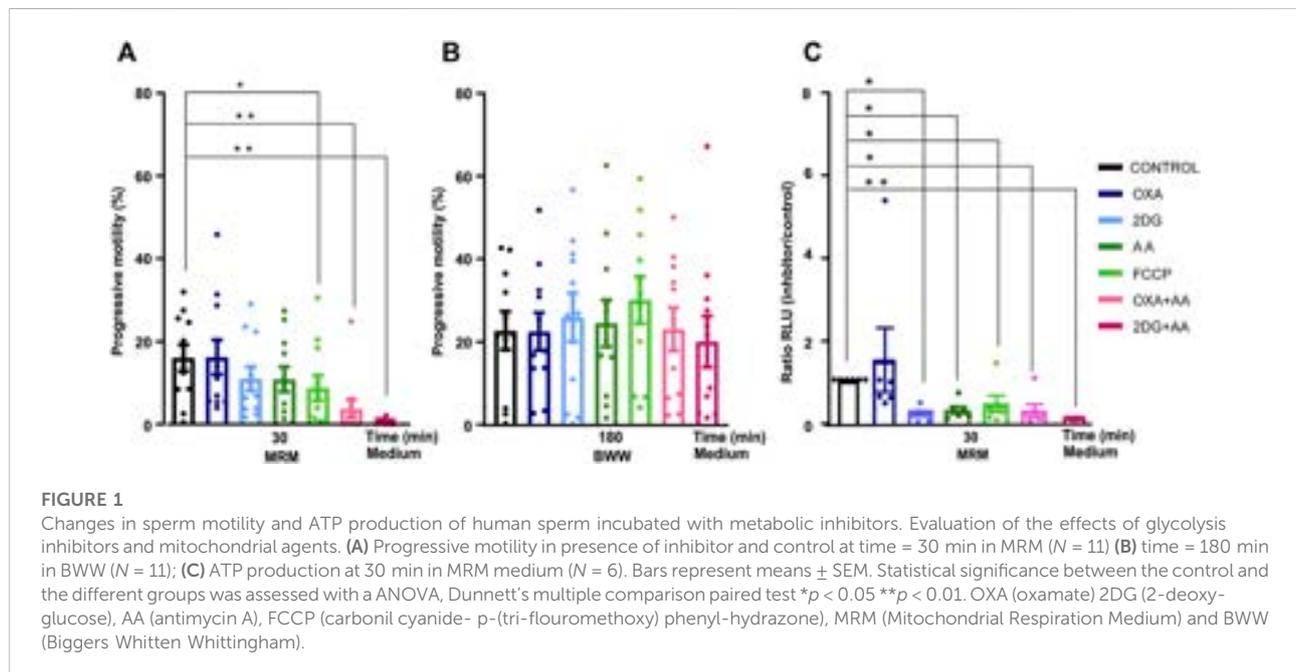
## Results

### Studied population

A total of 339 men aged 18–63 years were included in the study. The mean, standard deviation (SD), median, maximum and minimum values of the six main semen analysis parameters are listed in Table 1. These include sperm concentration, ejaculate volume, sperm viability, round cell concentration, percentage of normal morphology, and progressive motility. Experiments were performed in a total of 206 normozoospermic men and 133 men with abnormal

TABLE 1 Descriptive characteristics of participants' sperm parameters. Data were obtained by analyzing the first spermogram of 339 individuals who attended the andrology clinic. Max = maximum value. Min = minimum value \*lower reference values (WHO, 2010).

Parameter	Mean	SD	Median	Max	Min	*Lower reference limit
Patient age (yr)	34.9	7.3	35.0	63.0	18.0	—
Volume (ml)	3.6	1.5	3.5	10.0	0.5	1.5
Sperm concentration (million/mL)	47.7	38.0	40.6	214.0	0.04	15
Sperm viability (%)	86.5	11.7	89.0	99.0	3.0	58
Normal sperm morphology (%)	7.7	4.3	7.0	28.0	0.0	4
Progressive motility (a+b) (%)	54.4	17.2	58.0	90.0	3.0	32
Round cells (million/ml)	0.7	2.0	0.2	3.0	0.001	1



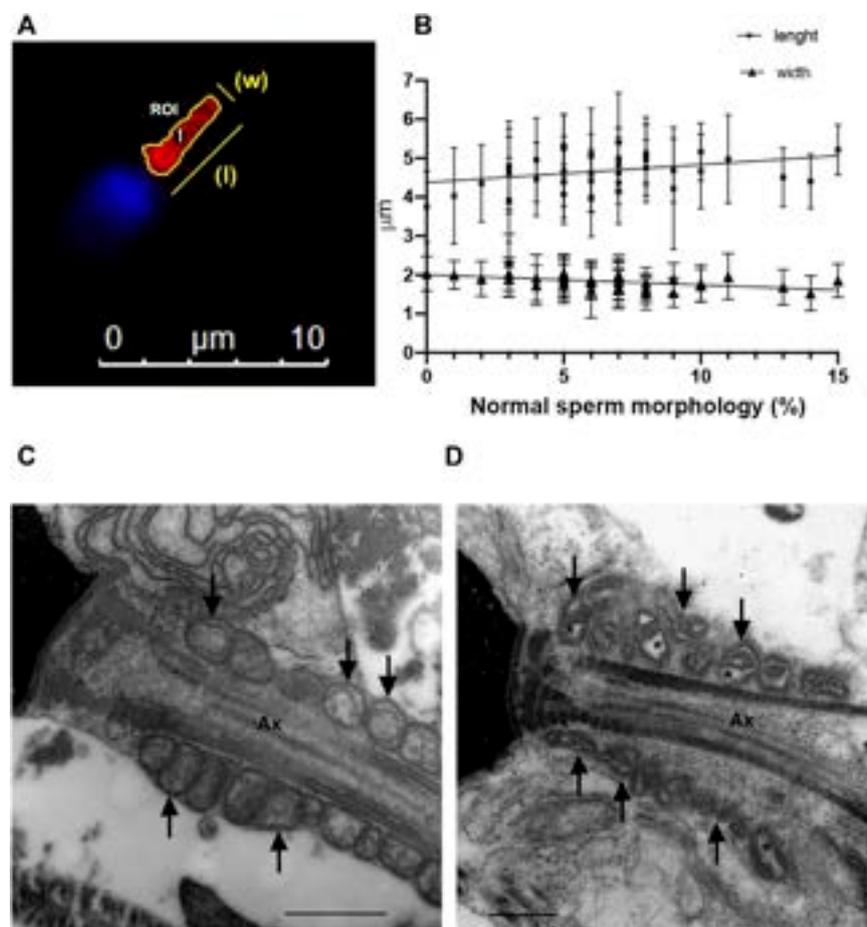
semen parameters (17 asthenozoospermic, 19 teratozoospermic, 30 oligozoospermic, 10 oligo-asthenozoospermic, 8 terato-asthenozoospermic, 17 oligo-terato-asthenozoospermic, and 32 oligo-teratozoospermic males) (Kruger et al., 1988; WHO, 2010) (Supplementary Figure S1).

## Changes in mitochondrial function are related to human sperm motility and morphology

Since the role of mitochondria in human sperm function has not been fully elucidated (Ruiz-Pesini and Epez 2000; Marchetti et al., 2002; Miki et al., 2004; Gallon et al., 2006; Ruiz-Pesini et al., 2007; Ferramosca et al., 2008; Koppers et al.,

2008; Nascimento et al., 2008; Ferramosca et al., 2012; Sousa et al., 2011; Goodson et al., 2012; Piomboni et al., 2012; Marques et al., 2014; Moscatelli et al., 2017; Ammar et al., 2020; reviewed in: Amaral et al., 2013; Boguenet et al., 2021; Castellini et al., 2021), we first analyzed the role of the glycolytic and oxidative phosphorylation system (OXPHOS) in sperm motility and ATP production, as well as mitochondrial morphology of sperm.

First, we incubated spermatozoa from normozoospermic men in medium without nutrients (MRM) and added either glycolytic or mitochondrial function inhibitors. We used drugs that act at different levels of cellular metabolism: 2DG inhibits glycolysis by competing with endogenous glucose, OXA is an analog of pyruvate and inhibits the production of lactate, whereas FCCP is a respiratory chain uncoupler from the OXPHOS, and AA inhibits the mitochondrial complex III. Neither OXA nor



**FIGURE 2**

Sperm morphology analysis (A) Epifluorescence microscopy of the mid-piece of a human sperm cell. Manual segmentation of sperm mid-pieces using ImageJ/FIJI; (B) Correlation between mid-piece length and width and normal sperm morphology ( $N = 36$ ). (C) Electron microscopy of sperm from a normozoospermic fertile man. (D) Electron microscopy of sperm from an infertile man with abnormal semen parameters. Defects on mitochondria are shown with arrows and asterisks indicate alterations in mitochondrial membranes. Ax = axoneme. Bars: 500 nm.

2DG nor AA significantly modified sperm motility. The sperm motility decreased significantly when the mitochondrial function was challenged by FCCP (Figure 1A). The combination of AA (mitochondrial inhibitor) and OXA or 2DG (glycolytic inhibitors) were required to completely decrease sperm motility. To test sperm viability, we washed sperm and incubated them in medium containing substrates (glucose, lactate, and pyruvate) for 3 h. Under these conditions, recovery of sperm motility was complete in all groups studied. (Figure 1B).

