



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la organización nanoscópica de dominios enriquecidos en colesterol en la membrana del espermatozoide de ratón

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
DAVID TORRES HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ALBERTO DARSZON
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)
DR. ROBERTO CARLOS MUÑOZ GARAY
[Instituto de Ciencias Físicas, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos, México. Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El presente trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio Nacional de
Microscopía Avanzada (LNMA)**

**En colaboración con el Consorcio de la Fisiología del Espermatozoides del
Departamento de Biología del Desarrollo y Fisiología Molecular**

Ambos ubicados en el instituto de Biotecnología, UNAM

Bajo la supervisión del Dr. Christopher David Wood

Financiamiento:

Este proyecto fue financiado por el programa DGAPA-PAPIIT proyecto # IN211216.

De igual manera se agradece al programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas (UNAM) y a Conacyt por la beca otorgada de maestría.

Agradecimientos académicos:

Al Dr. Christopher David Wood por aceptarme como su alumno de maestría y por ser un excelente tutor de proyecto de maestría.

Al Dr. Alberto Darszon y al Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay por aceptar ser parte de mi comité tutor de maestría y por sus excelentes consejos y sugerencias que hicieron posible llevar a término el presente proyecto.

Al Consorcio de la fisiología del Espermatozoide. Principalmente a José Luis de la Vega Beltrán por su ayuda técnica con la obtención de los espermatozoides de ratón.

A todos los miembros del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada por su asistencia técnica y sugerencias. Principalmente al Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera por en el entrenamiento en el uso del microscopio confocal de disco giratorio y al Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cardenas por sus consejos para el desarrollo del presente proyecto, por iniciarme en el mundo de la microscopía y por invitarme a colaborar con él en otros proyectos de investigación.

Al grupo del Dr. Lorenzo Patrick Segovia, principalmente a la Dra. Claudia Martinez y a Juan José Salazar Cortes por su asistencia técnica en la expresión y purificación de la proteína Dronpa-D4

Agradecimientos especiales y dedicatoria:

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 REPRODUCCIÓN DE MAMÍFEROS.....	1
1.2 MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE.....	1
1.2.1 Flagelo: pieza media, pieza principal y pieza final.....	2
1.2.2 La cabeza.....	6
1.3 CAPACITACIÓN Y EVENTOS PREVIOS A LA REACCIÓN ACROSOMAL.....	9
1.4 REORGANIZACIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR DURANTE LA CAPACITACIÓN.....	11
CAPÍTULO 2. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES.....	15
2.1 MODELO DE “BALSAS LIPÍDICAS” Y EVIDENCIA DE SU FORMACIÓN EN LA MEMBRANA CELULAR.....	16
2.2 EVIDENCIA DE LA FORMACIÓN DE NANO-DOMINIOS LIPÍDICOS EN LA MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE DE MAMÍFERO.....	19
CAPÍTULO 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	23
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS.....	25
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS.....	25
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	25

5.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
CAPÍTULO 6. METODOLOGÍA.....		26
6.1	OBTENCIÓN DE LA SONDA DRONPA-D4.....	26
6.1.1	Protocolo para generar bacterias electrocompetentes <i>E.coli</i> DH5 α y BL21.....	27
6.1.2	Protocolo de transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α y BL21 con el plásmido pET28-Dronpa-D4.....	27
6.1.3	Extracción de ADN plasmídico y almacenamiento para uso posterior.....	28
6.1.4	Cuantificación de la concentración de ADN plasmídico.....	29
6.1.5	Electroforesis de ADN en gel de agarosa 1 %.....	29
6.1.6	Inducción de la expresión heteróloga de Dronpa-D4 en <i>E. coli</i> BL21.....	29
6.1.7	Purificación de proteínas por afinidad de cola de histidinas en columna de Níquel.....	30
6.1.8	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida 10 %.....	31
6.1.9	Cuantificación de concentración de proteínas por el método de Bradford.....	31
6.2	ENSAYOS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE SÚPER-RESOLUCIÓN.....	31
6.2.1	Obtención de espermatozoides por el método de swim-up.....	31
6.2.2	Tratamiento de cubreobjetos para la adhesión de los espermatozoides a la superficie.....	32
6.2.3	Marcaje de colesterol con Dronpa-D4 en espermatozoides de ratón.....	32
6.2.4	Protocolo de iluminación en microscopio Confocal de disco giratorio 3I Marianas Yokogawa.....	33
6.2.5	Medición del tiempo medio del fotoblanqueo de Dronpa.....	34

6.2.6	Reconstrucción de imágenes de súper-resolución por el método de SRRF (super-resolution radial fluctuations).....	34
6.3	ANÁLISIS DE IMÁGENES DE SÚPER RESOLUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DOMINIOS ENRIQUECIDOS EN COLESTEROL.....	36
6.3.1	Segmentación de imágenes y análisis de las dimensiones de los nano-dominios.....	36
6.3.2	Ajuste de elipse y análisis de la distribución de los nano-dominios en la cabeza del espermatozoide de ratón.....	37
CAPÍTULO 7. RESULTADOS.....		40
7.1	OBTENCIÓN DE LA SONDA DE COLESTEROL DRONPA-D4.....	40
7.1.1	Amplificación del plásmido pET28-Dronpa-D4 en <i>E. coli</i> DH5 α	40
7.1.2	Expresión y purificación de Dronpa-D4 en <i>E. coli</i> cepa BL21.....	42
7.2	EL MARCAJE DE DRONPA-D4 ES ESPECÍFICO DE COLESTEROL Y SU PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN ES SIMILAR AL REPORTADO EN ESTUDIOS PREVIOS.....	44
7.2.1	El patrón de distribución de colesterol marcado con Dronpa-D4 en espermatozoides no capacitados de ratón es similar al reportado en estudios previos.....	44
7.2.2	Control de autofluorescencia y especificidad de marcaje de Dronpa-D4 en espermatozoides de ratón.....	45
7.3	CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA DE DRONPA-D4 EN DIFERENTES MEDIOS DE MUESTREO.....	49
7.3.1	Efecto de diferentes medios de muestreo sobre el decaimiento de la fluorescencia.....	52
7.3.2	Efecto de P-Fenilendiamina (PPD) sobre el decaimiento de la fluorescencia de Dronpa-D4.....	54
7.4	LA DISTRIBUCIÓN DEL COLESTEROL EN LA MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE DEPENDE DE SU ESTADO CAPACITADO O NO CAPACITADO.....	58
7.5	EL COLESTEROL SE ORGANIZA EN DOMINIOS DE DIMENSIONES NANOMETRICAS EN LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE.....	61

7.6	LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DOMINIOS DE COLESTEROL EN LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DEPENDEN DE SU ESTADO “CAPACITADO” O “NO CAPACITADO”.....	67
	CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	71
	CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES.....	75
	CAPÍTULO 10. PERSPECTIVAS.....	75
	CAPÍTULO 11. APÉNDICE.....	76
A.1	SONDA DRONPA-D4.....	76
	A.1.1 Secuencia reportada de pET28a-Dronpa-D4.....	77
	A.1.2 secuenciación de pET28a-Dronpa-D4.....	79
A.2	PROPIEDADES FOTOFÍSICAS Y QUÍMICAS DE DRONPA.....	80
A.3	SISTEMAS SECUESTRADORES DE OXÍGENO.....	83
	A.3.1 Sistema MEA-MB.....	83
	A.3.2 Sistemas secuestradores de oxígeno GOC y POC.....	83
	A.3.3 Medio de muestreo con Rutina.....	84
A.4	RELACION SEÑAL-RUIDO DE UNA IMAGEN.....	85
A.5	MICROSCOPIA DE SÚPER-RESOLUCIÓN PALM.....	86
A.6	SUPER RESOLUTION RADIAL FLUCTUATIONS (SRRF).....	87
A.7	PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES.....	90
	A.7.1 Publicación “Nanosclae organization of rotavirus replication machineries.....	90
	A.7.2 Participación en el congreso “Focus On Microscopy 2019” llevado a cabo en Londres UK en Abril del 2019.....	91
	A.7.3 Presentación de poster en la semana académica de invierno 2017 llevado a cabo en el Instituto de Biotecnología en Diciembre del 2017.....	92
	BIBLIOGRAFÍA.....	93

RESUMEN

La capacitación es un proceso esencial de maduración del espermatozoide que ocurre en el útero. Un evento clave durante dicho proceso es el eflujo del colesterol fuera de la membrana plasmática. La evidencia sugiere que el colesterol se distribuye en la membrana formando nano-dominios lipídicos (balsas lipídicas) cuya organización y distribución cambian durante la capacitación debido al eflujo de colesterol. Sin embargo hasta ahora no ha sido posible observar estos nano-dominios en el espermatozoide.

El objetivo del presente proyecto fue observar la dinámica de los nano-dominios enriquecidos en colesterol durante la capacitación del espermatozoide de ratón. Para lograr esto se utilizó el marcador de colesterol Dronpa-D4 diseñado para su uso en microscopía de súper resolución tipo PALM. Debido a que no fue posible establecer un protocolo para realizar ensayos de microscopía PALM se utilizó el método de SRRF (Super Resolution Radial Fluctuations) para generar imágenes de súper-resolución. Además, se realizó un estudio de diferentes medios de muestreo sobre su efecto en el fotoblanqueo de Dronpa-D4 en el cual demostramos la capacidad de estos medios de muestreo para disminuir el fotoblanqueo por oxidación de Dronpa-D4.

Finalmente, nuestras observaciones demostraron la existencia de nano-dominios enriquecidos en colesterol cuya distribución en la membrana de la cabeza del espermatozoide cambia durante su capacitación.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del espermatozoide de ratón y de humano.....	2
Figura 2. Estructura 3D del axonema del flagelo de <i>Chlamydomonas</i> reconstruido por criomicroscopía electrónica.....	3
Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión de la pieza media de un flagelo de espermatozoide de humano.....	4
Figura 4. Distribución de CatSper en el flagelo del espermatozoide de ratón.....	6
Figura 5. Dominios de membrana observados en la cabeza del espermatozoide de ratón.....	7
Figura 6. Modelo de la redistribución de colesterol promovido por el aumento del ión HCO_3^- y su posterior eflujo.....	13
Figura 7. Modelo de la activación de fosfolipasa B (PLB) inducida por el eflujo de colesterol durante la capacitación del espermatozoide.....	13
Figura 8. Modelos propuestos de la estructura molecular de la membrana celular.....	16
Figura 9. Modelo simplificado de Balsas lipídicas en la membrana celular.....	17
Figura 10. Modelo hipotético de la reorganización de balsas lipídicas durante la capacitación y su implicación fisiológica.....	21
Figura 11. Cálculo de la constante de tiempo de decaimiento de la fluorescencia.....	34
Figura 12. Interfaz gráfica del algoritmo de SRRF.....	35
Figura 13. Interfaz gráfica del algoritmo de Corrección del movimiento.....	35
Figura 14. Segmentación de imagen por medio de Hk means y obtención de las características de cada cluster detectado.....	36
Figura 15. Esquema del ajuste de elipse a la imagen de una cabeza de espermatozoide de ratón para el análisis de la distribución espacial de los dominios de colesterol.....	37
Figura 16. Ajuste de elipse a las imágenes segmentadas por Hk-means y cálculo de la distancia de cada dominio de colesterol respecto al centro de la elipse.....	38
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de pET28-Dronpa-D4.....	41
Figura 18. Alineamiento de la secuencia de Dronpa-D4 obtenida a partir del plásmido purificado (rojo) contra la reportada por Mizuno et al. (verde+amarillo).....	42
Figura 19. Electroforesis en gel de fracciones recuperadas durante la purificación de la sonda Dronpa-D4.....	43
Figura 20. Electroforesis en gel de acrilamida al 10% de la purificación de Dronpa-D4.....	44
Figura 21. Distribución de colesterol en espermatozoides no capacitados de ratón reportados en estudios anteriores.....	45
Figura 22. Control de autofluorescencia del espermatozoide de ratón.....	46
Figura 23. Estructura y geometría molecular de β -Ciclodextrina.....	47

Figura 24. Espermatozoides tratados con β -Ciclodextrina marcados con Dronpa-D4.....	48
Figura 25. Señal de fluorescencia de Dronpa-D4 detectada en espermatozoides no capacitados y en espermatozoides tratados con β -Ciclodextrina.....	48
Figura 26. Patrón de tinción de espermatozoides de ratón marcados con Dronpa-D4.....	50
Figura 27. Cambios en la intensidad de la fluorescencia a través del tiempo de Dronpa-D4 y Alexa Fluor 647.....	55
Figura 28. Casos representativos de los patrones de distribución de colesterol observados en espermatozoides de ratón.....	58
Figura 29. Reconstrucción de imágenes de súper resolución con el algoritmo de SRRF de espermatozoides capacitados y no capacitados.....	61
Figura 30. Segmentación de imágenes obtenida mediante el método de “Hk-means”.....	62
Figura 31. Área de los nano-dominios de colesterol detectados en cuatro casos representativos de espermatozoides no capacitados con el patrón A de distribución de colesterol.....	64
Figura 32. Análisis de agrupamiento de los nano-dominios de colesterol respecto al área observada mediante el análisis de K means.....	65
Figura 33. Visualización de los dominios de colesterol según su grupo en la cabeza del espermatozoide de ratón.....	66
Figura A1. Mapa de restricción del plásmido pET28a-DronpaD4.....	76
Figura A2. Configuraciones moleculares de Dronpa.....	80
Figura A3. Protonación del cromóforo de Dronpa y su efecto en la fluorescencia.....	81
Figura A4. Diagrama de Jablonski de los estados de transición del fluorocromo de Dronpa.....	82
Figura A5. Sistemas secuestradores de oxígeno y anti-oxidantes.....	83
Figura A6. Principio del funcionamiento de Microscopía de localización de fotoactivación de fluorescencia FPALM.....	86
Figura A7. Generación de imágenes de súper resolución por medio del algoritmo de SRRF.....	87
Figura A8. Fundamento teórico del cálculo de radialidad en el algoritmo de SRRF.....	89

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Decaimiento de la fluorescencia de Dronpa-D4 en PBS 1X pH. 7.4.....	50
Gráfica 2. Decaimiento de la fluorescencia de Dronpa-D4 en diferentes medios de muestreo.....	52
Gráfica 3. Constante de tiempo (K_t) del fotoblanqueo de Dronpa-D4 en diferentes medios de muestreo.....	53
Gráfica 4. Comparación de la intensidad de la fluorescencia de Dronpa-D4 en medio de	

muestreo PBS y Rutina.....	54
Gráfica 5. Constante de tiempo (K_t) del fotoblanqueo de Dronpa en PBS, Rutina y PPD.....	56
Gráfica 6. Frecuencia de patrones de distribución de colesterol en espermatozoides capacitados (Cap) y no capacitados (No Cap).....	59
Gráfica 7. Frecuencia absoluta de la distancia de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse en espermatozoides capacitados y no capacitados.....	67
Gráfica 8. Gráficas de la función de distribución acumulada $[Fn(x)]$ de las distancias de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse.....	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolos de iluminación en espermatozoides marcados con Dronpa-D4.....	49
Tabla 2. Constantes de tiempo de decaimiento de la fluorescencia (K_t) de Dronpa-D4.....	50
Tabla 3. Valores de la constante de tiempo (K_t) de fotoblanqueo de Dronpa-D4 con los distintos medios de muestreo.....	53
Tabla 4. Valores de la constante (K_t) de tiempo del fotoblanqueo de dronpa en PBS, Rutina y PPD.....	57
Tabla 5. Frecuencias del patrón de distribución de colesterol asociado a la fluorescencia de Dronpa-D4 en espermatozoides Capacitados y no Capacitados.....	60
Tabla 6. Resultados del análisis de la diferencia en la función de distribución acumulada $[Fn(x)]$ de las distancias de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse entre espermatozoides Capacitados y No Capacitados mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.....	69
Tabla 7. Análisis de Kolmogorov-Smirnov para determinar la diferencia en la función de distribución acumulada $[Fn(x)]$ de las distancias de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse entre espermatozoides Capacitados y No Capacitados con el patrón de tinción de colesterol A.....	70
Tabla 8. Análisis de Kolmogorov-Smirnov para determinar la diferencia en la función de distribución acumulada $[Fn(x)]$ de las distancias de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse entre espermatozoides Capacitados y No Capacitados con el patrón de tinción de colesterol E.....	70

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 REPRODUCCIÓN EN MAMÍFEROS

La reproducción es el proceso mediante el cual se da inicio al desarrollo de un nuevo individuo. Existen diferentes estrategias de reproducción en la naturaleza. Una de ellas es la reproducción sexual, la cual consiste en la fusión del material genético de un gameto masculino (espermatozoide) y un gameto femenino (óvulo). En general, para que dicha fusión del material genético ocurra, el espermatozoide debe nadar hacia el óvulo y alcanzarlo para poder entregar su material genético mediante un proceso denominado fecundación. En mamíferos este proceso ocurre en el interior del individuo, específicamente en el aparato reproductor femenino, por lo cual se les denomina animales de fecundación interna (Lombardi, 2012).

Los espermatozoides recién eyaculados son incapaces de fecundar al óvulo. Para poder llevar a cabo la fecundación el espermatozoide debe pasar por un proceso final de maduración llamado capacitación. Dicho proceso ocurre en el aparato reproductor femenino y consiste en una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos en el espermatozoide que le permitirán adquirir la capacidad de fecundar al óvulo (Revisado en Pitnick, Wolfner & Dorus, 2019).

1.2 MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula altamente especializada cuyas características morfológicas le confieren la capacidad de desplazarse hacia el óvulo.

La estructura del espermatozoide es similar entre las distintas especies de mamíferos y consiste básicamente en tres estructuras con funciones particulares: la cabeza, la pieza media y la pieza principal (**Figura 1**). A su vez, cada estructura está conformada por distintas subestructuras que son establecidas durante la espermatogénesis en el testículo (revisado en Mortimer, 2018).

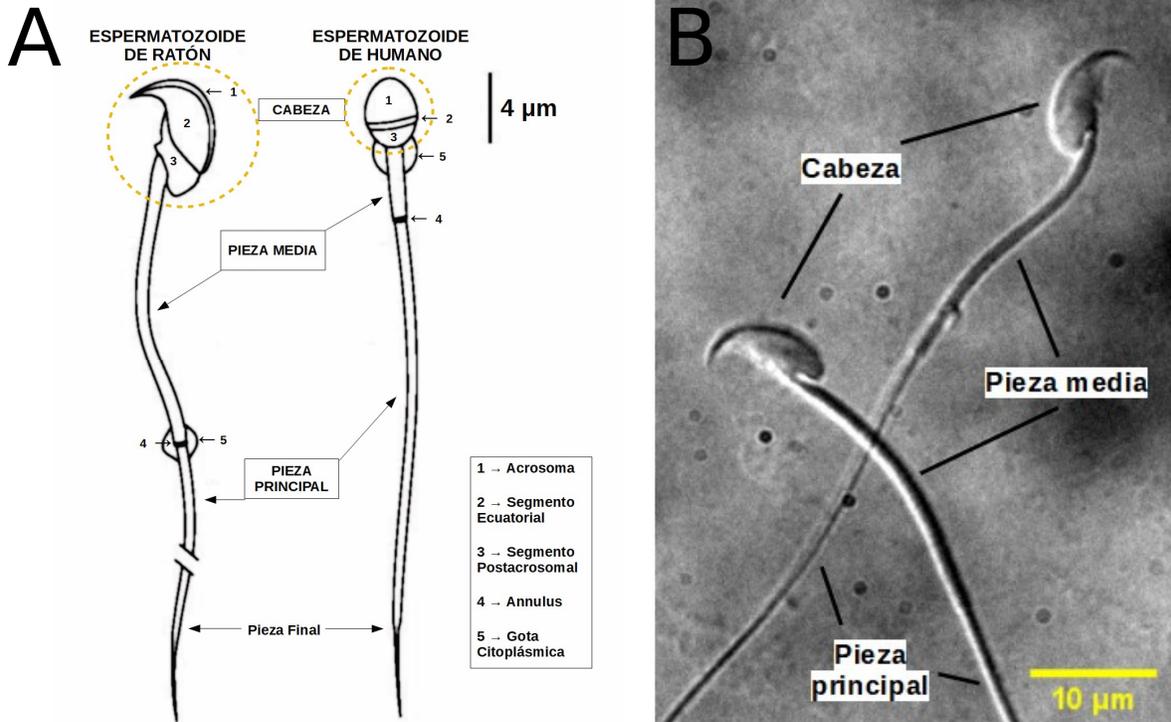


Figura 1. Morfología del espermatozoide de ratón y de humano. A, esquema de las estructuras morfológicas en común del espermatozoide de ratón y humano; no obstante, algunas estructuras difieren en tamaño y forma, como la cabeza (resaltada con el círculo amarillo punteado), la mayoría de ellas se encuentran presentes en los espermatozoides de casi todas las especies de mamíferos. Imagen modificada de Darszon, Nishigaki, Beltran & Treviño, 2011). B, espermatozoides de ratón vistos mediante microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC); imagen tomada en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA).

1.2.1 Flagelo: pieza media, pieza principal y pieza final

El flagelo es la estructura que confiere motilidad al espermatozoide. Su formación comienza en etapas tempranas de la espermiogénesis (etapa final de la espermatogénesis) cuando el centrosoma de la célula espermática (conformado por dos centriolos rodeados de una matriz proteica llamada matriz pericentriolar) se recluta hacia una región cercana a la envoltura nuclear llamada fosa de implantación. A partir de esta zona los dos centriolos se distancian uno del otro formando al centriolo proximal y al centriolo distal, este último dará origen al axonema del flagelo (Hermo, Pelletier, Cyr & Smith, 2009); Ambos centriolos son heredados al óvulo y participan en la formación de los centrosomas involucrados en la primera división mitótica del cigoto (Fishman et al., 2018). El axonema, generado a partir

del centriolo distal, es la estructura responsable de las propiedades mecánicas del flagelo y está conformada por un par central de microtúbulos rodeado de nueve dobletes de microtúbulos, generando la característica forma de “9 + 2”. Dicha estructura se ha conservado en flagelos y cilios eucariontes, desde protozoarios hasta humanos (**Figura 2A**; Ishikawa, 2015). Los dobletes de microtúbulos están formados por dos subtúbulos unidos (**Figura 2A**, flecha roja) en donde uno de ellos se encuentra asociado a un conjunto de proteínas llamadas dineínas (**Figura 2A**, flecha verde; **Figura 2B** remarcado en rojo y cian). Estas proteínas funcionan como los motores moleculares que, por medio de la hidrólisis de ATP, generan la fuerza de torsión del axonema provocando el batido flagelar. Estas dineínas se encuentran asociadas al túbulo en forma de dos brazos, uno externo y uno interno (**Figura 2B**, remarcadas en rojo y cian, respectivamente); ambos brazos de dineína tienen diferencias estructurales y funcionales. A su vez, un complejo de unión mantiene unido el brazo externo de dineína al doblete de microtúbulos en intervalos regulares de 24 nm (Inaba, 2003). Se cree que el par central determina el plano en el que se mueve el flagelo y lo regula por medio de señales que se transmiten a los filamentos radiales (**Figura 2B**, remarcado en azul) los cuales interactúan con los brazos internos de dineínas controlando su actividad por medio de eventos de fosforilación/desfosforilación en conjunto con un complejo regulador de dineínas (**Figura 2B**, remarcado en verde).

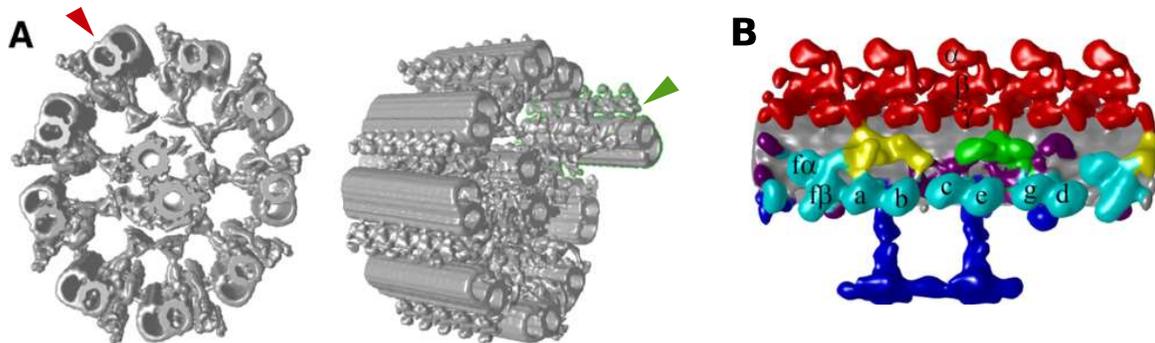


Figura 2. Estructura 3D del axonema del flagelo de *Chlamydomonas* reconstruido por criomicroscopía electrónica. A panel izquierdo, vista frontal de un corte transversal del axonema del flagelo de *Chlamydomonas* obtenido por criomicroscopía electrónica; panel derecho, vista lateral del axonema mostrado en el panel izquierdo, en color verde se delinea la estructura de un doblete de microtúbulos junto con las proteínas asociadas al microtúbulo. B, proteínas asociadas al microtúbulo; rojo: brazo externo de dineínas, formación de cabezas de dineínas α , β y γ en tríos; cian: brazo interno de dineínas, formación de cabezas en pares $a+b$, $c+e$ y $g+d$; amarillo: cadena intermedia y ligera de dineínas del brazo interno; verde: complejo regulador de dineínas; azul: filamentos radiales; morado: sin identificar. Modificada de Ishikawa, 2015.

El flagelo del espermatozoide de mamífero está dividido en dos secciones, la pieza media y la sección que incluye la pieza principal y la pieza final. Dichas secciones están separadas por una estructura proteica llamada Annulus (**Figura 3B**) derivada de componentes del centriolo distal modificado (Hermo, Pelletier, Cyr & Smith, 2009) y funciona como barrera de difusión que mantiene separados a los componentes entre ambas secciones del flagelo (Kwitny, Klaus & Hunnicutt, 2010).