Second, we examined sperm ATP production under the same conditions as in the motility experiments. Sperm ATP production decreased under all the different conditions except when we added OXA (Figure 1C).

Finally, sperm mid-piece and mitochondrial morphology were analyzed (Figure 2). The sperm mid-piece was labeled with a red fluorescent dye that stains mitochondria

(Figure 2A). Mid-piece length was positively correlated (Pearson correlation) with the percentage of normal morphology sperm in the semen samples ( $r = 0.37$ ,  $p = 0.02$ ), while mid-piece width had a negative correlation with normal progressive motility (graph not shown) and morphology parameters (Figure 2B) ( $r = -0.56$   $p = 0.0004$  and  $r = -0.57$   $p = 0.0013$ , respectively).

In addition, we examined sperm mitochondria using electron microscopy (Figures 2C,D). We observed that in spermatozoa from samples with a percentage of normal spermatozoa  $<4\%$ , the sperm mitochondria had abnormal shapes with dilatation of the inner mitochondrial matrix (asterisks in a representative image in Figure 2D).

Overall, these results indicate that sperm motility in normozoospermic males depends on mitochondrial function and that spermatozoa can maintain motility through the mitochondrial pathway. On the other hand, in men with

TABLE 2 Correlation between sperm parameters and mitochondrial indices. Coupling efficiency = ATP turnover/basal respiration. Spare respiratory capacity = maximal respiration rate/basal respiration. RCR = maximal respiration in the presence of FCCP/respiration in the presence of oligomycin,  $N$  = number of donors. Statistical analysis was evaluated using Spearman's test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Parameter	Progressive motility (%)			Normal sperm morphology (%)		
	$N$	Spearman's $r$	$p$ -value	$N$	Spearman's $r$	$p$ -value
Coupling efficiency	166	0.239	0.002**	144	0.146	0.08
Spare respiratory capacity	166	0.174	0.025*	144	0.050	0.540
RCR	171	0.303	<0.001***	147	0.276	<0.001***

altered seminal quality, the mid-piece and the mitochondria also showed abnormalities.

## The mitochondrial function of spermatozoa correlates with the sperm parameters of the classical spermogram

Next, we decided to investigate whether mitochondrial function could be used as an index of sperm health. We measured the OCR of intact spermatozoa in real time, before and after the addition of inhibitors and FCCP.

We examined 171 sperm samples with HRR and analyzed the results in the context of the classical spermogram (Tables 2, 3). We obtained three indices representing mitochondrial function and dysfunction (Cassina et al., 2015; Ferreira et al., 2021). Respiratory indices are ratios of oxygen consumption. They represent proportions of two rates so they are internally normalized to cell number or protein mass (Brand and Nicholls, 2011). RCR correlated positively with progressive motility and the percentage of normal sperm morphology in semen samples (Table 2). Similarly, the coupling efficiency and the spare respiratory capacity correlated positively with the percentage of sperm that exhibited progressive motility. Coupling efficiency and spare respiratory capacity did not correlate with the percentage of normal sperm morphology. We also divided the three main indices into two groups according to the sperm parameters (WHO's reference values) (Table 3). Only RCR showed statistically significant differences between samples in which both the percentage of motility and morphology were below or above the reference values. Mean  $\pm$  S.D of RCR of samples with progressive sperm motility  $\geq 32\%$  were statistically higher than those with less than 32% ( $5.7 \pm 6.8$ ,  $n = 155$ , vs.  $2.4 \pm 0.9$ ,  $N = 16$ ,  $p < 0.001$ ). Sperm from males with a percentage of normal morphology  $\geq 4\%$  have a higher RCR than those with abnormal sperm morphology  $< 4\%$  ( $5.4 \pm 5.3$ ,  $N = 150$  vs.  $3.7 \pm 4.2$ ,  $N = 11$ , mean  $\pm$  SD,  $p = 0.03$ ). Unexpectedly, and although viability correlated to RCR ( $r = 0.1754$ ,  $p = 0.0266$ , Spearman correlation, graph not shown), we did not see

statistically significant differences between samples in which the percentage of viable cells were below or above 58% (WHO's reference value). Also, there were no differences when the indices were analyzed using the reference values for the other semen parameters analyzed (volume or concentration) (data not shown).

These results show that mitochondrial function is correlated with semen parameters. Moreover, RCR is the best index to discriminate between samples with normal and abnormal semen parameters.

## The percentage of sperm with progressive motility and normal sperm morphology correlates negatively with hydrogen peroxide production

First, we detected extracellular  $[H_2O_2]$  produced by sperm. For this purpose, we measured the reaction between Amplex red and  $H_2O_2$  in the presence of HRP (Richer and Ford, 2001; Bamber et al., 2002; Yáñez-Ortiz et al., 2021).

Upon addition of AA, an increase in  $H_2O_2$  production is observed compared with baseline, suggesting that mitochondria may be a source of  $H_2O_2$  in sperm cells as previously shown (Figure 3A) (Koppers et al., 2008; Storey, 2008; Aitken et al., 2012b; Escada-Rebelo et al., 2020).

Subsequently, 136 sperm samples with different sperm parameters were analyzed. The  $H_2O_2$  production per million spermatozoa correlated negatively with sperm concentration ( $r = 0.32$ ,  $p < 0.001$ , Spearman correlation), percentage of spermatozoa with progressive motility, and percentage of normal sperm morphology (Table 4).

There were no statistical differences between the  $[H_2O_2]$  produced by samples with progressive motility  $\geq$  or  $< 32\%$  ( $0.75 \pm 0.19 \mu M/10^6$  spermatozoa and  $1.53 \pm 0.92 \mu M/10^6$  spermatozoa, respectively, mean  $\pm$  SEM, Figure 3B). The  $[H_2O_2]$  value was significantly higher in the samples with percentage of normal sperm morphology less than 4% (Figure 3C). The mean  $\pm$  SEM of samples with more than

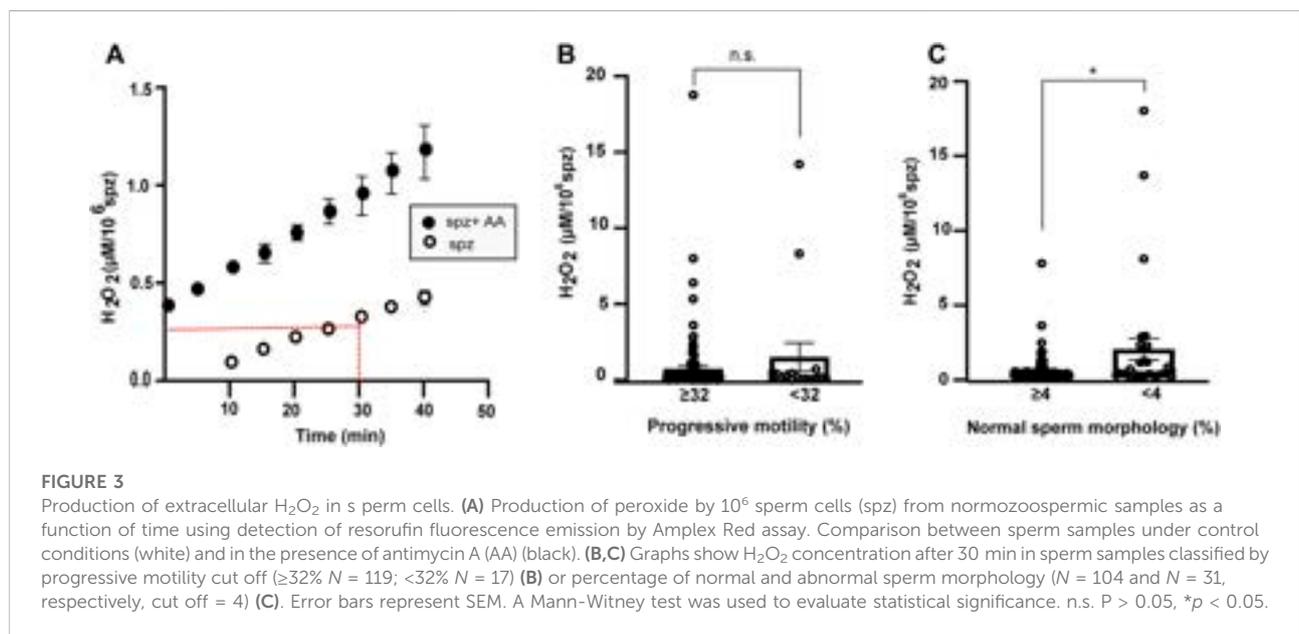
TABLE 3 Main respiratory indices classified by sperm parameters. RCR = respiratory control ratio SD = standard deviation. Max = maximum. Min = minimum. Statistic analysis, Man Whitney test. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### Progressive motility

Indices	Mean		<i>p</i> -value	SD		Median		Max		Min	
	≥32%	<32%		≥32%	<32%	≥32%	<32%	≥32%	<32%	≥32%	<32%
Coupling efficiency	0.510	0.442	0.684	0.187	0.161	0.504	0.412	0.955	0.800	0.045	0.200
Spare respiratory capacity	1.982	1.695	0.126	0.807	0.6866	1.788	1.610	6.570	3.267	0.521	0.635
RCR	5.658	2.400	<0.001***	6.796	0.914	3.550	2.124	57.231	4.19	0.744	0.857

### Normal sperm morphology

Indices	Mean		<i>p</i> -value	SD		Median		Max		Min	
	≥ 4%	<4%		≥ 4%	<4%	≥ 4%	<4%	≥ 4%	<4%	≥ 4%	<4%
Coupling efficiency	0.503	0.497	0.710	0.186	0.170	0.498	0.451	0.955	0.800	0.045	0.288
Spare respiratory capacity	1.992	1.694	0.350	0.826	0.552	1.814	1.726	6.570	2.413	0.521	0.635
RCR	5.434	3.746	0.032*	5.354	4.208	3.610	2.529	31.825	16.132	0.744	1.108



4% normal morphology was  $0.42 \pm 0.10 \mu\text{M}/10^6$  spermatozoa and  $1.96 \pm 0.76 \mu\text{M}/10^6$  spermatozoa in samples with morphology <4% (Figure 3C). There were no statistical differences in the other parameters analyzed.