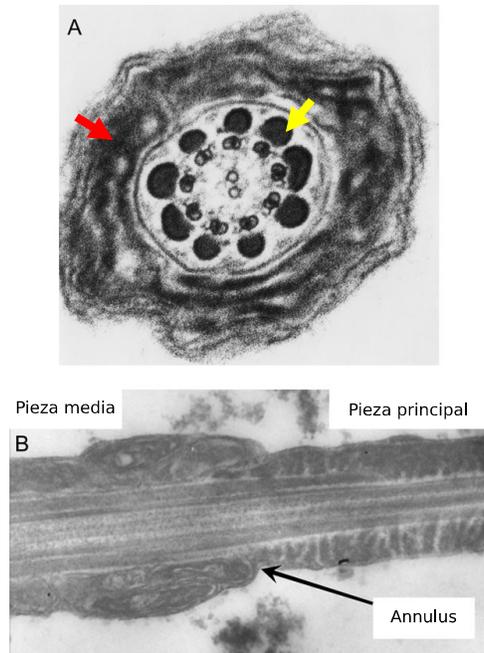


Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión de la pieza media de un flagelo de espermatozoide de humano. A, vista frontal de un corte transversal de la pieza media de un espermatozoide de humano. La flecha roja señala a las mitocondrias; la flecha amarilla señala a una de las 9 fibras densas externas. B, vista lateral de un corte longitudinal de un flagelo de espermatozoide de ratón. Imagen modificada de Mortimer, 2018.

En la pieza media, el axonema está rodeado por 9 fibras densas externas acomodadas paralelamente a los dobletes de microtúbulos del axonema (**Figura 3B**, flecha amarilla) junto con una serie de mitocondrias elongadas (**Figura 3B**, flecha roja) ordenadas en forma helicoidal recorriendo toda la pieza media. Se cree que las fibras densas externas ayudan al flagelo a reforzar su estructura, mejorando su fuerza de tensión para poder superar la resistencia a la viscosidad del tracto reproductor femenino; también se cree que ayuda a la unión de la cabeza con el flagelo por medio de la proteína HSPB10 (Small heat shock

protein outer dense fibre I) y que además actúa como sostén de las mitocondrias (revisado en Hermo, Pelletier, Cyr & Smith, 2009, parte 3; Mortimer, 2018).

La pieza principal no contiene mitocondrias y es más larga que la pieza media; en ratón puede llegar a medir alrededor de 95 micrómetros, mientras que la pieza media mide alrededor de 22 micrómetros (Albrechtová, Albrecht, Ďureje, Pallazola & Piálek, 2014). En esta región se encuentra una estructura formada de distintas proteínas que se le denomina “vaina fibrosa” (fibrous sheath, en inglés) que se distribuye rodeando al axonema y a las fibras densas externas, justo por debajo de la capa interna de la membrana plasmática.

Esta estructura se organiza en forma de columnas que comienzan desde la base del Anulus y se extienden a lo largo de la pieza principal, desvaneciéndose en la región de la pieza terminal (revisado en Mortimer, 2018). Las características motiles del espermatozoide se determinan principalmente por la pieza principal cuyo movimiento en forma de ondas depende de la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular, siendo su principal vía de entrada un canal iónico específico del espermatozoide llamado CatSper (Alasmari et al., 2013). Este canal iónico se activa durante la capacitación mediante cambios del pH intracelular y la hiperpolarización de la membrana (revisado en Jin & Yang, 2016). Además, en humanos se activa indirectamente por medio de progesterona que promueve la activación de una hidrolasa que degrada a 2-arachidonoylglycerol, un inactivador de CatSper (Strünker et al., 2011). La activación de dicho canal genera la hiperactivación de la motilidad del flagelo, lo cual permite al espermatozoide aumentar la potencia del nado para contender contra la viscosidad del medio para poder alcanzar al óvulo (Chung et al., 2014; Ernesto et al., 2015). Se sabe que en los espermatozoides de ratón, CatSper se encuentra organizado en cuatro dominios de escala nanométrica en la membrana del flagelo (**Figura 4**) junto con otras proteínas cuya actividad depende de su fosforilación durante la capacitación y de los dominios de señalización de Ca^{2+} que son generados por la distribución de CatSper (Chung et al., 2014).

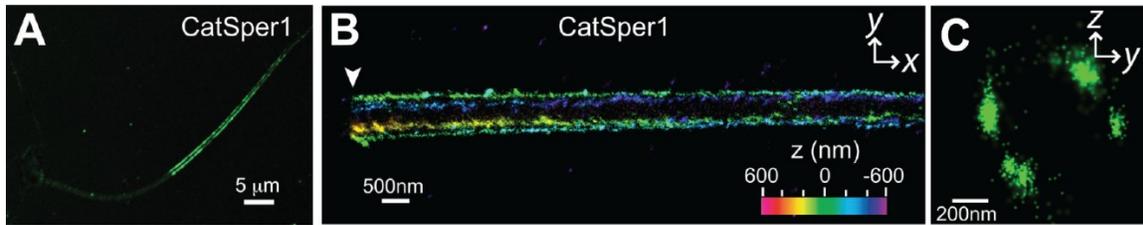


Figura 4. Distribución de CatSper en el flagelo del espermatozoide de ratón. A, imagen de microscopía confocal de CatSper1 inmunomarcado en espermatozoide de ratón. B, imagen de súper-resolución en 3D de Catsper1; el código de color corresponde a la posición en el plano Z y se puede apreciar la distribución de CatSper en 4 franjas separadas localizadas en diferentes planos. C, vista frontal de la imagen de súper resolución mostrada en B en donde se puede apreciar la distribución de CatSper en puntos equidistantes del flagelo (Modificada de Chung et al., 2014).

La descripción de este fenómeno es de especial interés, ya que permite contextualizar la importancia de la formación de nano-dominios de membrana en la regulación de procesos fisiológicos, que en este caso es la formación de dominios de señalización de Calcio que a su vez regulan espacialmente la actividad de las proteínas que participan en la regulación del batido flagelar (Brukman et al., 2018).

1.2.2 La cabeza

La cabeza del espermatozoide es la estructura que contiene al pro-núcleo con el genoma paterno que se donará al óvulo. También contiene un organelo llamado acrosoma, el cual sirve como reserva interna de calcio y además almacena enzimas hidrolíticas que le permitirán degradar la matriz proteica que mantiene unidas a las células del cumulus que rodean al óvulo (Herrick et al., 2004).

La forma de la cabeza del espermatozoide de mamíferos es distinta entre las diferentes especies; sin embargo, los componentes que la constituyen son similares, como se puede apreciar en la **Figura 1 A**. Particularmente, la cabeza de los espermatozoides de ratón tiene una forma característica de gancho (**Figura 5 A**) con una longitud de entre 6 y 8 micrómetros y una anchura de alrededor de 1 micrómetro (**Figura 5 B**; Selvaraj et al., 2009; Varea Sánchez, Bastir & Roldan, 2013; Medarde, Muñoz-Muñoz, López-Fuster & Ventura, 2013; Albrechtová, Albrecht, Ďureje, Pallazola & Piálek, 2014).

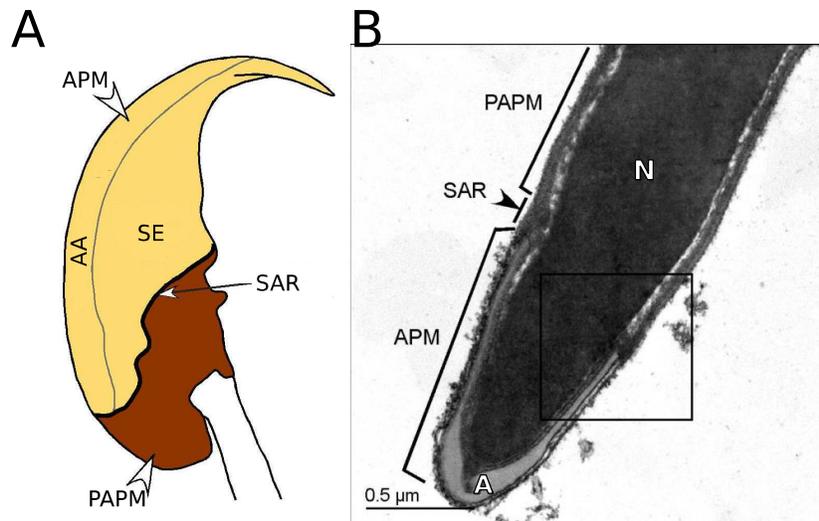


Figura 5. Dominios de membrana observados en la cabeza del espermatozoide de ratón. **A**, esquema de los diferentes dominios que se pueden observar en la membrana de la cabeza del espermatozoide de ratón; APM: membrana plasmática acrosomal; PAMP: membrana plasmática post-acrosomal; SE: segmento ecuatorial; SAR: anillo sub-acrosomal; AA: Acrosoma apical. **B**, micrografía de microscopía electrónica de transmisión de un corte transversal de una cabeza de espermatozoide de ratón en la cual se puede apreciar las dimensiones de los compartimentos internos como el núcleo (N) y el acrosoma (A); debido a la posición de la cabeza no se aprecia la región SE en este panel, sin embargo se entiende que se encuentra debajo de la región APM de esta misma figura. Modificado de Selvaraj *et al.*, 2009.

Una de las principales características de la membrana plasmática localizada en la cabeza del espermatozoides de mamífero es el alto grado de segregación de lípidos y proteínas que la componen, dando como resultado la formación de dominios de membrana de escala micrométrica mantenidos por medio de barreras de difusión (Wolfe, James, Mackie, Ladha & Jones, 1998; R. Mackie, S. James, Ladha & Jones, 2001; James, 2004)

Particularmente en la cabeza se observan dos dominios micrométricos de membrana: la Membrana Plasmática Acrosomal (APM, por sus siglas en inglés) y la Membrana Plasmática Post-Acrosomal (PAMP, por sus siglas en inglés), esquematizados en la **Figura 5**.

En el dominio APM se observan dos subregiones, Acrosoma Apical (AA) y el Segmento Ecuatorial (ES, por sus siglas en inglés), en las cuales se han observado proteínas y lípidos asociados a balsas lipídicas (Cohen, Mukai & Travis, 2016). Este dominio se encuentra separado del dominio PAMP por una estructura llamada Anillo Sub-Acrosomal (SAR, por sus siglas en inglés). Dicha estructura funciona como barrera de difusión entre ambas regiones de la cabeza ayudando a mantener la segregación de lípidos y proteínas residentes

de membrana (Selvaraj et al., 2006; Selvaraj et al., 2009; Tsukamoto et al., 2016; Cohen et al., 2014)

Entre los primeros estudios se demostró por medio del método de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) que la fluidez de la membrana, reflejada por medio del coeficiente de difusión calculado a partir de las mediciones FRAP, es diferente entre las regiones APM y PAPM, demostrando así que ambas regiones corresponden a microdominios de membrana diferentes (Wolfe, James, Mackie, Ladha & Jones, 1998). Estas primeras observaciones evidenciaron la segregación micrométrica de lípidos en la membrana de la cabeza, posiblemente segregados por medio de barreras de difusión. Posteriormente diferentes estudios demostrarían que el Anillo Sub-Acrosomal es la estructura que funge como barrera de difusión (R. Mackie, S. James, Ladha & Jones, 2001; James, 2004).

Mediante microscopía electrónica se observó que el SAR dividía a ambas regiones (Selvaraj et al., 2006) y por medio de técnicas de microscopía de fluorescencia como “Perdida de Fluorescencia en Análisis de Fotoblanqueo” (FLIP, por sus siglas en inglés) e Imagenología de Fluorescencia de Partícula Individual (SPFI, por sus siglas en inglés) se demostró su participación como barrera de difusión. Esto se demostró al observar la incapacidad de complejos macromoleculares (utilizando marcadores fluorescentes de membrana que tienen a agruparse) para difundir de una región a otra a través del SAR, lo cual sí ocurre con moléculas que no se encuentran formando parte de un complejo macromolecular. Además, por medio de SPFI se observó la tendencia de algunas moléculas a permanecer confinadas en subregiones pertenecientes a las regiones APM y PAPM (James, 2004). En conjunto, estas observaciones fueron evidencia de la formación de nanodominios de membrana también conocidos como “balsas lipídicas” en la membrana del espermatozoide de mamífero.

A pesar de existir una barrera de difusión que mantiene segregados los componentes de la membrana plasmática, se ha demostrado que durante la capacitación de los espermatozoides ocurre una redistribución de lípidos y proteínas entre las distintas regiones de la membrana de la cabeza (Selvaraj et al., 2006; Selvaraj et al., 2009; Tsukamoto et al., 2016; Cohen et al., 2014). De igual manera, se ha demostrado que la distribución de dichos componentes se modifica después del cese de la motilidad del espermatozoide inducida por

la fijación del espermatozoide con paraformaldehído (Selvaraj et al., 2006; Selvaraj et al., 2009). Por lo cual se cree que el SAR funciona como una barrera semipermeable y selectiva involucrada en la fisiología del espermatozoide, principalmente en la capacitación.