Thus, measuring extracellular [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] correlates with main semen parameters. The method discriminates between men with percentage of normal sperm morphology ≥4% and <4% in their spermogram using strict criteria (Kruger et al., 1988).

## Seminal plasma antioxidant status correlates with sperm motility

To analyze whether the negative correlation of the production of [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] with sperm parameters could be a consequence of variations in the antioxidant capacity of SP, we examined the percentage of residual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after addition of SP.

TABLE 4 Correlation between semen parameters and [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] or percentage of residual hydrogen peroxide (antioxidant capacity). Spearman's test was used. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001. N = number of samples. %percentage of sperm normal morphology.

	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] per million sperm (μM/10 <sup>6</sup> sperm)			Residual hydrogen peroxide (%)		
	N	Spearman's r	<i>p</i> -value	N	Spearman's r	<i>p</i> -value
Progressive motility (%)	136	-0.175	0.042*	95	-0.342	<0.001***
Sperm morphology <sup>a</sup>	128	-0.261	0.003**	95	0.014	0.890
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] per million sperm(μM)	—	—	—	45	0.080	0.500

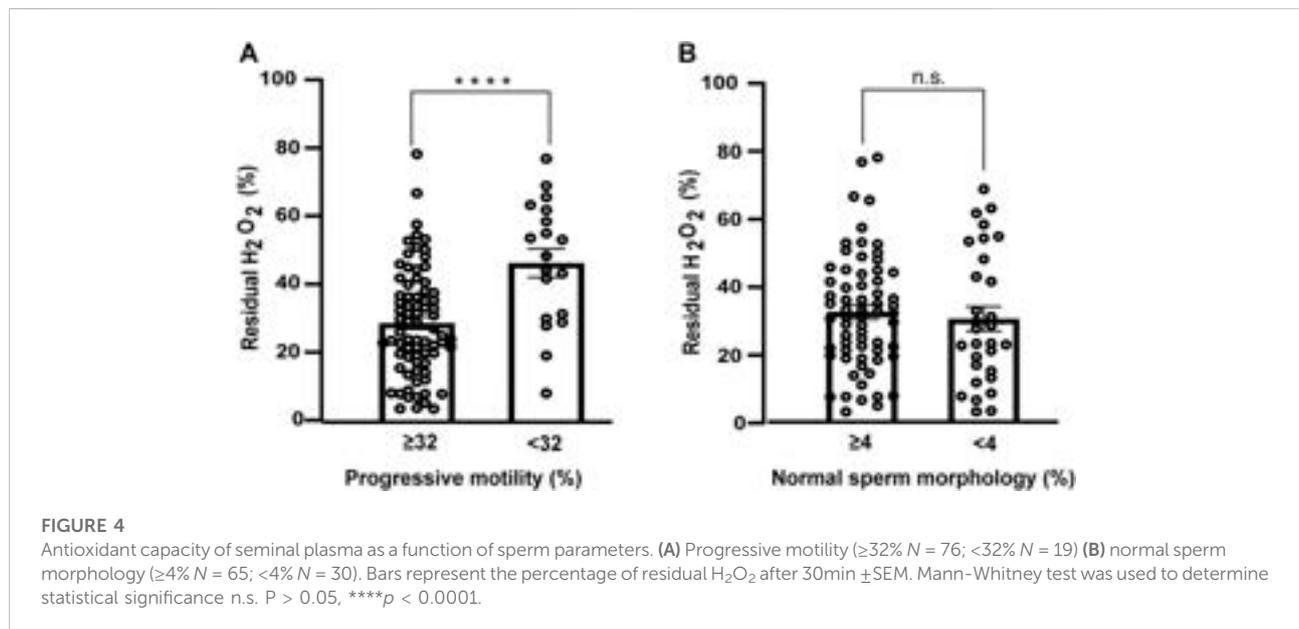


FIGURE 4

Antioxidant capacity of seminal plasma as a function of sperm parameters. (A) Progressive motility (≥32% N = 76; <32% N = 19) (B) normal sperm morphology (≥4% N = 65; <4% N = 30). Bars represent the percentage of residual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 30min ± SEM. Mann-Whitney test was used to determine statistical significance n.s. P > 0.05, \*\*\*\**p* < 0.0001.

The antioxidant capacity of SP correlated with sperm motility and was higher in samples with progressive motility ≥32% (Table 4 and Figure 4A). The mean ± SEM of the antioxidant capacity of SP was 28.6 ± 1.8% in men with progressive sperm motility ≥32% and 46.2 ± 4.2% in men presenting <32% *p* < 0.00001 (Mann Whitney test). The antioxidant status of SP did not correlate with the percentage of normal sperm morphology of the samples (Table 4 and Figure 4B). The means ± SEM were 32.7 ± 2.1% and 30.7 ± 3.6% when we analyzed SP of samples with normal sperm morphology of more and less than 4%, respectively (*p* = 0.4, *t*-test). The [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] produced by the same sample did not correlate with the percentage of residual peroxide (Table 4). There were no differences when the indices were analyzed against the reference values for the other sperm parameters (data not shown).

These results suggest that the antioxidant capacity of SP has a strong correlation with progressive sperm motility. Samples with higher motility have higher antioxidant

capacity, which is reflected in a lower percentage of residual peroxide. FOX method can distinguish between normal and abnormal sperm motility.

## RCR is a good indicator of the functional status of human sperm

The diagnostic ability of the previous indices as binary classifiers was determined using the ROC curves. The results were classified into two groups (using reference values of 32 and 4% for sperm motility and morphology, respectively) (Figures 5A,B; Table 3). The ROC curve showed good specificity and sensitivity in the case of RCR (Figures 5C,D). As for motility, the area under the curve (AUC) corresponded to 0.773 (95% CI between 0.672–0.873, *p* < 0.001). An RCR cut off point of 2.93 was established with a sensitivity of 75% and a specificity of 69% (Figures 5A,C). In the case of morphology, the AUC corresponded to 0.692

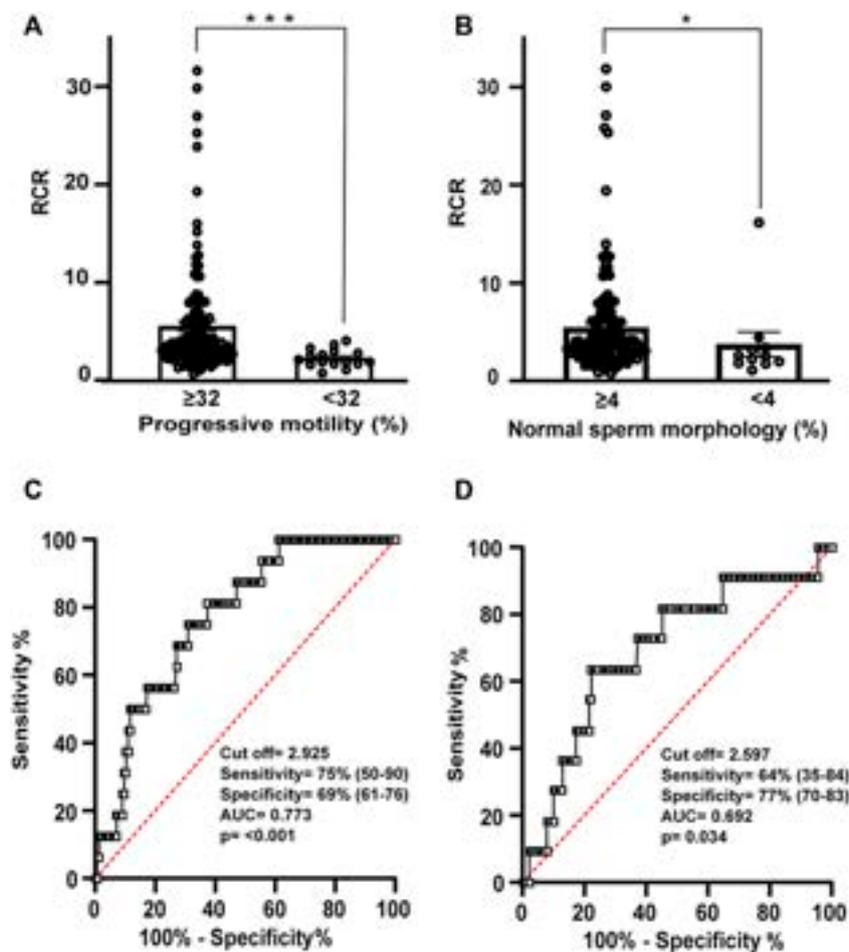


FIGURE 5

Relation between RCR, motility and morphology spermogram parameters. Bars represent means  $\pm$  SEM of (A) progressive motility ( $\geq 32\%$   $N = 155$ ;  $< 32\%$   $N = 16$ ) and (B) normal sperm morphology ( $\geq 4\%$   $N = 150$ ;  $< 4\%$   $N = 11$ ). Mann-Whitney test was used to determine statistical significance;  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ . (C) Receiver operating characteristic (ROC) curve showing RCR cut off value, sensitivity (%), specificity (%), and area under the curve for samples with normal or abnormal percentage of progressive motility and (D) ROC curve showing RCR cut off value, sensitivity (%), specificity (%), and area under the curve for samples with normal or abnormal percentage of spermatozoa with normal morphology.

(95% CI between 0.524–0.860,  $p = 0.034$ ) (Figures 5B,D). A cut off point of RCR of 2.60 was set with a sensitivity of 64% and a specificity of 77%.

A ROC curve (AUC = 0.651, 95% CI between 0.530–0.772,  $p = 0.012$ ) determined  $0.197 \mu\text{M} [\text{H}_2\text{O}_2]/10^6$  spermatozoa as the cut off value with 71% sensitivity and 61% specificity when samples were classified using reference values of normal sperm  $\geq 4\%$  in their spermogram (Figure 3C; Supplementary Figure S2). However, it was not possible to establish a cut off value of the  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  when the reference value of the spermogram was  $\geq 32\%$  of progressive motile sperm (Figure 3B).

In the case of residual hydrogen peroxide, a cut off value of 41% was set only when reference value for motility were applied. The ROC curve has an AUC = 0.765 (95% CI

between 0.539–0.892,  $p < 0.001$ ) with 68% specificity and 79% sensitivity (Figure 4A; Supplementary Figure S3).

Thus, we were able to establish cut offs for the three different assays with respect to the classic spermogram.

## RCR and $\text{H}_2\text{O}_2$ production can distinguish between normal and abnormal samples

Finally, to establish reference values encompassing all sperm parameters, we divided the male population into normozoospermic males and those with at least one abnormal sperm parameter (include: teratozoospermic, asthenozoospermic, oligozoospermic, terato-asthenozoospermic, and oligoasthenoteratozoospermic men).

The cut off value for RCR determined from the ROC curve (AUC = 0.695, 95% CI: 0.5792–0.810,  $p = 0.003$ ) was 3.15 (sensitivity and specificity 73 and 61%, respectively) (Figures 6A,C).

The ROC curve (AUC = 0.610, 95% CI between 0.512–0.719,  $p = 0.044$ ) determined a cut off value of  $[H_2O_2] = 0.198 \mu M/10^6$  spermatozoa (sensitivity of 65% and specificity of 60%) between both groups (Figures 6B,D).

When the population was divided into normozoospermic and abnormal spermograms, no cut off value was determined for the percentage of residual hydrogen peroxide.

Therefore, RCR and  $[H_2O_2]$  are good methods for classifying semen samples with normal or abnormal spermograms.

## Discussion

The source of ATP production for mammalian sperm motility has been widely studied (Miki et al., 2004; Mukai and Okuno, 2004; Miki, 2007; Ruiz-Pesini et al., 2007; Ferramosca et al., 2008, 2012; Goodson et al., 2012; Mukai and Travis, 2012; Piomboni et al., 2012; Moscatelli et al., 2017). The question of whether glycolysis or OXPHOS is the main source of ATP for sperm motility is controversial and considered species-specific (Storey, 2008; Amaral et al., 2013; Castellini et al., 2021; Kumar, 2022). By inhibiting the glycolytic pathway and mitochondrial function, we were able to confirm that energy supply (ATP) formed at the mitochondrial level is important for sperm motility in semen samples with normal parameters. Furthermore, we

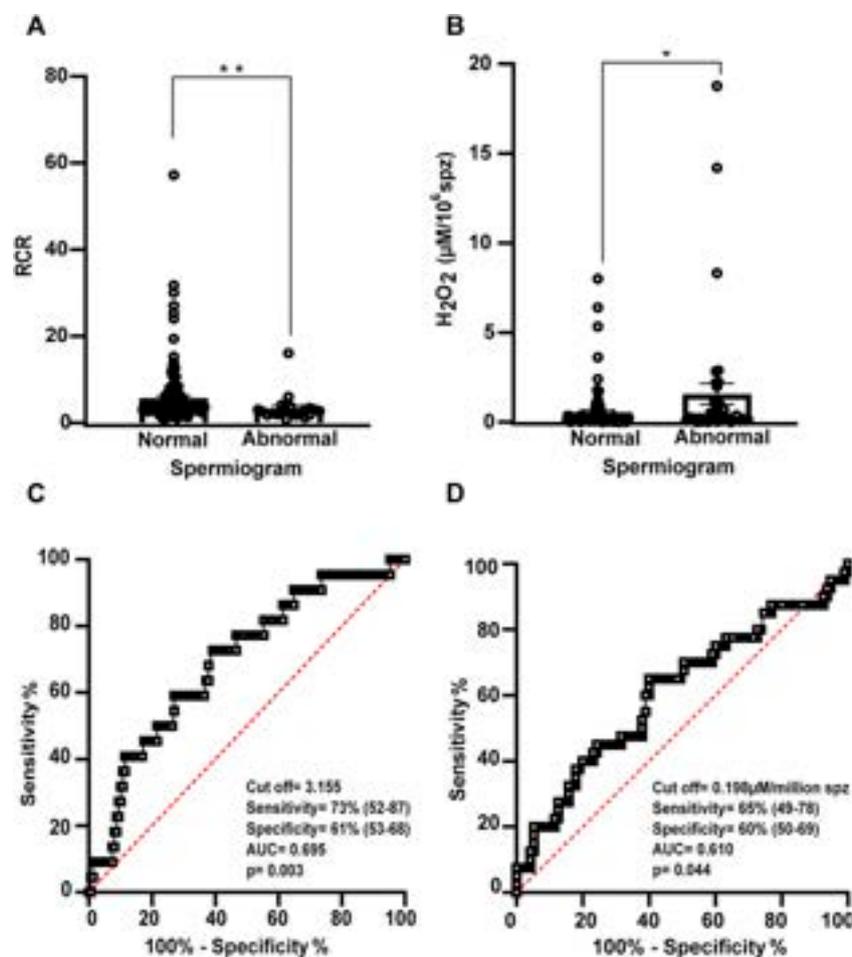


FIGURE 6

Relation between RCR and hydrogen peroxide concentration and spermogram parameters. Bars represent the mean values of (A) RCR (normal  $N = 148$ ; abnormal  $N = 23$ ) and (B) extracellular  $H_2O_2$  concentration (normal  $N = 95$ ; abnormal  $N = 40$ )  $\pm$  SEM. A Mann-Whitney test was used to evaluate statistical significance. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (C) Receiver operating characteristic (ROC) curve showing RCR cut off value, sensitivity (%), specificity (%), and area under the curve for normal and abnormal spermogram and (D) (ROC) curve showing  $[H_2O_2]$  cut off value ( $\mu M$ /million sperm), sensitivity (%), specificity (%), and area under the curve for abnormal and normal spermogram.

observed that motility and morphological alterations detected in routine semen analysis correlated with morphological changes in the mid-piece (Figure 2). Both observations make it reasonable to study mitochondrial sperm function in men with altered sperm parameters.

Our findings are consistent with some previous data emphasizing the role of OXPHOS as an essential ATP source for sperm function in humans and mice (Ruiz-Pesini et al., 1998; Ferramosca et al., 2008; Stendardi et al., 2011; Ferramosca et al., 2012; Piomboni et al., 2012; Ferramosca and Zara, 2014; Cassina et al., 2015; Moscatelli et al., 2017; Marín-Briggiler et al., 2021). Overall, it is now conceivable that both glycolysis and OXPHOS contribute to ATP production and depend on each other in controlling sperm functions reliant on the differential availability of energetic substrates in the environment (Castellini et al., 2021). There are also data from proteomic studies highlighting the contribution of lipid  $\beta$ -oxidation as a sperm metabolic pathway (Amaral et al., 2013), suggesting that sperm metabolism is complex and needs further analysis.

We have previously shown that markers of mitochondrial function and dysfunction (such as RCR) reflect sperm activity (Cassina et al., 2015) and that they are associated with the cell's ability to fertilize (Ferreira et al., 2021). The data presented here highlight the differences in mitochondrial function in men with different sperm parameters. We propose that assessment of mitochondrial function is useful to provide information on sperm metabolic status in men.

Several analyzes have associated semen parameters with mitochondrial function (Marchetti et al., 2002; Gallon et al., 2006; Amaral and Ramalho-Santos, 2010; Uribe et al., 2017; Durairajanayagam et al., 2021; Tanga et al., 2021). However, the evaluation of sperm mitochondrial activity is not usually part of human sperm testing studies. Oximetry and HRR in particular, have the advantage over other mitochondrial analyzes in that they can examine motile (live) and intact (non-permeabilized) spermatozoa (Cassina et al., 2015; Ferreira et al., 2021). In particular, RCR has high sensitivity to all points of mitochondrial function, so most of them can be analyzed in the same experiment, e.g., respiratory chain, mitochondrial membrane potential, and respiratory reserve capacity. It has the disadvantage of requiring expensive equipment and specialized personnel. Although the sensitivity of the equipment is very high, our team has determined that at least 12 million/ml of sperm are required to detect variations in oxygen consumption. We are aware that this low limit is not only a drawback of the method, but also a limitation of this study because we could not measure sperm from some oligozoospermic males. Other authors have used HRR to analyze sperm metabolism, looking for either changes in mitochondrial function under different experimental conditions (Cedikova et al., 2014; Hereng et al., 2014; Le Foll et al., 2021) or differences between sperm from normozoospermic and asthenozoospermic men (Cedikova

et al., 2014; Cedíková et al., 2014) suggesting that this tool has potential applications.