1.3 CAPACITACIÓN Y EVENTOS PREVIOS A LA REACCIÓN ACROSOMAL

La capacitación es un proceso de maduración post-testicular del espermatozoide mediante el cual adquieren la capacidad de fecundar un óvulo. Como ya se mencionó anteriormente, este proceso ocurre en el tracto reproductor femenino y es desencadenado por el ión bicarbonato (HCO_3^-). Se cree que este ión es internalizado al espermatozoide por un co-transportador llamado NBC que también internaliza Sodio (Na^+) (Demarco et al., 2002). A su vez, el HCO_3^- activa a la enzima soluble Adenilato ciclasa (sAC) generando cAMP a partir de ATP. cAMP es un segundo mensajero que activa a la proteína Cinasa A (PKA; Gadella & Harrison, 2000; Harrison & Miller, 2000; Wuttke et al., 2001) involucrada en la fosforilación de los residuos de serina/treonina en una serie de proteínas implicadas en la regulación de distintas vías de señalización que ocurren durante la capacitación (Martin-Hidalgo et al., 2018) como la fosforilación de las proteínas que se encuentran en la “hoja fibrosa” de la pieza principal (Miki et al., 2002) en donde tiene un efecto directo sobre la regulación de la motilidad del espermatozoide. El cambio de la concentración interna de HCO_3^- alcaliniza el pH intracelular y provoca una ligera hiperpolarización transitoria de la membrana plasmática (Demarco et al., 2002) lo cual modula la actividad de algunos canales iónicos (Jin & Yang, 2016). En conjunto, estos cambios activan a CatSper promoviendo un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} en el flagelo (Lishko & Mannowetz, 2018), lo que a su vez provoca un aumento de la motilidad del flagelo o hiperactivación de la motilidad. En el caso de humanos, CatSper es indirectamente modulado por progesterona y se sabe que es sensible a otros componentes (Strünker et al., 2011; Ernesto et al., 2015).

De igual manera, un evento clave para llevar a término la capacitación y proseguir con la reacción acrosomal es el eflujo de colesterol de la membrana plasmática (Travis & Kopf, 2002). Se cree que el eflujo de colesterol es mediado por lipoproteínas encontradas en el

medio externo y se ha observado que este evento está asociado a la traslocación de fosfolípidos entre la bicapa lipídica de la membrana (Flesch et al., 2001). Se sabe que dicho proceso es desencadenado por un aumento en la concentración intracelular del ión HCO_3^- el cual induce la activación de la vía cAMP-PKA que promueve la activación de flipasas de lípidos (Gadella & Harrison, 2000). A su vez, se ha demostrado en espermatozoides de jabalí que previo a su eflujo de la membrana el colesterol se redistribuye hacia la zona apical del espermatozoide, al igual que proteínas que son marcadores de balsas lipídicas como Caveolina-1 y Flotilina-1 (van Gestel et al., 2005). Además, en estudios de análisis de fracciones de membrana resistentes a detergentes se ha observado que dichos componentes se encuentran en las mismas fracciones por lo cual se ha propuesto que el colesterol se encuentra en la membrana formando balsas lipídicas (Asano et al., 2009; Asano et al., 2010).

Posterior a la capacitación ocurre un proceso denominado reacción acrosomal, el cual consiste en la exocitosis de una vesícula llamada Acrosoma cuyo contenido está compuesto de enzimas hidrolíticas que permitirán al espermatozoide atravesar la zona pelúcida para poder alcanzar al óvulo. Este proceso de exocitosis depende de la participación de un conjunto de proteínas Receptores de SNAP (SNARE, por sus siglas en inglés) localizadas en la membrana plasmática (específicamente de la región apical de la cabeza) y en la membrana del acrosoma. Entre estas proteínas se encuentran SNAP-23, SNAP-25, las Sintaxinas 1A, 1B, 4 y 6 y VAMP2, las cuales se ensamblan formando los complejos de fusión de membranas (Tomes et al., 2002) en los cuales están implicadas otras proteínas reguladoras como la Sinaptotagmina y Clomplexina (Roggero et al., 2007). Se sabe que en los espermatozoides la formación del complejo SNARE ocurre en regiones con alta concentración de colesterol y su activación depende de la entrada de calcio al citoplasma y de la proteína Rab3A (GTPasa de la familia Rab; de Blas et al., 2005). Se ha visto una disminución en la activación del complejo SNARE mediado por Rab3A cuando hay una alta concentración de colesterol en las regiones donde se ubica dicho complejo, posiblemente por impedimento estérico, de tal forma que cuando el colesterol efluye de la membrana aumenta la probabilidad de encuentro entre Rab3A y el complejo SNARE, provocando un aumento en la fosforilación de SNARE y en consecuencia un aumento en su

activación dependiente de Ca^{2+} potenciando así la reacción acrosomal (Belmonte et al., 2005; Tsai, Garcia-Gil, van Haeften & Gadella, 2010).

1.4 REORGANIZACIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR DURANTE LA CAPACITACIÓN

Los espermatozoides de mamífero se caracterizan por su alta concentración de esteroides, con una relación molar colesterol/fosfolípidos de 0.3 a 0.45. Entre el 16 y 18 % de los fosfolípidos corresponde a esfingomielina y el 50 al 63 % a fosfogliceridos de colina, mientras que el resto corresponde a fosfogliceridos de inositol, serina y etanolamina (Parks and Lynch, 1992). Además, en comparación con las células somáticas la membrana de los espermatozoides tiene una mayor concentración de lípidos poli-insaturados. Se ha hipotetizado que esta característica de los espermatozoides podría ser una adaptación que le permite mantener la fluidez necesaria a la membrana para poder aumentar la motilidad del flagelo y también para contender contra el estrés oxidativo al que se ve expuesto por la generación de especies reactivas de oxígeno producto de la síntesis de ATP durante la hiperactivación, lo cual se ha deducido a partir de la relación que hay entre el gasto energético de los espermatozoides y la proporción de ácidos grasos insaturados (delBarco-Trillo & Roldan, 2013).

No obstante, la composición lipídica y proteica de la membrana del espermatozoide de mamífero se modifica en cada etapa de su maduración post-testicular. Aunque los espermatozoides son incapaces de sintetizar nuevas proteínas y lípidos, durante su trayecto por el epidídimo pueden importar dichos elementos a partir del medio extracelular por medio de vesículas llamadas epididisomas secretadas por el epitelio del epidídimo (Skerget, Rosenow, Petritis & Karr, 2015). De tal forma que durante su tránsito por el epidídimo, el espermatozoide modifica la composición proteica de su membrana al igual que su composición lipídica, aumentando la concentración de colesterol, esfingomielina y ácidos grasos insaturados a través de los epididisomas (Bernabò, Agostino, Ordinelli, Mattioli & Barboni, 2016; Rejraji et al., 2006).

Por otro lado, durante la capacitación se ha observado la redistribución lateral de lípidos sobre el mismo plano de la membrana plasmática, posiblemente mediado por escramblasas (Flesch et al., 2001) y la traslocación entre ambas capas lipídicas, que se cree es mediado por flipasas (Gadella & Harrison, 2000; Selvaraj et al., 2007).

Como ya se mencionó anteriormente, se sabe que la translocación de los lípidos durante la capacitación se induce por la activación de la vía PKA/cAMP debido al aumento en la concentración del ión HCO_3^- , dicha vía promueve la activación de las escramblasas. Particularmente, las escramblasas están involucradas en la relocalización y concentración del colesterol hacia la zona apical en la cabeza del espermatozoide (**Figura 6 B**) después de lo cual ocurre su eflujo mediado por aceptores de esteroides como lipoproteínas de alta densidad y albúmina (**Figura 6 C**). Lo anterior se ha demostrado mediante estudios de microscopía electrónica y de fluorescencia (Flesch et al., 2001) al igual que mediante análisis de espectrometría de masas de la membrana del espermatozoide a lo largo de la capacitación (van Gestel et al., 2005). Así mismo, el eflujo de colesterol que ocurre durante la capacitación está asociado a la activación de lipasas como Fosfolipasa B (PLB), fosfolipasa A1 y A2 (Asano, Nelson-Harrington & Travis, 2013) que modifican la composición lipídica de la membrana y su curvatura sin involucrar importación o exportación de lípidos (**Figura 7**). Dicha modificación de la curvatura facilitará la fusión de las membranas plasmática y acrosomal durante la reacción acrosomal.

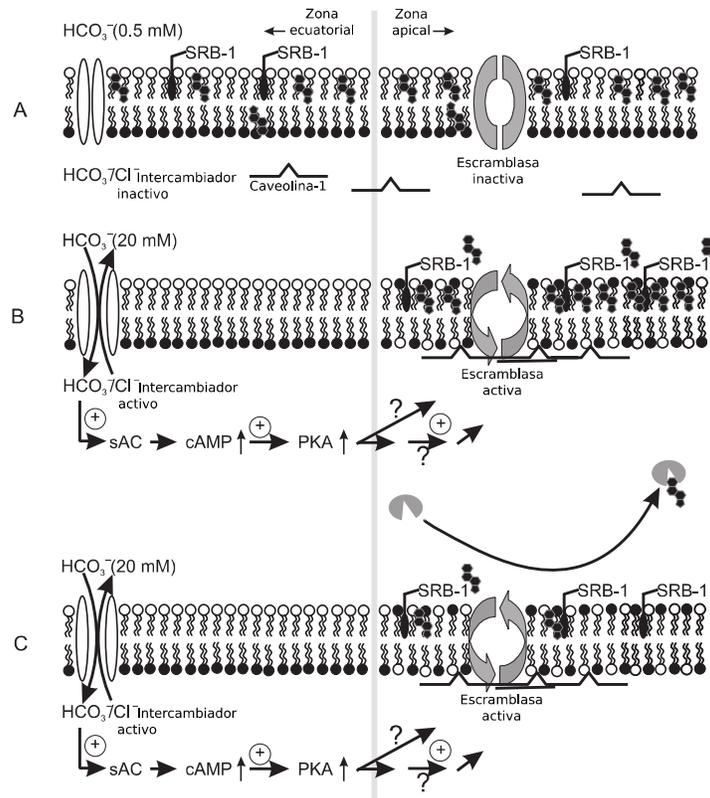


Figura 6. Modelo de la redistribución de colesterol promovido por el aumento del ión HCO_3^- y su posterior eflujo. **A**, la escramblasa de fosfolípidos se encuentra inactiva cuando hay bajos niveles de HCO_3^- (0.5 mM) y el colesterol (anillos de color negro) se encuentra distribuido a lo largo de las regiones ecuatorial y apical. **B**, niveles elevados de la concentración externa de HCO_3^- (20 mM) induce su internalización al espermatozoide mediante la activación de un intercambiador. El HCO_3^- activa a la Adenilato ciclasa soluble (sAC) y esta, a su vez, activa la vía PKA/cAMP. La escramblasa es activada por la vía PKA/cAMP induciendo la redistribución y concentración de colesterol hacia la zona apical y la traslocación de lípidos de la cara externa (cabezas hidrofílicas de color blanco) hacia la interna y los lípidos de la cara interna (cabeza hidrofílica de color negro) hacia la cara externa. **C**, posterior a la redistribución y concentración de colesterol se induce su eflujo mediado por aceptores de esteroides como lipoproteínas y albúmina. Figura modificada de Flesch et al., 2001.

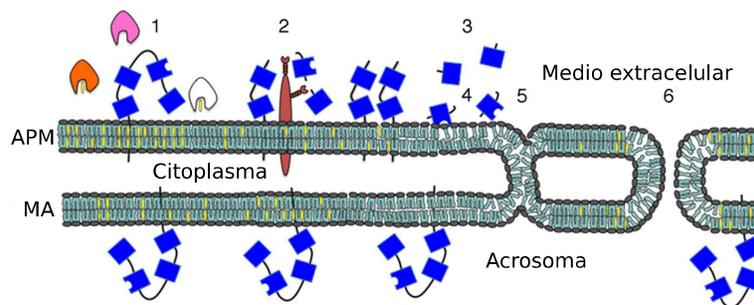


Figura 7. Modelo de la activación de fosfolipasa B (PLB) inducida por el eflujo de colesterol durante la capacitación del espermatozoide. APM: membrana plasmática acrosomal; MA: membrana acrosomal. **1**, Asociación de aceptores de esteroides (rosa y naranja) a región enriquecida en colesterol (amarillo) en la APM

y extracción de colesterol (blanco). 2, el aumento en la fluidez de la membrana, debido al eflujo de colesterol, induce la interacción de la PLB (azul) con proteasas (café) induciendo su corte proteolítico y activación. 3-4, la PLB activa hidroliza fosfolípidos de la cara externa de la APM. 5, modificación de la curvatura de la membrana por efecto de la hidrólisis de fosfolípidos facilita la fusión de las membranas APM y OAM durante el inicio de la reacción acrosomal completando posteriormente su fusión (6) dejando expuesto el contenido acrosomal, llevando a término esta reacción. Modificado de Asano, Nelson-Harrington & Travis, 2013

También, durante la capacitación se ha observado la redistribución del gangliosido GM1 hacia la zona apical de la cabeza al igual que el colesterol (Selvaraj et al., 2006; Selvaraj et al., 2007; Selvaraj et al., 2009). Además, se ha demostrado que la concentración de GM1 hacia la zona apical de la cabeza promueve la aglomeración del canal iónico de calcio Cav2.3 en esta misma región y se sabe que ocurre por medio de la interacción directa entre la subunidad $\alpha 1E$ del canal iónico con el ácido siálico del GM1, lo cual concluye con su activación provocando aumentos transitorios en la concentración de Ca^{2+} seguido de un aumento sostenido que se cree está involucrado en la activación de la reacción acrosomal. (Cohen et al., 2014).

Además de agruparse en regiones específicas de la membrana, la evidencia sugiere que tanto el colesterol como otros lípidos saturados (como el gangliosido GM1 y esfingomielina) se encuentran formando dominios nanométricos que son modificados durante la capacitación y que dichas modificaciones podrían estar implicadas en la regulación misma de la capacitación. Sin embargo, no se han podido observar de forma directa en las células.

CAPÍTULO 2

MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES

Las propiedades moleculares de la membrana celular se encuentran principalmente determinadas por las propiedades fisicoquímicas de los lípidos y proteínas que la conforman (van Meer, Voelker & Feigenson, 2008). Distintos modelos sobre la estructura de la membrana celular se han propuesto con base en la evidencia obtenida mediante las técnicas disponibles en el momento de su proposición.

Uno de los primeros modelos propuestos que describen las propiedades moleculares de la membrana fue el “*modelo de sándwich proteína-lípido-proteína*” propuesto en 1935 por Hugh Davson y James Danielli (Danielli & Davson, 1935) el cual consiste en una bicapa lipídica flanqueada por proteínas (**Figura 8 A**). Su propuesta se basó principalmente las observaciones de Danielli sobre la permeabilidad y propiedades físicas de las biomembranas delgadas formadas por los extractos no solubles en medios acuosos de eritrocitos y levadura. Posteriormente, en la década de 1950, su modelo se reforzó con evidencia obtenida por microscopía electrónica en donde se observó la doble capa lipídica correspondiente a la “estructura de sándwich” (revisado en Hendler, 1971).

Sin embargo, varias décadas después y mediante la acumulación de más evidencia sobre las propiedades de los lípidos y proteínas, principalmente observaciones sobre la estructura de las proteínas de membrana y observaciones sobre modificaciones de la superficie de los linfocitos, se propuso “*el modelo del mosaico fluido*” de la membrana celular por Singer y Nicolson en 1972 (Singer & Nicolson, 1972), en el cual se propone que la membrana está conformada por una bicapa lipídica con proteínas integrales en donde dichos elementos tienen la capacidad de difundir libremente en el plano de la bicapa (**Figura 8 B**).

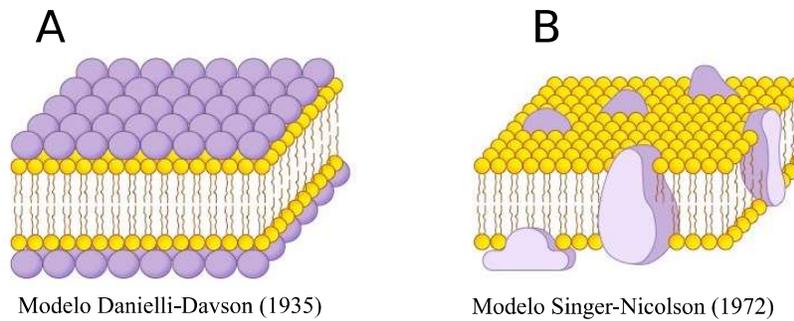


Figura 8. Modelos propuestos de la estructura molecular de la membrana celular. **A**, Modelo propuesto por Danielli y Davson en 1935; en amarillo se representan a los fosfolípidos que conforman a la membrana celular y en morado a las proteínas. **B**, Modelo propuesto por Singer y Nicolson en 1972; se aplica el mismo código de colores que en A, se puede observar que las proteínas se acomodan de manera distinta que en A. Imagen obtenida de "Membrane Proteins - Lessons - Tes Teach", 2020.

No obstante, inmediatamente después de la propuesta de Singer y Nicolson se comenzó a acumular evidencia mediante distintos métodos bioquímicos y biofísicos que sugería una distribución heterogénea de los componentes de la membrana el cual surge por el impedimento en la difusión de los componentes en determinadas zonas de la célula. Estas observaciones conllevaron a la proposición del modelo de “*balsas lipídicas*” por Simons y Van Meers en 1988 (van Meer & Simons, 1988)

2.1 MODELO DE “BALSAS LIPÍDICAS” Y EVIDENCIA DE SU FORMACIÓN EN LA MEMBRANA CELULAR

En 1988 Simons y Van Meers propusieron el modelo de “*balsas lipídicas*” (**Figura 9**) basándose en sus observaciones sobre la formación de dominios enriquecidos en glicolípidos en la zona apical de células epiteliales. Actualmente se consideran a las balsas lipídicas como “dominios de 10 a 200 nm enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, heterogéneos y altamente dinámicos que compartimentalizan procesos celulares y que son estabilizados para formar dominios mas grandes por medio de interacciones proteína-proteína, lípido-proteína y lípido-lípido” (Pike, 2006). Aunque la propuesta de este modelo ha sido controversial, debido a las técnicas utilizadas para su estudio, se ha acumulado gran cantidad de evidencia sobre su existencia y su posible función biológica.

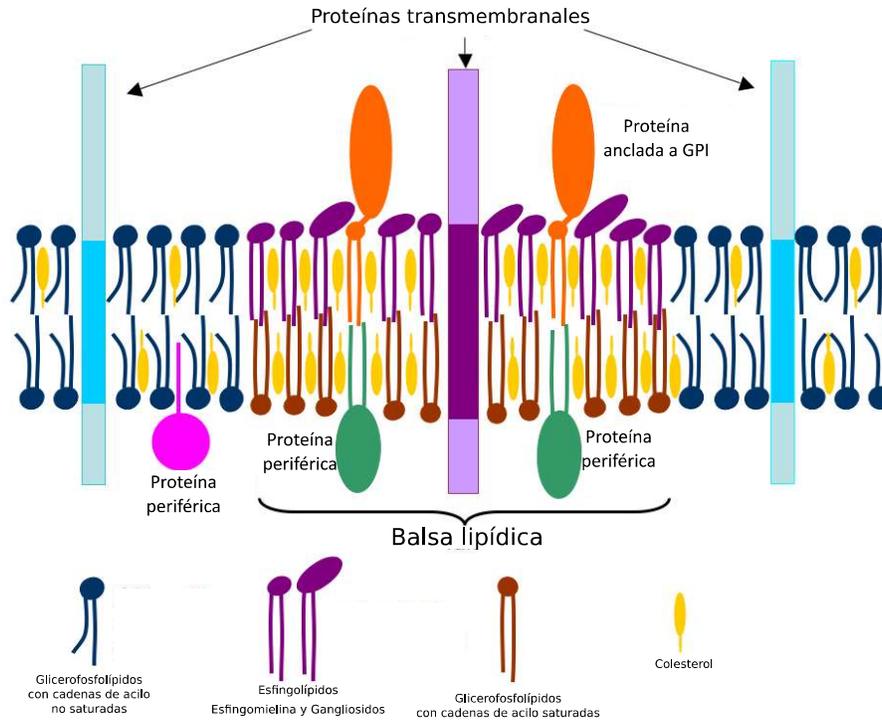


Figura 9. Modelo simplificado de balsas lipídicas en la membrana celular. La balsa lipídica consiste en una región con alta concentración de esfingolípidos (morado), glicerofosfolípidos saturados (café) y colesterol (amarillo), en la cual hay la presencia de proteínas transmembranales (morado) y proteínas periféricas que generalmente están ancladas a la membrana por medio de GPI (naranja) o por medio de adición de grupos acilo (verde). La región que no corresponde a la balsa lipídica contiene colesterol en menor concentración que la región de la balsa y una composición mayormente de glicerofosfolípidos no saturados (azul); de igual forma hay la presencia de proteínas transmembranales (cian) y proteínas periféricas principalmente ancladas a la membrana mediante grupos prenilo. Imagen obtenida de Waheed & Freed, 2009.

Las primeras evidencias de la formación de dominios lipídicos se obtuvieron a partir de membranas artificiales. El uso de las monocapas de Langmuir en 1917 fue uno de los principales estudios que permitió determinar las propiedades físicas de las membranas que surgen a partir de su composición lipídica. Desde entonces, el uso de modelos de membrana *in vitro* ha permitido conocer el efecto particular de la composición lipídica sobre la estructura de la membrana y sus propiedades biofísicas, particularmente el efecto del colesterol y fosfolípidos (Edidin, 2003).

Los primeros estudios en los que se demostró la formación de fases lipídicas se realizaron mediante la técnica de calorimetría de barrido diferencial o DSC, por sus siglas en inglés (revisado en Morigaki & Tanimoto, 2018; Carquin, D'Auria, Pollet, Bongarzone & Tyteca, 2016). De igual forma se usaron membranas especializadas derivadas de extractos de

tejidos (revisado en Alessandra Cambi & Diane S. Lidke, 2015) que demostraron la tendencia de los componentes de la membrana celular de formar fases lipídicas.

La información obtenida mediante membranas artificiales y reconstruidas ha sido útil para describir las propiedades de la membrana celular, no obstante, dicha información no representa la membrana celular en su contexto biológico. Lo anteriormente dicho se debe a que las membranas artificiales suelen formarse a partir de mezclas constituidas por una cantidad muy limitada de lípidos, descartando incluso la presencia de las proteínas integrales y/o periféricas de membrana (Carquin, D'Auria, Pollet, Bongarzone & Tyteca, 2016).

Aunado al análisis de las membranas artificiales por calorimetría también se ha utilizado el análisis de fracciones de membrana resistentes a detergentes para estudiar las propiedades de la membrana celular. Usualmente se utilizan detergentes como el TRITON X100 que nos permite fraccionar la membrana con distintos grados de solubilidad, el cual depende de su composición lipídica y proteica, siendo las fracciones menos solubles las que corresponden a las balsas lipídicas. Las distintas fracciones obtenidas pueden ser separadas por flotabilidad en gradientes de sacarosa mediante centrifugación en tubos de ensayo, quedando las fracciones más densas (que son las menos solubles) en el fondo y las menos densas (más solubles) en la superficie (Dubois et al., 2015). Del tubo de ensayo se pueden aislar las diferentes fracciones y analizar su composición lipídica y proteica (van Gestel et al., 2005). A partir de estos análisis se ha determinado que las fracciones resistentes a solubilidad por detergentes tienen una concentración de colesterol, esfingolípidos y proteínas mayor en comparación con las fracciones más solubles (Dubois et al., 2015). Esta información ha sido utilizada como referencia para determinar la localización de los elementos encontrados en las fracciones resistentes a detergente (que corresponden a las balsas lipídicas) en las células mediante microscopía de fluorescencia utilizando sondas fluorescentes específicas de lípidos y proteínas.

El desarrollo de técnicas de espectroscopia de fluorescencia ha permitido estudiar a la membrana celular en un contexto más cercano al fisiológico. El desarrollo de fluoróforos orgánicos que se integran a la membrana y cuyas propiedades fotoquímicas se ven afectadas por las propiedades de la misma (como el grado de ordenamiento, curvatura, pH y

potencial eléctrico) han permitido obtener mayor información sobre la estructura y fisiología de la membrana en células vivas (Gaibelet et al., 2017).

Por ejemplo, el uso del fluoróforo Laurdan ha permitido demostrar en células vivas la presencia de fases con distinto grado de ordenamiento, el cual se mide mediante el grado de hidratación de la membrana (Owen, Williamson, Magenau & Gaus, 2012). Otro ejemplo es la técnica de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) mediante la cual se ha demostrado la existencia de barreras de difusión en la membrana que mantienen segregados a los lípidos y proteínas de membrana (James, 2004), así como las diferencias en los coeficientes de difusión medidos entre los distintos dominios de membrana observados (Wolfe, James, Mackie, Ladha & Jones, 1998). No obstante, introducir nuevos elementos a la membrana con propiedades químicas distintas a sus componentes nativos puede alterar las propiedades innatas de la membrana celular.

Otra alternativa es el uso de sondas fluorescentes que perturban en menor grado a las propiedades innatas de las células como las proteínas fluorescentes asociadas a fragmentos de toxinas con afinidad específica a lípidos. Tal es el caso de la subunidad B de la toxina pentamérica de cólera (abreviado CTB) para visualizar la distribución de GM1 en espermatozoides de ratón (Treviño et al., 2001; Selvaraj et al., 2006; Selvaraj et al., 2007; Selvaraj et al., 2009) al igual que la subunidad de unión a colesterol de la toxina perfringolisina unida a distintos fluoróforos y el uso de la de la toxina lisenina para observar esfingomielina (Gaibelet et al., 2017; Mizuno et al., 2011) que han permitido observar dominios enriquecidos en dichos lípidos de escalas manométricas en combinación con técnicas de microscopía de súper resolución en células somáticas (Mizuno et al., 2011).

2.2 EVIDENCIA DE LA FORMACIÓN DE NANO-DOMINIOS LIPÍDICOS EN LA MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE DE MAMÍFERO

Las principales evidencias que sugieren la presencia de nano-dominios lipídicos en la membrana del espermatozoide de ratón se han obtenido por medio de técnicas bioquímicas y de microscopía electrónica y de fluorescencia.

Particularmente en espermatozoides de jabalí se ha observado por medio de microscopía electrónica de crio-fractura la formación de complejos de filipina-colesterol en la cabeza

del espermatozoide; además se observó que dichos complejos filipina-colesterol se redistribuyen hacia la zona apical de la cabeza cuando se incuban en medio capacitante, el cual contiene HCO_3^- y albúmina (Flesch et al., 2001). Esta fue de las primeras evidencias de la formación de dominios enriquecidos en colesterol a escala nanométrica.