Sperm oxygen consumption has been successfully measured using similar sensitive methods (e.g., Seahorse flux analyzer) (Tourmente et al., 2015; Balbach et al., 2020a, 2020b). These studies have demonstrated the importance of mitochondrial oxygen consumption in sperm capacitation in mice (Balbach et al., 2020b) and the differences between mitochondrial metabolism in several strains of mice (Tourmente et al., 2015). This last method has the advantage of analyzing extracellular acidification (ECAR) and oxygen consumption rates simultaneously. It can eventually be applied to a smaller number of cells. The disadvantage of Seahorse XF is that ECAR is based on measurements of extracellular pH near the plasma membrane, so these experiments exclude the use of  $\text{HCO}_3^-$ , which is required in some of the sperm media (Traba et al., 2016; Hidalgo et al., 2020). In the Seahorse flux analyzer, cells must adhere to the plates, potentially affecting metabolic functions. HRR has the property that cells can move freely, which is *a priori* an advantage in the case of sperm. Defects in sperm parameters are often directly related to high levels of ROS in the male reproductive tract and semen (Kumar et al., 2009; Agarwal et al., 2014b; Bonanno et al., 2016; Nowicka-Bauer and Nixon, 2020). Consistent with previous reports (Aitken et al., 2012b; Ammar et al., 2020), our data show an association between abnormal mitochondrial sperm morphology and altered sperm motility and morphology in subjects exhibiting multiple alterations in the spermiogram. In other cell types, mitochondrial structural changes have been reported as part of mitochondrial dynamics in response to ROS (Galloway et al., 2012; Martínez et al., 2019, 2020). In mature spermatozoa, mitochondria are arranged around flagella and form a thick mitochondrial sheath stabilized by di-sulfide bonds (Otani et al., 1988). This capsule-like structure provides mechanical stability, protection, and resistance to hypo-osmotic stress (Amaral et al., 2013). Therefore, sperm mitochondria are unlikely to undergo the same dynamic changes observed in other cell types. However, human sperm mitochondria exhibit a looser morphology during capacitation, likely due to an increase in mitochondrial volume (Vorup-Jensen et al., 1999). Capacitation is a functional change in sperm that prepares cells for fertilization (Austin, 1952) and requires small amounts (considered physiological) of ROS (de Lamirande et al., 1997). Whether increased ROS production can alter sperm mitochondrial morphology remains to be investigated.

All in all, these results argue in favor of studying mitochondrial analysis in parallel with the redox status of sperm and semen. Moreover, these results were also consistent with those of respirometry studies; when sperm parameters were abnormal, an increase in  $\text{H}_2\text{O}_2$  was measured. In this study, we used a previously published assay (Richer and Ford, 2001; Baumber et al., 2002; Yáñez-Ortiz et al., 2021) to detect  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in sperm.

We observed a negative correlation between sperm parameters and  $H_2O_2$  production. These results are consistent with those obtained by other methods, such as a correlation between ROS production and oligozoospermia (Agarwal et al., 2014a), asthenozoospermia (Bonanno et al., 2016), and teratozoospermia (Agarwal et al., 2014b). It has already been reported that defective spermatozoa produce higher amounts of ROS than normal ones (Aitken et al., 2012b), but an effect of  $H_2O_2$  upstream on spermatogenesis that interferes with the final sperm production and reduces sperm concentration and/or sperm motility and morphology cannot be excluded.

Although the sensitivity and specificity of various tests measuring ROS have been published, they remain variable, are not standardized, and generally cannot provide diagnostic recommendations (Aitken et al., 2012a; Benjamin et al., 2012; Sharma et al., 2017; Agarwal et al., 2021a). In addition, many tests for ROS are expensive, time-consuming, often require specialized training, and are therefore not readily available in clinical and diagnostic laboratories (Alahmar, 2019; Agarwal et al., 2021a; 2021b). Extracellular hydrogen peroxide measurement by amplex red has the limitation of being an indirect assay. However, this approach has several advantages over other ROS assays. As  $O_2^{\bullet-}$  does not cross membranes at physiological pH, measurement of hydrogen peroxide, which is the product of  $O_2^{\bullet-}$  dismutation and diffuses through membranes, can then be used as an indicator of mitochondrial  $O_2^{\bullet-}$  levels. Furthermore, peroxide is much more stable than  $O_2^{\bullet-}$  and can accumulate in easily detectable amounts (Messner and Imlay, 2002; Wang et al., 2018). Our results showed an increase in the formation of hydrogen peroxide when AA (inhibitor of the III complex of the respiratory chain) was added, confirming that mitochondria are a source of ROS formation. An advantage of measuring hydrogen peroxide by this method is that it does not require specialized technicians or sophisticated equipment. It also represents mitochondrial superoxide production in sperm (Wang et al., 2018).

SP contains many enzymatic and non-enzymatic antioxidants, which are a source of sperm protection against oxidative stress (Khosrowbeygi and Zarghami, 2007; du Plessis et al., 2008). Therefore, it is clinically relevant to establish the reference values for measuring ROS in combination with antioxidant capacity in SP (Agarwal et al., 2015). Using a sensitive method that quantifies the amount of residual hydrogen peroxide, we were able to determine the antioxidant capacity of several SP samples. There are already several essays available for measuring antioxidant capacity (Zini et al., 2000; Agarwal and Prabakaran, 2005; Baker and Aitken, 2005; Agarwal et al., 2006; Khosrowbeygi and Zarghami, 2007; Agarwal et al., 2015; Sharma et al., 2017; Robert et al., 2020). The reason for including this particular method in our analysis is that we can directly relate the production of ROS ( $H_2O_2$ ) to the antioxidant assay chosen (the percentage of decay of  $H_2O_2$  when de SP is added). In our study, seminal antioxidant capacity correlated positively with sperm motility. This is consistent with previous studies indicating that antioxidant

capacity is reduced in asthenozoospermic men (Pahune et al., 2013; Madej et al., 2021). However, antioxidant capacity did not correlate with the percentage of normal sperm morphology. It is known that antioxidant capacity in SP is related to age, environmental pollution, lifestyle, chronic or genital (varicocele) diseases (Eroglu et al., 2014; Roychoudhury et al., 2016; Madej et al., 2021). The analysis of these factors was beyond the scope of our study, but some of them could explain the lack of correlation between the antioxidant capacity of SP and sperm morphological alterations in the spermogram.

The measurement of oxidants in combination with the antioxidant capacity of a sample could be important to integrate the redox status of semen (Agarwal and Bui, 2017; Agarwal and Wang, 2017). Unexpectedly, in this work, the production of  $H_2O_2$  and the antioxidant capacity of SP were analyzed in 45 samples, but no correlation between  $[H_2O_2]$  extracellular and the percentage of residual peroxide in SP of the same samples was found. We can speculate that either sperm ROS production is not related to the antioxidant capacity measured by this method, or that other factors may influence semen composition. Since environmental factors affect the antioxidant capacity of SP as suggested above, some of them may be studied in the future to test the latter hypothesis. Using a device that measures the relative proportions of oxidants to reductants (antioxidants) called Male Infertility Oxidative System (MiOXSYS) (Agarwal and Bui, 2017; Agarwal et al., 2021b), the oxidation-reduction potential (ORP) was determined. ORP correlated with sperm parameters and male fertility status (Agarwal et al., 2017), including data from a multicentric study (Agarwal et al., 2019). The technique is promising for the evaluation of sperm oxidative stress. The device is not yet available worldwide, but it will be an alternative for analysis of sperm samples in relation to sperm metabolism.

The present study was performed on samples that are not pure oligozoospermic, asthenozoospermic, or teratozoospermic. This is a limitation of the analysis, however, the main objective of this study was to establish cut off of mitochondrial function in parallel with spermogram results. In particular, measurement of sperm RCR and their production of ROS by quantification of  $[H_2O_2]$  extracellular resulted in good indicators of sperm function and correlated with main semen parameters. Therefore, some reference values were determined. The data presented here show that RCR and  $[H_2O_2]$  are good binary classifiers; a RCR cut off point of 3.2 was established with a sensitivity of 73% and a specificity of 61% using reference values of 32 and 4% for sperm motility and morphology, respectively. The cut off value for  $[H_2O_2]$  was set at  $0.2 \mu M$  per million sperm (sensitivity = 65%, specificity = 60%). In contrast, semen antioxidant capacity had not been demonstrated to be a good indicator for classifying semen samples with normal or abnormal spermograms.

In this work, we established the cut off based on sperm parameters independently of the cause of the fertility status; e.g., we did not include the presence of chromosomal, genetic, hormonal abnormalities or other previously known conditions related to male fertility in the analysis. It will be interesting to test whether the reference values described can distinguish between these conditions.