Asimismo, se han caracterizado la composición molecular de las fracciones de membrana de espermatozoides de ratón resistentes a solubilidad por detergentes. A partir de estos análisis se han observado al menos tres distintas fracciones resistentes a detergentes las cuales se diferencian en su grado de flotabilidad y en la proporción de colesterol, gangliosido GM1 y proteínas que conforman a cada una de estas tres fracciones (Asano et al., 2009; Asano et al., 2010). Dichas fracciones se cree que corresponden a tres subtipos de balsas lipídicas en la membrana del espermatozoide, en los cuales se ha observado una alta concentración de colesterol, esfingolípidos, gangliosidos (principalmente GM1) y caveolina-1 (Asano et al., 2009; Asano et al., 2010) los cuales también han sido observados en otros tipos celulares (Malinsky et al., 2013), por lo cual han servido como marcadores de balsas lipídicas en microscopía óptica de fluorescencia (Watanabe et al., 2017; van Gestel et al., 2005; Treviño et al., 2001).

Además, como se mencionó en la sección 1.4, se ha observado mediante microscopía de fluorescencia la segregación de lípidos como colesterol, gangliosido GM1 y esfingomielina en regiones particulares de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide de ratón en conjunto con proteínas como las de la familia SNARE y canales iónicos como el Cav2.3 y los canales TRP (Treviño et al., 2001; Cohen et al., 2014).

Debido a haberse observado en las mismas regiones y a la evidencia obtenida mediante microscopía electrónica y análisis de fracciones de membrana se cree que los componentes anteriormente mencionados se distribuyen formando balsas lipídicas, los cuales se modifican durante la capacitación del espermatozoide debido al eflujo de colesterol (Gadella & Leahy, 2015; Selvaraj et al., 2009).

Con base en estas observaciones se ha propuesto un modelo que describe como ocurre la redistribución y eflujo del colesterol durante la capacitación del espermatozoide. En este modelo el colesterol se encuentra distribuido en toda la región del segmento ecuatorial y acrosoma apical (revisar **Figura 4** para mayor referencia) del espermatozoide no capacitado, formando nano-dominios lipídicos junto con glicolípidos y proteínas. Durante

la capacitación ocurre una redistribución del colesterol hacia la zona apical concentrando los nano-dominios lipídicos en esta región (**Figura 10 A**). La agrupación de dichos nano-dominios podría favorecer la interacción de componentes de la membrana que participan en las mismas vías de señalización, por ejemplo las proteínas SNARE. En el caso de las proteínas SNARE, su reclutamiento y concentración en la zona apical favorecería su interacción generando la formación del complejo de fusión de membranas el cual, después del eflujo de colesterol, se activa directamente por el aumento en la concentración intracelular de calcio (**Figura 10 B**). La activación del complejo de fusión de membranas promueve la fusión de las membranas plasmática y la membrana acrosomal, generando vesículas híbridas que permiten la exposición del interior del acrosoma liberando de esta manera su contenido al medio extracelular (**Figura 10 B, C1' & C2'**; Zitranski et al., 2010; Tsai, Garcia-Gil, van Haeften & Gadella, 2010).

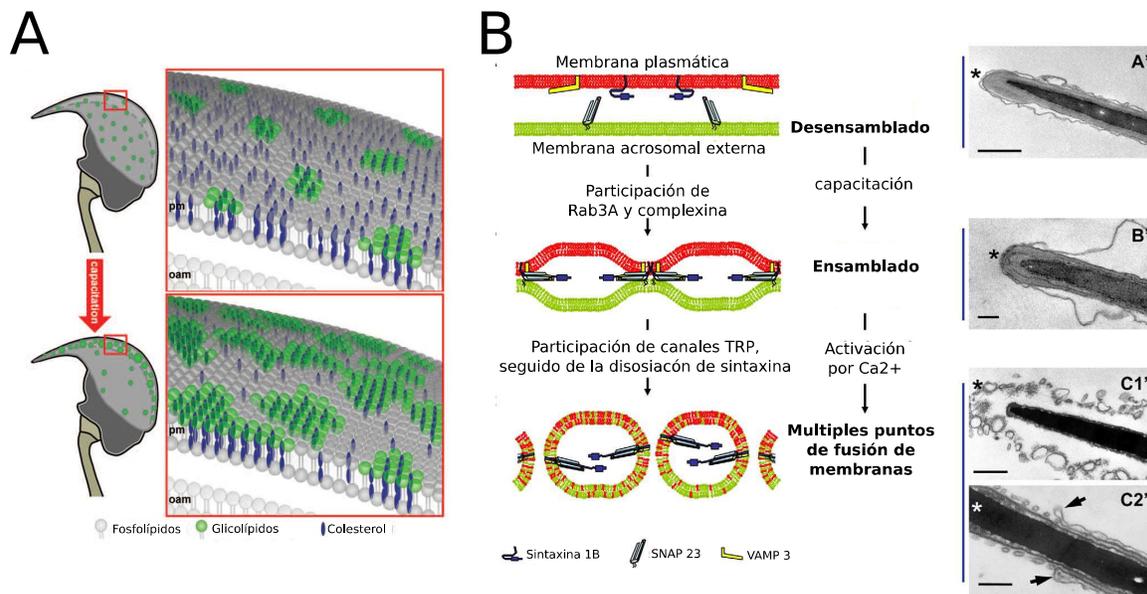


Figura 10. Modelo hipotético de la reorganización de balsas lipídicas durante la capacitación y su implicación fisiológica. **A**, Redistribución de nano-dominios lipídicos enriquecidos en colesterol (azul) y glicolípidos (verde) en la membrana plasmática del espermatozoide de ratón durante la capacitación. **B**, Efecto de la redistribución de los nano-dominios lipídicos en la distribución de las proteínas que conforman el complejo de fusión de membranas durante la capacitación; de arriba hacia abajo, antes de la capacitación el complejo de fusión de membranas (compuesto por Sintaxina 1B, SNAP 23 y VAMP 3) se encuentra desensamblado, después de la capacitación el complejo de fusión de membranas se ensambla y posteriormente es activado por Ca^{2+} . **A'**- **C2'** micrografías electrónicas de transmisión; **A'**: micrografía de la región acrosomal antes de la formación de los complejos de fusión de membranas (espermatozoides no capacitados); **B'**: micrografía de la región acrosomal de un espermatozoide capacitado (formación de complejos de fusión de membranas); **C1'**: micrografía de la región acrosomal de un espermatozoide que ha sufrido la reacción acrosomal en donde se observan las vesículas híbridas producto de la activación de los

complejos de fusión de membranas; **C2'**: micrografía de la región acrosomal y sección ecuatorial de un espermatozoide que ha sufrido la reacción acrosomal, se observa que la membrana de la sección ecuatorial no muestra la formación de vesículas (membrana inicia a partir de las flechas negras). Imagen modificada de Zitanski et al., 2010 y Tsai et al., 2010.

CAPÍTULO 3

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Observar cómo se distribuye el colesterol en la membrana del espermatozoide de ratón a escala nanoscópica *in situ* nos permitirá determinar si dicho colesterol se organiza en nanodominios que se redistribuyen durante la capacitación, lo que permitirá comprender mejor el papel del colesterol en la fisiología del espermatozoide.

Las metodologías anteriormente descritas han arrojado evidencia de la formación de nanodominios lipídicos en la membrana celular del espermatozoide de ratón. No obstante, debido a los métodos utilizados no ha sido posible observarlos directamente. Las técnicas bioquímicas como el fraccionamiento de membranas tienen como limitante el requerimiento de destruir a la célula, por lo cual las observaciones obtenidas no representan el contexto fisiológico de los espermatozoides. De igual manera, la evidencia obtenida mediante métodos de espectroscopía de fluorescencia como FRAP solo permite deducir la existencia de dichos nano-dominios con base en los coeficientes de difusión obtenidos. Una de las razones por las que no ha sido posible observar a los nano-dominios lipídicos directamente en la membrana del espermatozoide mediante microscopía óptica de fluorescencia es porque son menores al límite de resolución que se puede obtener mediante esta técnica (200 nm aproximadamente). No obstante, actualmente se cuenta con un conjunto de métodos de microscopía de súper-resolución que permiten obtener imágenes con una resolución de hasta 20 nm, dependiendo del método.

El presente proyecto propone el uso de microscopía de súper-resolución para generar imágenes en donde se pueda observar a escala nanométrica la redistribución de los nanodominios enriquecidos en colesterol durante la capacitación del espermatozoide de ratón. Para marcar el colesterol en los espermatozoides se utilizará la sonda fluorescente Dronpa-D4, la cual consiste en el fluoróforo Dronpa unido covalentemente al Dominio 4 (de unión a colesterol) de la toxina perfringolisina de tal forma que la sonda no resulta ser citotóxica. Se seleccionó como modelo de estudio al espermatozoide de ratón debido a que el método de obtención de los espermatozoides permite tener un mayor control sobre su estado fisiológico inicial. Además, dado que los ratones de bioterio se reproducen bajo las mismas

condiciones ambientales y nutricionales se pueden obtener células cuyo estado metabólico y composición lipídica sea menos variable entre los distintos ratones, con lo cual se puede realizar un análisis con menor variabilidad poblacional y por lo tanto más preciso.

En general, los eventos moleculares que ocurren durante la capacitación, como el eflujo de colesterol y la redistribución de lípidos, son similares entre las distintas especies de mamífero. Por lo que la información obtenida a partir del presente estudio, realizado en espermatozoides de ratón, se podrá extrapolar a espermatozoides de otras especies incluido el humano (Travis & Kopf, 2002; Gadella & Luna, 2014)

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

El colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide de ratón se organiza en nano-dominios de membrana que cambian su distribución durante el proceso de capacitación.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la distribución de nano-dominios enriquecidos en colesterol en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide de ratón durante el proceso de capacitación.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Visualizar nano-dominios enriquecidos en colesterol en la membrana plasmática mediante microscopía de súper-resolución.
- 2) Observar los cambios en la distribución de los nano-dominios de membrana enriquecidos en colesterol en espermatozoides no capacitados y capacitados.

CAPÍTULO 6 METODOLOGÍA

La estrategia experimental para lograr los objetivos planteados en la sección anterior consistió en el marcaje de espermatozoides de ratón con la sonda de colesterol Dronpa-D4 para su aplicación en microscopía de súper-resolución (Mizuno et al., 2011) y de esta manera obtener imágenes de la distribución de colesterol en la membrana del espermatozoide con resolución nanométrica. Finalmente, a partir de las imágenes de súper resolución se realizó un análisis de la distribución de los nano-dominios de colesterol en la membrana plasmática de espermatozoides capacitados y no capacitados para determinar si hay un cambio en la posición en la cabeza de los nano-dominios de colesterol cuando se induce la capacitación del espermatozoide.

A grandes rasgos, esta estrategia se divide en tres fases:

- 1) Obtención de la sonda Dronpa-D4.
- 2) Ensayos de microscopía de fluorescencia y obtención de imágenes de súper-resolución.
- 3) Análisis de imágenes de súper resolución y caracterización de dominios enriquecidos en colesterol.

6.1 OBTENCIÓN DE LA SONDA DRONPA-D4

La sonda Dronpa-D4 fue desarrollada por Mizuno y colaboradores (Mizuno et al., 2011) y consiste en el dominio D4 de la toxina perfringolisina-O (dominio de unión a colesterol) unido covalentemente a la proteína fluorescente fotoactivable Dronpa. La versión de Dronpa de esta sonda es monomérica; además la ausencia de los dominios de oligomerización de la toxina perfringolisina-O impide su autoensamble evitando la formación artificial de la sonda. Dronpa absorbe luz de 405 nm y de 488 nm y emite fluorescencia cuando es excitado con luz de 488 nm. La sonda se obtuvo mediante la expresión heteróloga del plásmido pET-28-Dronpa-D4 en bacterias *E. coli* y posteriormente se purificó utilizando Columnas de Níquel, ya que la sonda cuenta con un tag de Histidinas para su purificación mediante este método.

La secuencia del plásmido se puede consultar en el **Apéndice A.1** del **Capítulo 11** y las propiedades fotofísicas de Dronpa se describen con detalle en el **Apéndice A.2**.

Los plásmidos fueron donados amablemente por el Dr Mizuno y el Dr Miyawaki y los obtuvimos almacenados en papel filtro y fueron procesado posteriormente para la expresión y purificación de Dronpa-D4 con los protocolos que se mencionan a continuación.

6.1.1 Protocolo para generar bacterias electrocompetentes *E. coli* DH5a y BL21

Este protocolo se obtuvo del libro “Short protocols in molecular biology” (Ausubel et al., 1999). A partir de una cepa crio-preservada de **E. coli DH5a** o **BL21** en glicerol a -80 °C se inoculó una asada en 4 ml de medio de cultivo líquido **YENB** en un tubo de 16x150 mm y se incubó a 37 °C toda la noche a 300 r.p.m (revoluciones por minuto). Se utilizó 0.25 mL del cultivo saturado para incubar en 50 mL de medio líquido YENB en un matraz de 500 mL a 37 °C y 300 r.p.m. El cultivo se monitoreó midiendo las unidades de densidad óptica a 600 nm; cuando se alcanzaron entre 0.5 y 0.9 unidades el cultivo se enfrió sobre hielo. El cultivo se pasó a tubos Falcon de 50 mL pre-enfriado y se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C, conservando la pastilla de células sedimentadas en el fondo del tubo y eliminando el sobrenadante. La pastilla formada en el fondo se lavó con 5 mL de agua destilada fría re-suspendiendo la pastilla y posteriormente centrifugando a 8000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C eliminando el sobrenadante, esto se repitió dos veces para eliminar completamente los residuos de medio de cultivo. La pastilla se resuspendió en un volumen total de 2 mL de glicerol al 10% frío después de lo cual se centrifugó para obtener nuevamente la pastilla de células eliminando el sobrenadante con una micro-punta. La pastilla se resuspendió nuevamente en glicerol al 10% frío en un volumen final de 0.25 mL. Las células re-suspendidas en el paso anterior se alicuotaron en tubos de 1.5 mL con 50 µL de las células ahora competentes y se almacenaron a -80 °C.