Men who attend fertility clinics seek fertility advice, but not all men with abnormal sperm parameters are infertile and vice versa (Guzick et al., 2001; Cairo Consensus Workshop Group, 2020; Pandravadā et al., 2021). Infertility with normal semen parameters is one of the new challenges in this field. As a result, fertility clinics are looking for new indices to determine the true fertility potential of sperm. In our study, ROC curves were generated to determine the cut off values, sensitivity, and specificity of the assays using the previous reference parameters. We are aware that a weakness of the study is that the categorization is not between fertile and infertile men. Further studies are planned to apply the indices in the IVF clinic, where the true fertility potential of sperm can be assessed. In addition, multicentric validation of the results must be performed before these tools can be used in clinical practice. Nevertheless, the application of the mitochondrial and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sperm production indices may contribute to the understanding of sperm biology and may be helpful in explaining some cases of infertility.

## Conclusion

Semen evaluation is considered one of the most important laboratory tests for assessing male fertility. Although it is the gold standard method for studying infertile men, it still lacks functional analysis of sperm status. We propose that determination of RCR in combination with other analyzes (such as measurement of extracellular [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] sperm production and antioxidant capacity of SP) provides results on sperm functional status focusing on energy metabolism, involvement of mitochondrial function, and formation of ROS.

## Data availability statement

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Facultad de Medicina de la Universidad de la República Montevideo, Uruguay. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

PI, LR-V, and PP-P performed the experiments including standardization of protocols, respiratory analysis, and CASA evaluation. MFS performed the morphological studies. PI,

AC, and RS designed the experiments, analyzed the results, and wrote the manuscript. All authors read, corrected, and approved the final manuscript.

## Funding

AC is supported by grants from Universidad de la República (CSIC\_2018, Espacio Interdisciplinario\_2021). Additional funding was obtained from the Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA, Uruguay). PI, MFS, and RS are supported from Universidad de la República (I+D, CSIC 2014; I+D, CSIC 2016, Iniciación a la Investigación, CSIC 2019 and FMV\_1\_2017\_1\_136490 ANII- Uruguay). PI is supported by POS\_FMV\_2018\_1\_1007814.

## Acknowledgments

We thank Gabriela Casanova Facultad de Ciencias—UdelaR, Uruguay for her assistance with the MET experiments. Also, we are very grateful to Andres Trotchansky and Marcelo Reyes for their assistance in the FOX method (Facultad Medicina-Udelar, Uruguay). Finally, we would like to thank the Fertilab Andrology clinic, especially José María Montes and Andrea Torrents, for allowing us access to donors.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.926684/full#supplementary-material>

## References

- Agarwal, A., Ahmad, G., and Sharma, R. (2015). Reference values of reactive oxygen species in seminal ejaculates using chemiluminescence assay. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32, 1721–1729. doi:10.1007/s10815-015-0584-1
- Agarwal, A., and Bui, A. D. (2017). Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress: Correlation to male infertility. *Investig. Clin. Urol.* 58, 385–399. doi:10.4111/icu.2017.58.6.385
- Agarwal, A., and Deepinder, F. (2009). “Determination of seminal oxidants (reactive oxygen species),” in *Infertility in the male.* in Editors C. S. Niederberger, L. I. Lipshultz, and S. S. Howards (Cambridge: Cambridge University Press), 618–632. doi:10.1017/CBO9780511635656.040
- Agarwal, A., Finelli, R., Selvam, M. K. P., Leisegang, K., Majzoub, A., Tadros, N., et al. (2021a). A global survey of reproductive specialists to determine the clinical utility of oxidative stress testing and antioxidant use in male infertility. *World J. Mens. Health* 39, 470–488. doi:10.5534/wjmh.210025
- Agarwal, A., Leisegang, K., Majzoub, A., Henkel, R., Finelli, R., Panner Selvam, M. K., et al. (2021b). Utility of antioxidants in the treatment of male infertility: clinical guidelines based on a systematic review and analysis of evidence. *World J. Mens. Health* 39, 233–290. doi:10.5534/wjmh.200196
- Agarwal, A., Mulgund, A., Sharma, R., and Sabanegh, E. (2014a). Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 60 (4), 206–216. doi:10.3109/19396368.2014.918675
- Agarwal, A., Panner Selvam, M., Arafa, M., Okada, H., Homa, S., Killeen, A., et al. (2019). Multi-center evaluation of oxidation-reduction potential by the MiOXSYS in males with abnormal semen. *Asian J. Androl.* 21, 565–569. doi:10.4103/aja.aja\_5\_19
- Agarwal, A., Prabakaran, S., and Allamaneni, S. S. S. R. (2006). Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* 12, 630–633. doi:10.1016/S1472-6483(10)61190-X
- Agarwal, A., and Prabakaran, S. A. (2005). Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J. Exp. Biol.* 43, 963–974.
- Agarwal, A., Roychoudhury, S., Sharma, R., Gupta, S., Majzoub, A., Sabanegh, E., et al. (2017). Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility. *Reprod. Biomed. Online* 34, 48–57. doi:10.1016/j.rbmo.2016.10.008
- Agarwal, A., Tvrdá, E., and Sharma, R. (2014b). Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 45. doi:10.1186/1477-7827-12-45
- Agarwal, A., and Wang, S. M. (2017). Clinical relevance of oxidation-reduction potential in the evaluation of male infertility. *Urology* 104, 84–89. doi:10.1016/j.urology.2017.02.016
- Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., and Baker, M. A. (2012a). “Direct methods for the detection of reactive oxygen species in human semen samples,” in *Studies on men's Health and fertility.* Editors A. Agarwal, R. J. Aitken, and J. G. Alvarez (Totowa, NJ: Humana Press), 275–299. doi:10.1007/978-1-61779-776-7\_14
- Aitken, R. J., Jones, K. T., and Robertson, S. A. (2012b). Reactive oxygen species and sperm function-in sickness and in health. *J. Androl.* 33, 1096–1106. doi:10.2164/jandrol.112.016535
- Alahmar, A. T. (2019). Role of oxidative stress in male infertility: an updated review. *J. Hum. Reprod. Sci.* 12, 4–18. doi:10.4103/jhrs.JHRS\_150\_18
- Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M., and Ramalho-Santos, J. (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 146, R163–R174. doi:10.1530/REP-13-0178
- Amaral, A., and Ramalho-Santos, J. (2010). Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function. *Int. J. Androl.* 33, e180–e186. doi:10.1111/j.1365-2605.2009.00987.x
- Ammar, O., Mehdi, M., and Murtatori, M. (2020). Teratozoospermia: its association with sperm DNA defects, apoptotic alterations, and oxidative stress. *Andrology* 8, 1095–1106. doi:10.1111/andr.12778
- Austin, C. R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326. doi:10.1038/170326a0
- Baccetti, B., Capitani, S., Colodel, G., Strehler, E., and Piomboni, P. (2002). Recent advances in human sperm pathology. *Contraception* 65, 283–287. doi:10.1016/s0010-7824(02)00290-1
- Baker, M. A., and Aitken, R. J. (2005). Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 67. doi:10.1186/1477-7827-3-67
- Balbach, M., Buck, J., and Levin, L. R. (2020a). Using an extracellular flux analyzer to measure changes in glycolysis and oxidative phosphorylation during mouse sperm capacitation. *JoVE.* doi:10.3791/60815
- Balbach, M., Gervasi, M. G., Hidalgo, D. M., Visconti, P. E., Levin, L. R., Buck, J., et al. (2020b). Metabolic changes in mouse sperm during capacitation. *Biol. Reprod.* 103, 791–801. doi:10.1093/biolre/iaaa114
- Barratt, C. L. R., De Jonge, C. J., and Sharpe, R. M. (2018). ‘Man up’: the importance and strategy for placing male reproductive health centre stage in the political and research agenda. *Hum. Reprod.* 33, 541–545. doi:10.1093/humrep/dey020
- Barratt, C. L. R., Wang, C., Baldi, E., Toskin, I., Kiarie, J., and Lamb, D. J. (2022). What advances may the future bring to the diagnosis, treatment, and care of male sexual and reproductive health? *Fertil. Steril.* 117, 258–267. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.12.013
- Baumber, J., Vo, A., Sabeur, K., and Ball, B. A. (2002). Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* 57, 1025–1033. doi:10.1016/s0093-691x(01)00710-5
- Benjamin, D., Sharma, R. K., Moazzam, A., and Agarwal, A. (2012). *Methods for the detection of ROS in human sperm samples BT - studies on men's health and fertility.* in Editors A. Agarwal, R. J. Aitken, and J. G. Alvarez (Totowa, NJ: Humana Press), 257–273. doi:10.1007/978-1-61779-776-7\_13
- Björndahl, L., and Kirkman Brown, J. other Editorial Board Members of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (2022). The sixth edition of the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen: ensuring quality and standardization in basic examination of human ejaculates. *Fertil. Steril.* 117, 246–251. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.12.012
- Boguenet, M., Bouet, P.-E., Spiers, A., Reynier, P., and May-Panloup, P. (2021). Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility. *Hum. Reprod. Update* 27, 697–719. doi:10.1093/humupd/dmab001
- Bonanno, O., Romeo, G., Asero, P., Pezzino, F. M., Castiglione, R., Burrello, N., et al. (2016). Sperm of patients with severe asthenozoospermia show biochemical, molecular and genomic alterations. *Reproduction* 152, 695–704. doi:10.1530/REP-16-0342
- Boveris, A., and Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707–716. doi:10.1042/bj1340707
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Brand, M. D., and Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435, 297–312. doi:10.1042/BJ20110162
- Cairo workshop group (2020). The current status and future of andrology: a consensus report from the Cairo workshop group. *Andrology* 8, 27–52. doi:10.1111/andr.12720
- Cardoso, A. R., Chausse, B., da Cunha, F. M., Luévano-Martínez, L. A., Marazzi, T. B. M., Pessoa, P. S., et al. (2012). Mitochondrial compartmentalization of redox processes. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 2201–2208. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.008
- Cassina, A., Silveira, P., Cantu, L., Montes, J., Radi, R., Sapiro, R., et al. (2015). Defective human sperm cells are associated with mitochondrial dysfunction and oxidant production. *Biol. Reprod.* 93, 119. doi:10.1095/biolreprod.115.130989
- Castellini, C., D’Andrea, S., Cordeschi, G., Totaro, M., Parisi, A., Di Emidio, G., et al. (2021). Pathophysiology of mitochondrial dysfunction in human spermatozoa: focus on energetic metabolism, oxidative stress and apoptosis. *Antioxidants* 10, 695. doi:10.3390/antiox10050695
- Cedíková, M., Miklíková, M., Grundmanová, M., Zech, N. H., Králíčková, M., Kuncová, J., et al. (2014). Sperm mitochondrial function in men with normozoospermia and asthenozoospermia. *Ceska Gynekol.* 79, 22–28.
- Cedíková, M., Miklíková, M., Stachova, L., Grundmanová, M., Tuma, Z., Vetvícka, V., et al. (2014). Effects of the Czech propolis on sperm mitochondrial function. *Evid. Based. Complement. Altern. Med.*, 248768. doi:10.1155/2014/248768
- Courtade, M., Lagorce, C., Bujan, L., Caratero, C., and Miesusset, R. (1998). Clinical characteristics and light and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. *Fertil. Steril.* 70, 297–304. doi:10.1016/s0015-0282(98)00152-6
- De Jonge, C., and Barratt, C. L. R. (2019). The present crisis in male reproductive health: an urgent need for a political, social, and research roadmap. *Andrology* 7, 762–768. doi:10.1111/andr.12673

- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., and Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 2, 48–54. doi:10.1530/ror.0.0020048
- du Plessis, S. S., Makker, K., Desai, N. R., and Agarwal, A. (2008). Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* 3, 539–554. doi:10.1586/17474108.3.4.539
- Durairajanayagam, D., Singh, D., Agarwal, A., and Henkel, R. (2021). Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia* 53, e13666. doi:10.1111/and.13666
- Eroglu, M., Sahin, S., Durukan, B., Ozakpinar, O. B., Erdinc, N., Turkgeldi, L., et al. (2014). Blood serum and seminal plasma selenium, total antioxidant capacity and coenzyme q10 levels in relation to semen parameters in men with idiopathic infertility. *Biol. Trace Elem. Res.* 159, 46–51. doi:10.1007/s12011-014-9978-7
- Escada-Rebello, S., Mora, F. G., Sousa, A. P., Almeida-Santos, T., Paiva, A., Ramalho-Santos, J., et al. (2020). Fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species in human spermatozoa. *Asian J. Androl.* 22(5):465. doi:10.4103/aja.aja\_132\_19
- Ferramosca, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Coppola, L., Zara, V., Coppola, L., et al. (2008). Oxygen uptake by mitochondria in demembrated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency. *Int. J. Androl.* 31, 337–345. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00775.x
- Ferramosca, A., Provenzano, S. P., Coppola, L., and Zara, V. (2012). Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology* 79, 809–814. doi:10.1016/j.urology.2011.12.042
- Ferramosca, A., and Zara, V. (2014). Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed. Res. Int.*, 902953. doi:10.1155/2014/902953
- Ferreira, J. J., Cassina, A., Irigoyen, P., Ford, M., Pietroroia, S., Peramsetty, N., et al. (2021). Increased mitochondrial activity upon CatSper channel activation is required for mouse sperm capacitation. *Redox Biol.* 48, 102176. doi:10.1016/j.redox.2021.102176
- Gallon, F., Marchetti, C., Jouy, N., and Marchetti, P. (2006). The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil. Steril.* 86, 1526–1530. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.055
- Galloway, C. A., Lee, H., and Yoon, Y. (2012). Mitochondrial morphology—emerging role in bioenergetics. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 2218–2228. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.035
- Gay, C. A., and Gebicki, J. M. (2002). Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylene orange peroxide assay. *Anal. Biochem.* 304, 42–46. doi:10.1006/abio.2001.5566
- Giaccagli, M. M., Gómez-Eliás, M. D., Herzfeld, J. D., Marín-Briggiler, C. I., Cuasnicú, P. S., Cohen, D. J., et al. (2021). Capacitation-induced mitochondrial activity is required for sperm fertilizing ability in mice by modulating hyperactivation. *Front. Cell. Dev. Biol.* 9, 767161. doi:10.3389/fcell.2021.767161
- González-Perilli, L., Álvarez, M. N., Prolo, C., Radi, R., Rubbo, H., Trostchansky, A., et al. (2013). Nitroarachidonic acid prevents NADPH oxidase assembly and superoxide radical production in activated macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* 58, 126–133. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.020
- Goodson, S. G., Qiu, Y., Sutton, K. A., Xie, G., Jia, W., O'Brien, D. A., et al. (2012). Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 87, 175. doi:10.1095/biolreprod.112.102673
- Gopalkrishnan, K., Padwal, V., D'Souza, S., and Shah, R. (1995). Severe asthenozoospermia: a structural and functional study. *Int. J. Androl.* 18, 67–74. doi:10.1111/j.1365-2605.1995.tb00642.x
- Guzick, D. S., Overstreet, J. W., Factor-Litvak, P., Brazil, C. K., Nakajima, S. T., Coutifaris, C., et al. (2001). Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N. Engl. J. Med.* 345, 1388–1393. doi:10.1056/NEJMoa003005
- Hereng, T. H., Elgstøen, K. B. P., Eide, L., Rosendal, K. R., and Skålhegg, B. S. (2014). Serum albumin and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> regulate separate pools of ATP in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 29, 918–930. doi:10.1093/humrep/deu028
- Hidalgo, D. M., Romarowski, A., Gervasi, M. G., Navarrete, F., Balbach, M., Salicioni, A. M., et al. (2020). Capacitation increases glucose consumption in murine sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 87, 1037–1047. doi:10.1002/mrd.23421
- Jiang, Z. Y., Woollard, A. C., and Wolff, S. P. (1990). Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.* 268, 69–71. doi:10.1016/0014-5793(90)80974-n
- Kasai, T., Ogawa, K., Mizuno, K., Nagai, S., Uchida, Y., Ohta, S., et al. (2002). Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J. Androl.* 4, 97–103.
- Khosrowbeygi, A., and Zarghami, N. (2007). Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clin. Pathol.* 7, 6. doi:10.1186/1472-6890-7-6
- Kliesch, S. (2014). Diagnosis of male infertility: diagnostic work-up of the infertile man. *Eur. Urol. Suppl.* 13, 73–82. doi:10.1016/j.eursup.2014.08.002
- Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., and Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3199–3207. doi:10.1210/jc.2007-2616
- Kruger, T. F., Acosta, A. A., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F., Oehninger, S., et al. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 49, 112–117. doi:10.1016/S0015-0282(16)59660-5
- Kumar, N. (2022). Sperm mitochondria, the driving force behind human spermatozoa activities: its functions and dysfunctions - a narrative review. *Curr. Mol. Med.* 22. doi:10.2174/156652402266220408104047
- Kumar, R., Venkatesh, S., Kumar, M., Tanwar, M., Shamsi, M. B., Kumar, R., et al. (2009). Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic men. *Indian J. Biochem. Biophys.* 46, 172–177.
- Le Foll, N., Pont, J.-C., L'Hostis, A., Guilbert, T., Bouillaud, F., Wolf, J.-P., et al. (2021). Cyclic FEE peptide improves human sperm movement parameters without modification of their energy metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11263. doi:10.3390/ijms220111263
- Madej, D., Granda, D., Sicinska, E., and Kaluza, J. (2021). Influence of fruit and vegetable consumption on antioxidant status and semen quality: a cross-sectional study in adult men. *Front. Nutr.* 8, 753843. doi:10.3389/fnut.2021.753843
- Malić Vončina, S., Golob, B., Ihan, A., Kopitar, A. N., Kolbezen, M., Zorn, B., et al. (2016). Sperm DNA fragmentation and mitochondrial membrane potential combined are better for predicting natural conception than standard sperm parameters. *Fertil. Steril.* 105, 637–644. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.11.037
- Marchetti, C., Obert, G., Deffosse, A., Formstecher, P., and Marchetti, P. (2002). Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum. Reprod.* 17, 1257–1265. doi:10.1093/humrep/17.5.1257
- Marín-Briggiler, C. I., Luque, G. M., Gervasi, M. G., Oscoz-Susino, N., Sierra, J. M., Mondillo, C., et al. (2021). Human sperm remain motile after a temporary energy restriction but do not undergo capacitation-related events. *Front. Cell. Dev. Biol.* 9, 777086. doi:10.3389/fcell.2021.777086
- Marques, M., Sousa, A. P., Paiva, A., Almeida-Santos, T., and Ramalho-Santos, J. (2014). Low amounts of mitochondrial reactive oxygen species define human sperm quality. *Reproduction* 147, 817–824. doi:10.1530/REP-13-0644
- Martínez, J., Marmisolle, I., Tarallo, D., and Quijano, C. (2020). Mitochondrial bioenergetics and dynamics in secretion processes. *Front. Endocrinol.* 11, 319. doi:10.3389/fendo.2020.00319
- Martínez, J., Tarallo, D., Martínez-Palma, L., Victoria, S., Bresque, M., Rodríguez-Bottero, S., et al. (2019). Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells. *Biochem. J.* 476, 2463–2486. doi:10.1042/BCJ20190405
- Messner, K. R., and Imlay, J. A. (2002). *In vitro* quantitation of biological superoxide and hydrogen peroxide generation. *Methods Enzymol.* 349, 354–361. doi:10.1016/s0076-6879(02)49351-2
- Miki, K. (2007). Energy metabolism and sperm function. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 309–325.
- Miki, K., Qu, W., Goulding, E. H., Willis, W. D., Bunch, D. O., Strader, L. F., et al. (2004). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16501–16506. doi:10.1073/pnas.0407708101
- Moscatelli, N., Spagnolo, B., Pisanello, M., Lemma, E. D., De Vittorio, M., Zara, V., et al. (2017). Single-cell-based evaluation of sperm progressive motility via fluorescent assessment of mitochondria membrane potential. *Sci. Rep.* 7, 17931. doi:10.1038/s41598-017-18123-1
- Mukai, C., and Okuno, M. (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol. Reprod.* 71, 540–547. doi:10.1095/biolreprod.103.026054
- Mukai, C., and Travis, A. J. (2012). What sperm can teach us about energy production. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 164–169. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02071.x
- Mundy, A. J., Ryder, T. A., and Edmonds, D. K. (1995). Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum. Reprod.* 10, 116–119. doi:10.1093/humrep/10.1.116
- Nascimento, J. M., Shi, L. Z., Tam, J., Chandsawangbhuwana, C., Durrant, B., Botvinick, E. L., et al. (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. *J. Cell. Physiol.* 217, 745–751. doi:10.1002/jcp.21549