6.1.2 Protocolo de transformación de bacterias *E. coli* DH5a y BL21 con el plásmido pET28-Dronpa-D4

Este protocolo se obtuvo del libro “Short protocols in molecular biology” (Ausubel et al., 1999). El papel filtro en el cual se almacenó el plásmido pET28-Dronpa-D4 se colocó en un microtubo de 0.6 mL con 30 µL de **buffer TE** (Tris-HCl 10 mM, EDTA•Na₂ 0.1 mM, pH 8) y se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente antes de utilizarse. Se

descongeló una alícuota de 50 μ L de bacterias electrocompetentes *E. coli* DH5 α o BL21 y se agregó 4 μ L de los plásmidos disueltos en el buffer TE. Después las bacterias se colocaron en una cubeta de electroporación. Se aplicó un pulso de 2500 volts. Posteriormente se extrajeron las bacterias rápidamente de la cubeta de electroporación y se colocaron en un tubo para cultivo con un volumen final de 2 mL de medio líquido LB sin antibiótico. El cultivo se incubó por 1 hora a 37 °C con agitación constante a 300 r.p.m. Finalmente se tomaron 200 μ L y se sembraron en cajas con medio LB sólido con antibiótico Kanamicina. Se dejó incubar la placa 12 hrs. a 37° C. Para hacer la clona de bacterias transformadas con el plásmido se seleccionó una colonia aislada en la placa y se dejó crecer en 5 mL de medio líquido LB con antibiótico Kanamicina en un tubo durante toda la noche a 37 °C y 300 r.p.m. Al día siguiente se tomó 800 μ L del cultivo de bacterias (ahora transformadas con el plásmido) y se resuspendió en 800 μ L de glicerol al 80 % y se almacenó a -80 °C para su uso en ensayos posteriores. El resto del cultivo de bacterias se puede utilizar para la extracción y purificación del plásmido para ensayos posteriores.

6.1.3 Extracción de ADN plasmídico para su amplificación y almacenamiento para su posterior uso

Se realizó un cultivo de bacterias transformadas con el plásmido en cuestión. Se inoculó una asada de bacterias transformadas en 5 mL de medio de cultivo LB líquido con antibiótico Kanamicina y se dejó incubar a 37 °C toda la noche a 300 r.p.m. Posteriormente se obtuvo la pastilla de células por centrifugación (8000 r.p.m. por 2 minutos). Dicha pastilla de células se procesó como mencionan las instrucciones del manual de uso del kit de extracción GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Fisher, #K0503):

A la pastilla se le agregó 250 μ L de la ***solución de resuspensión*** y se mezcló con vortex. Después se agregó 250 μ L de la ***solución de lisado*** y se mezcló invirtiendo el tubo 4 a 6 veces, después de lo cual se agregó la ***solución de neutralización*** y se mezcló invirtiendo el tubo 4 a 6 veces. Esta mezcla se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante cuidadosamente. El sobrenadante se colocó en la columna Thermo Scientific GeneJet Spin Column (esta columna se coloca en un micro-tubo de 1 mL) y se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 1 minuto. La columna tiene un filtro en el cual se quedan adheridos los plásmidos mientras que el resto de la solución se decanta y descarta. La columna se lavó 2 veces colocando 500 μ L de la ***solución de lavado*** centrifugando a 14000

r.p.m. por 0.5 minutos. Después se vuelve a centrifugar la columna vacía por un minuto a la misma velocidad que en el paso anterior. La columna se transfirió a un microtubo nuevo de 1 mL. Se agregó 50 μ L del **buffer de elución** a la columna y se dejó incubar por 2 minutos. Finalmente se centrifugó la columna a 14000 r.p.m. por 2 minutos y se recuperó lo decantado en el microtubo de 1 mL. Lo recuperado en el microtubo de 1 mL corresponde a los plásmidos eluidos y se almacenó a -20 °C.

6.1.4 Cuantificación de la concentración de ADN plasmídico

La cuantificación de la concentración de plásmido obtenido a partir de la preparación de Miniprep se hizo con el fluorómetro Qubit 3.0 (ThermoFisher, #Q33216) tal y como se describe en el manual de usuarios.

6.1.5 Electroforesis de ADN en gel de agarosa 1 %

Se agregó 1 g de agarosa en 100 mL de **buffer TAE 1x** (40 mM de Tris-acetato y 1 mM de EDTA con un pH de 8,3) y se disolvió calentando la solución en horno de microondas evitando cuidadosamente su ebullición. Se dejó enfriar un poco y después se agregó 10 μ L de marcador fluorescente de ácidos nucleicos GelGreen (Biotium, #41005). La mezcla se vació en el molde de la placa con los peines para formar los pozos de carga y se dejó solidificar. La electroforesis del gel con las muestras cargadas se realizó con buffer TAE 1x aplicando un potencial de 25 mV hasta que la muestra salió completamente del pozo pasando al gel, después de lo cual se aplicó un potencial de 80 a 120 mV y se detuvo hasta que la señal de carga alcanzó el final del gel. El gel se reveló con el sistema Gel Doc™ EZ (Bio-Rad).

6.1.6 Inducción de la expresión heteróloga de Dronpa-D4 en *E. coli* BL21

A partir de una alícuota crío-preservada de 50 μ L de *E. coli* cepa BL21 transformada con el plásmido pET28-Dronpa-D4 se realizó un cultivo de 5 mL de medio de cultivo líquido LB con kanamicina toda la noche a 37 °C a partir del cual se preparó un segundo cultivo de 50 mL de medio LB líquido en un matraz de 500 mL con una densidad óptica inicial de 0.1. El cultivo se dejó crecer a 37 °C y 200 r.p.m. hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6. Se agregó IPTG a una concentración final de 0.4 mM en los 50 mL de cultivo y se dejó incubar toda la noche a 16 °C y 200 r.p.m.

6.1.7 Purificación de proteínas por afinidad de cola de histidinas en columna de Níquel

Lisis de bacterias: Después de la incubación del punto 6.1.6 se centrifugó el cultivo a 8000 r.p.m. a 4 °C por 5 minutos para obtener la pastilla de bacterias, el sobrenadante se descartó y se retiró el remanente con una micro-punta. La pastilla se resuspendió en 5 mL de **buffer de lisis**. Después se agregó lizosima a una concentración final de 0.2 mg/mL y se dejó incubar por 30 minutos en hielo. Después de los 30 minutos de incubación con lizosima, las células se lisaron por sonicación durante 5 minutos (80% de potencia del sonicador con ciclos de 8 segundos encendido y 16 segundos apagado por minuto). El lisado se centrifugó a 10000 r.p.m. por 20 minutos a 4° C y se recuperó el sobrenadante (*porción citoplásmica*). También se recuperó el precipitado para comparar la porción de proteína de interés que se acumuló en la membrana y pared celular de las bacterias (*porción membrana*).

Purificación con columna de Níquel: Para esta sección se utilizó el sobrenadante recuperado del paso anterior. Se utilizó una columna de Níquel HisTrap FF crude 5x1 ml (GE Life Sciences, #11000458) la cual se preparó haciendo pasar a través de ella 25 mL de H₂O destilada para limpiarla. Posteriormente, se hizo pasar 50 mL de **buffer de unión** para activarla. Finalmente se hizo pasar la *porción citoplásmica* a través de la columna y se recuperó el sobrenadante filtrado (*fracción “efluente”*). Después se hizo un lavado de la columna con 50 mL de buffer de unión para disociar de la columna las proteínas que pudieran adherirse y que no son de interés, se recuperó lo filtrado (*fracción “lavado”*). A continuación se hicieron pasar soluciones de Imidazol para disociar la sonda de la columna y poder recuperarla. Primero se pasó una solución de Imidazol 150 mM y se recuperó lo filtrado (*fracción “150 mM”*). Después se pasaron soluciones de imidazol 200, 250, 300 y 500 mM consecutivamente recuperando cada fracción. Finalmente se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% las fracciones de Imidazol en donde se eluyó la sonda Dronpa-D4.

Lavado/diálisis: Una vez que se determinaron las fracciones en las que se encontraba la sonda Dronpa-D4 se procedió a mezclar dichas fracciones y retirar el Imidazol del medio por medio de diálisis. Se centrifugó la fracción recuperada con la sonda a 9000 r.p.m. a 4 °C en tubos Vivaspin de 6 mL (Sigma, #GE28-9322-96) hasta que se obtuvo un volumen de 1 mL. Posteriormente se agregó PBS 1x pH 7.4 hasta llegar a 6 mL y se volvió a repetir la

centrifugación; este paso se repitió tres veces. Al final se recuperó 1 mL de la muestra libre de Imidazol en un tubo eppendorf de 2 mL, posteriormente se alicuotó en porciones de 20 μ L y se almacenaron a -80 °C.

6.1.8 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida 10 %

Las proteínas en gel de poliacrilamida al 10% se revelaron utilizando tricloroetanol, colocándolo antes de solidificar el gel. Para la electroforesis se aplicó un potencial de 80 mV mientras las muestras pasaban por el gel separador y cuando estas pasaron al gel de corrida se aplicó un potencial de 120 mV, el cual se detuvo después de una hora y media aproximadamente. El gel se reveló con el sistema Gel Doc™ EZ (Bio-Rad).

6.1.9 Cuantificación de concentración de proteínas por el método de Bradford

Se realizó siguiendo las instrucciones del protocolo “Bio-Rad Protein assay” usando el Kit II (#500-0002).

6.2 ENSAYOS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE SÚPER-RESOLUCIÓN

Se utilizaron espermatozoides de ratones de la cepa CD-1 de aproximadamente 3 meses de edad criados en el bioterio del Instituto de Biotecnología UNAM. Los espermatozoides se obtuvieron de epidídimo por el método de swim-up. Los epidídimos se obtuvieron mediante extirpación en ratones sacrificados mediante dislocación cervical (Schatten, 2004).

6.2.1 Obtención de espermatozoides por el método de swim-up

Primero se obtuvieron los epidídimos de los ratones como se mencionó anteriormente (Schatten, 2004). Después se colocaron en el fondo de un tubo Eppendorf de 2 mL y se agregó medio TYH modificado no capacitante. Se incubaron por 15 minutos para permitir que los espermatozoides maduros viables logaran nadar hacia la parte superior del tubo. Al final se recolectó el medio de la parte superior del tubo que es donde están los espermatozoides viables.

6.2.2 Tratamiento de cubreobjetos para la adhesión de los espermatozoides a la superficie

Se colocaron 8 μL de Concanavalina-A (0.1 mg/ml) en el centro de un cubreobjetos redondo y se esparció por la mayor parte de la superficie. El cubreobjetos se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se colocó la muestra con los espermatozoides. Este protocolo se obtuvo de (Luque et al., 2018) y se modificó el uso de Laminina por Concanavalina la cual hemos observado en el laboratorio (datos no mostrados) adhiere mejor los espermatozoides al cubreobjetos.

6.2.3 Marcaje de colesterol con Dronpa-D4 en espermatozoides de ratón

Este protocolo se obtuvo y se modificó a partir del protocolo descrito en el artículo de Mizuno y colaboradores del 2011 en el que reportaron el uso de Dronpa-D4 para ensayos de microscopía de super resolución (Mizuno et al., 2011). Se tomaron 100 μL de espermatozoides obtenidos por swim-up y se diluyeron en otros 100 μL de medio TYH modificado no capacitante, obteniendo un volumen final de 200 μL . Después se agregó 5 μL de Dronpa-D4 (919.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a los 200 μL de espermatozoides, obteniendo una concentración final 0.023 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Posteriormente se dejaron incubar 30 minutos a 37° C. Después los espermatozoides se centrifugaron a 200 r.p.m. durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante para eliminar la fracción de la sonda fluorescente no asociada a la membrana de los espermatozoides. Después se resuspendieron en 200 μL de medio TYH modificado no capacitante y se colocaron 50 μL sobre el cubreobjetos tratado con Concanavalina-A. Se dejaron adherir durante 15 minutos a 37° C. Posteriormente se retiró el medio junto con los espermatozoides que no se adhirieron y se procedió a la fijación de las células con paraformaldehído al 4 % en PBS 1X pH 7.4 a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente se retiró el paraformaldehído y se lavaron los cubreobjetos en agitación suave con PBS 1X pH 7.4 para eliminar los remanentes de paraformaldehído. Una vez lavados se procedió a los ensayos de microscopía.

Para los espermatozoides capacitados se tomaron 100 μL de espermatozoides obtenidos por swim-up y se diluyeron en otros 100 μL de medio TYH modificado capacitante obteniendo un volumen final de 200 μL . A partir de este punto los espermatozoides fueron marcados con el mismo protocolo que se utilizó para los espermatozoides capacitados, con la excepción de que en vez de utilizar medio no capacitante se utilizó el medio capacitante.