- Nohl, H., Gille, L., Kozlov, A., and Staniek, K. (2003). Are mitochondria a spontaneous and permanent source of reactive oxygen species? *Redox Rep.* 8, 135–141. doi:10.1179/135100003225001502
- Nowicka-Bauer, K., and Nixon, B. (2020). Molecular changes induced by oxidative stress that impair human sperm motility. *Antioxidants* 9, E134. doi:10.3390/antiox9020134
- Otani, H., Tanaka, O., Kasai, K., and Yoshioka, T. (1988). Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: regular dispositions and synchronized changes. *Anat. Rec.* 222, 26–33. doi:10.1002/ar.1092220106
- Pahune, P. P., Choudhari, A. R., and Muley, P. A. (2013). The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. *J. Clin. Diagn. Res.* 7, 991–995. doi:10.7860/JCDR/2013/4974.3040
- Pandruvada, S., Royfman, R., Shah, T. A., Sindhwani, P., Dupree, J. M., Schon, S., et al. (2021). Lack of trusted diagnostic tools for undetermined male infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 38, 265–276. doi:10.1007/s10815-020-02037-5
- Pelliccione, F., Micillo, A., Cordeschi, G., D'Angeli, A., Necozone, S., Gandini, L., et al. (2011). Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. *Fertil. Steril.* 95, 641–646. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.07.1086
- Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., and Zara, V. (2012). The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int. J. Androl.* 35, 109–124. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x
- Quijano, C., Castro, L., Peluffo, G., Valez, V., and Radi, R. (2007). Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H3404–H3414. doi:10.1152/ajpheart.00761.2007
- Reyes, A. M., Hugo, M., Trostchansky, A., Capece, L., Radi, R., Trujillo, M., et al. (2011). Oxidizing substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: Kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 464–473. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.023
- Richer, S. C., and Ford, W. C. (2001). A critical investigation of NADPH oxidase activity in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 237–244. doi:10.1093/molehr/7.3.237
- Robert, K. A., Sharma, R., Henkel, R., and Agarwal, A. (2020). An update on the techniques used to measure oxidative stress in seminal plasma. *Andrologia* 53, e13726. doi:10.1111/and.13726
- Roychoudhury, S., Sharma, R., Sikka, S., and Agarwal, A. (2016). Diagnostic application of total antioxidant capacity in seminal plasma to assess oxidative stress in male factor infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 33, 627–635. doi:10.1007/s10815-016-0677-5
- Ruiz-Pesini, E., Diez, C., Lapena, A. C., Perez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., et al. (1998). Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin. Chem.* 44, 1616–1620. doi:10.1093/clinchem/44.8.1616
- Ruiz-Pesini, E., Diez-Sánchez, C., López-Pérez, M. J., and Enríquez, J. A. (2007). The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr. Top. Dev. Biol.* 77, 3–19. doi:10.1016/S0070-2153(06)77001-6
- Ruiz-Pesini, E., Diez, C., Alvaréz, E., Enríquez, J. A., and Lopez-Perez, M. J. (2000). Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. *Clin. Chim. Acta.* 300, 97–105. doi:10.1016/S0009-8981(00)00305-3
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Sharma, R., Roychoudhury, S., Singh, N., and Sarda, Y. (2017). “Methods to measure reactive oxygen species (ROS) and total antioxidant capacity (TAC) in the reproductive system BT oxidative stress.” in *Human reproduction: Shedding light on a complicated phenomenon*. Editors: A. Agarwal, R. Sharma, S. Gupta, A. Harlev, G. Ahmad, S. S. du Plessis, et al. (Cham: Springer International Publishing), 17–46. doi:10.1007/978-3-319-48427-3\_2
- Skowronek, F., Casanova, G., Alciaturi, J., Capurro, A., Cantu, L., Montes, J. M., et al. (2012). DNA sperm damage correlates with nuclear ultrastructural sperm defects in teratozoospermic men. *Andrologia* 44, 59–65. doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01106.x
- Sousa, A. P., Amaral, A., Baptista, M., Tavares, R., Caballero Campo, P., Caballero Peregrin, P., et al. (2011). Not all sperm are equal: Functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *PLoS One* 6, e18112. doi:10.1371/journal.pone.0018112
- Stendardi, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Palumberi, D., Serafini, F., Ferramosca, A., et al. (2011). Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during *in vitro* capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 34, 247–255. doi:10.1111/j.1365-2605.2010.01078.x
- Storey, B. T. (2008). Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 427–437. doi:10.1387/ijdb.072522bs
- Tanga, B. M., Qamar, A. Y., Raza, S., Bang, S., Fang, X., Yoon, K., et al. (2021). Semen evaluation: Methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment - a review. *Anim. Biosci.* 34, 1253–1270. doi:10.5713/ab.21.0072
- Tourmente, M., Villar-Moya, P., Rial, E., and Roldan, E. R. S. (2015). Differences in ATP generation via glycolysis and oxidative phosphorylation and relationships with sperm motility in mouse species. *J. Biol. Chem.* 290, 20613–20626. doi:10.1074/jbc.M115.664813
- Traba, J., Miozzo, P., Akkaya, B., Pierce, S. K., and Akkaya, M. (2016). An optimized protocol to analyze glycolysis and mitochondrial respiration in lymphocytes. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/54918
- Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D. S., and Aitken, R. J. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum. Reprod.* 13, 1429–1436. doi:10.1093/humrep/13.6.1429
- Uribe, P., Villegas, J. V., Boguen, R., Treulen, F., Sánchez, R., Mallmann, P., et al. (2017). Use of the fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate for mitochondrial membrane potential assessment in human spermatozoa. *Andrologia* 49, e12753. doi:10.1111/and.12753
- Vander Borgh, M., and Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: definition and epidemiology. *Clin. Biochem.* 62, 2–10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012
- Vorup-Jensen, T., Hjort, T., Joanna, V. A. P., Guttman, P., Jens, C. J., Uggerhøj, E., et al. (1999). X-ray microscopy of human spermatozoa shows change of mitochondrial morphology after capacitation. *Hum. Reprod.* 14, 880–884. doi:10.1093/humrep/14.4.880
- Walters, J. L. H., Anderson, A. L., Martins da Silva, S. J., Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Sutherland, J. M., et al. (2020). Mechanistic insight into the regulation of lipoxygenase-Driven lipid peroxidation events in human spermatozoa and their impact on male fertility. *Antioxidants (Basel, Switz.)* 10, 10043. doi:10.3390/antiox10010043
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., and Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell. Biol.* 217, 1915–1928. doi:10.1083/jcb.201708007
- Who (2010). WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. *World Health* 5, 286. doi:10.1038/aja.2008.57
- Who (2021). WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. *World Health* 6, 117. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.12.012
- Wilton, L. J., Temple-Smith, P. D., and de Kretser, D. M. (1992). Quantitative ultrastructural analysis of sperm tails reveals flagellar defects associated with persistent asthenozoospermia. *Hum. Reprod.* 7, 510–516. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137681
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Mateo-Otero, Y., Dordas-Perpinyà, M., Gacem, S., Yeste, N., et al. (2021). Extracellular reactive oxygen species (ROS) production in fresh donkey sperm exposed to reductive stress, oxidative stress and NETosis. *Antioxidants (Basel, Switz.)* 10, 10043. doi:10.3390/antiox10091367
- Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., and Haugland, R. P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.* 253, 162–168. doi:10.1006/abio.1997.2391
- Zini, A., Garrels, K., and Phang, D. (2000). Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology* 55, 922–926. doi:10.1016/S0090-4295(00)00453-2