6.2.4 Protocolo de iluminación en microscopio Confocal de disco giratorio 3I Marianas Yokogawa

Para el muestreo se utilizó el microscopio confocal de disco giratorio 3I Marianas Yokogawa. Se usó un objetivo 100X O/1.4 y una cámara EMCCD Andor Ixon de 512x512 píxeles.

Se utilizaron dos protocolos de iluminación. El primer protocolo consistió en la iluminación de la muestra con la línea de láser 488 nm con una potencia de 50 mW. La potencia de iluminación de la muestra se midió con un potenciómetro de la compañía THORLABS (https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=4216) colocando el sensor del potenciómetro sobre el objetivo del microscopio para registrar la potencia del láser que incide directamente sobre la muestra.

El segundo protocolo consistió en la iluminación simultánea con las líneas de láser 405 nm y 488 nm. El láser 488 nm se usó con una potencia de 50 mW y el láser 405 nm con una potencia del 10 mW.

Además, se caracterizó el comportamiento de la fluorescencia de Dronpa en diferentes medios de muestreo que disminuyen el oxígeno disuelto en el medio y de esta manera disminuir el fotoblanqueo de Dronpa por oxidación. Esto se realizó para determinar con cuál medio de muestreo se obtiene una menor tasa de fotoblanqueo que nos permitiera extender el tiempo en el cual se puede hacer la adquisición de imágenes. Se utilizaron los medios de muestreo GLOX, POX, Rutina, MEA-MB y PPD (para-fenilen-diamina) cuyo mecanismo de acción se describe en la sección **Apéndice A.3 del Capítulo 11**.

Para los primeros 4 medios de muestreo se utilizó iluminación estroboscópica con un tiempo de exposición de 100 milisegundos y un tiempo de adquisición de 120 milisegundos.

Para el muestreo con los buffers PPD (para-fenilen-diamina) y Rutina se utilizó iluminación continua con un tiempo de exposición de 50 milisegundos y un tiempo de adquisición de 70 milisegundos. En la sección de Resultados y Discusión de resultados se describe con mayor detalle por qué razón se utilizaron diferentes modalidades de iluminación.

6.2.5 Medición de la constante de tiempo de decaimiento de la fluorescencia de Dronpa

A partir de las series de tiempo obtenidas de la sección anterior (6.13) se seleccionó la región de interés como se muestra en la **Figura 11 B** (línea amarilla punteada) y se obtuvieron los valores del cambio de la intensidad de la fluorescencia a través del tiempo.

A los datos obtenidos se les ajustó la **Ecuación 1** (Lakowicz, 2013) como se muestra en la **Figura 11 C**.

$$y = a \cdot \exp(-bx) + c \quad (\text{Ecuación 1})$$

A partir de la **Ecuación 1** se calculó la constante de tiempo de decaimiento de la fluorescencia K_t (**Ecuación 2**; Lakowicz, 2013).

$$K_t = 1 / b \quad (\text{Ecuación 2})$$

El cálculo de cada K_t para cada medio de muestreo se realizó en 50 células correspondientes a 5 ratones diferentes.

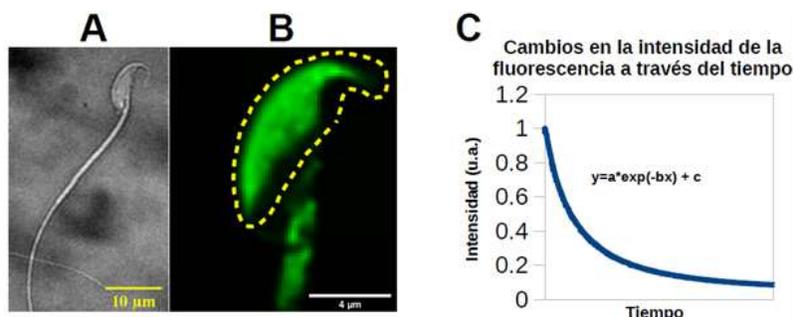


Figura 11. Cálculo de la constante de tiempo de decaimiento de la fluorescencia. **A**, micrografía de campo claro de un espermatozoide de ratón; **B**, espermatozoide marcado con Dronpa-D4 visto por microscopía confocal y selección de región de interés para análisis, línea punteada amarilla; **C**, gráfica del comportamiento de la fluorescencia de la región de interés de B a través del tiempo y ajuste de ecuación monoexponencial para cálculo de $K_t = 1 / b$ (Lakowicz, 2013).

6.2.6 Reconstrucción de imágenes de súper-resolución por el método de SRRF (super-resolution radial fluctuations)

El software de SRRF se encuentra como un plugin de ImageJ de acceso libre. Para mayor detalle sobre el funcionamiento del algoritmo de SRRF revisar el **Apéndice A6**. Su interfaz se muestra en la siguiente figura:

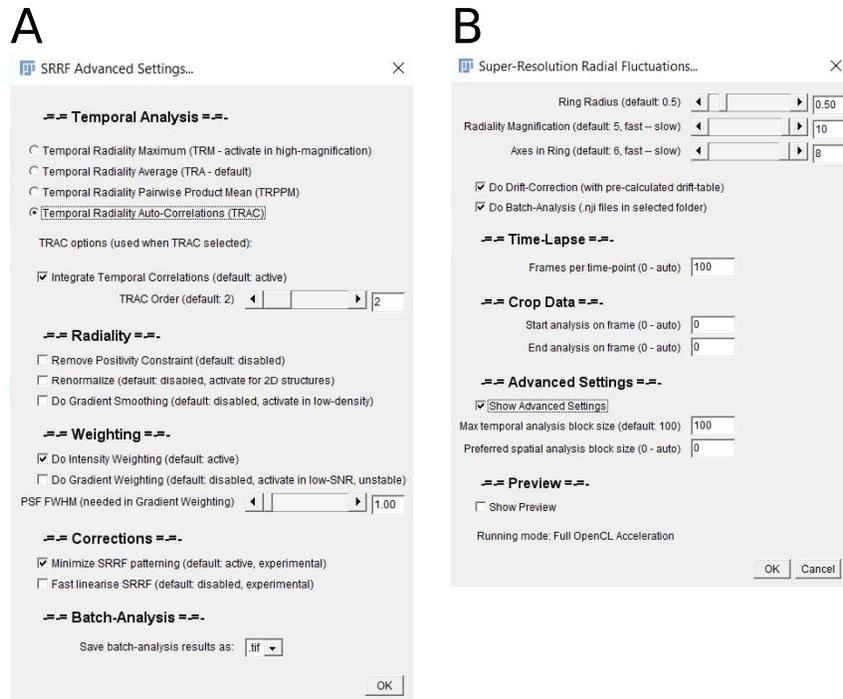


Figura 12. Interfaz gráfica del algoritmo de SRRF. A, interfaz principal del software. **B**, interfaz de ajustes avanzados. Los parámetros seleccionados que se observan en esta imagen son los utilizados para la reconstrucción de las imágenes de súper-resolución.

Para la reconstrucción de las imágenes de súper-resolución con el algoritmo de SRRF se utilizaron secuencias de 300 imágenes adquiridas mediante microscopía confocal (sección 6.13).

Los parámetros ingresados al algoritmo son los que se muestran en la **Figura 12**. También se utilizó el corrector de movimiento que se incluye en el software y se usaron los parámetros que aparecen en la **Figura 13**, que corresponde a la interfaz del algoritmo de corrección de movimiento:

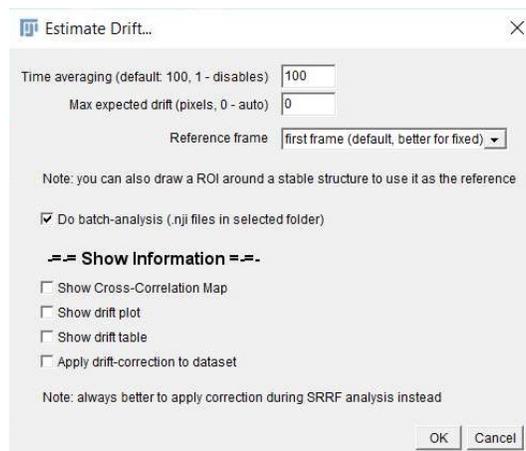


Figura 13. Interfaz gráfica del algoritmo de Corrección del movimiento.

6.3 ANÁLISIS DE IMÁGENES DE SÚPER RESOLUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DOMINIOS ENRIQUECIDOS EN COLESTEROL

6.3.1 Segmentación de imágenes y análisis de las dimensiones de los nano-dominios

Las dimensiones de los dominios de colesterol observados en las imágenes SRRF se calcularon mediante un método de segmentación basado en el algoritmo de “**Hk-means**”(Análisis del **H**istograma por **K-means**) implementado en el software de análisis de imágenes Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org/>).

Dicho algoritmo realiza una umbralización de N clases (número de objetos detectados) basándose en una clasificación por K-means del histograma de la imagen, extrayendo posteriormente la información de los objetos detectados de manera ascendente utilizando el área mínima y máxima definida por el usuario.

En nuestro caso se decidió utilizar un área mínima de **35 píxeles** y un área máxima de **350 píxeles**, equivalente a 560 nm^2 y 5.6 um^2 respectivamente, tomando en cuenta que el pixel tiene dimensiones x,y de $16 \times 16 \text{ nm}$. Estas medidas se seleccionaron conforme a valores de radios de nano-dominios de membrana reportados en estudios previos, desde 15 nm hasta 50 nm aproximadamente (Goldman, Andrews & Bray, 2004; Fujita et al., 2007; Lagache, Lang, Sauvonnet & Olivo-Marin, 2013; Rahbek-Clemmensen et al., 2017).

Mediante la segmentación de las imágenes SRRF con el método de Hk means se obtuvo la imagen umbralizada (**Figura 14**), al igual que el valor del área de cada dominio de colesterol y las coordenadas XY de su centro. Esto se realizó para todas las imágenes obtenidas en ambas condiciones (espermatozoides Capacitados y No capacitados).

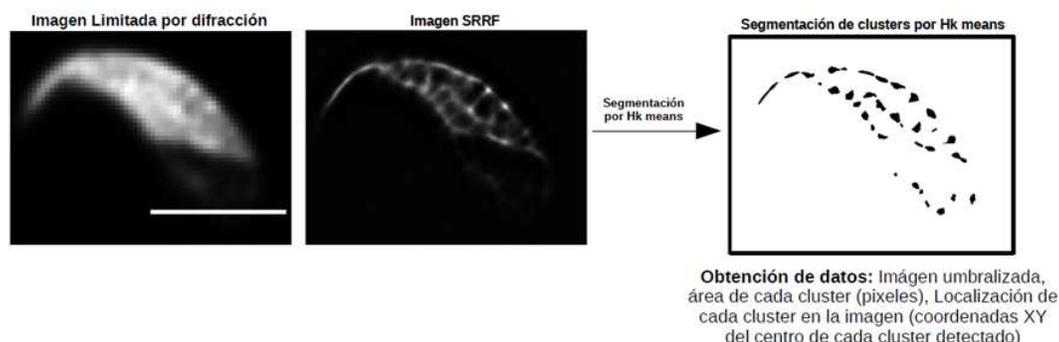


Figura 14. Segmentación de imagen por medio de Hk means y obtención de las características de cada cluster detectado. La imagen mostrada corresponde a un ejemplo representativo de un espermatozoide no capacitado marcado con Dronpa-D4. Izquierda, imagen limitada por difracción obtenida mediante microscopía confocal de disco giratorio; La barra de escala mide $4 \mu\text{m}$. Centro, imagen de súper-resolución obtenida on el angoritmo de SRRF; la escala de la imagen es la misma que en la del panel izquierdo. Derecho,

segmentación de a imagen SRRF a partir de la cual se obtuvo las características de los objetos (Clusters) detectados.

6.3.2 Ajuste de elipse y análisis de la distribución de los nano-dominios en la cabeza del espermatozoide

El análisis cuantitativo de la distribución de los nano-dominios de colesterol en la cabeza del espermatozoide se realizó mediante el ajuste de una elipse a la imagen de la cabeza (Figura 15) y el cálculo de la distancia entre cada nano-dominio detectado y el centro de la elipse ajustada.

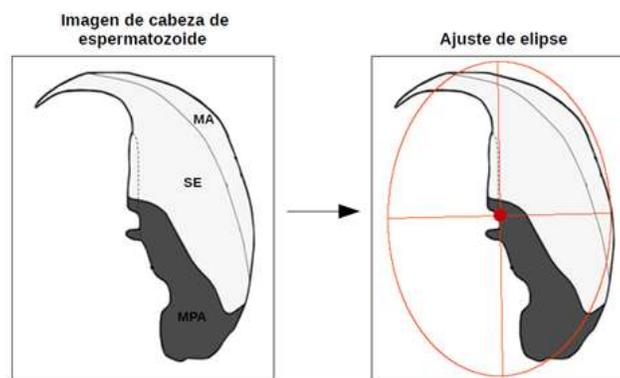


Figura 15. Esquema del ajuste de elipse a la imagen de una cabeza de espermatozoide de ratón para el análisis de la distribución espacial de los dominios de colesterol. El centro de la elipse se encuentra señalado con un punto rojo en la imagen derecha. Imagen obtenida y modificada de Nuria Medarde *et al* (2013).

El ajuste de la elipse a los datos se hizo utilizando la función “Fit_ellipse” (Ohad Gal, 2020) implementada en MATLAB sobre las imágenes obtenidas por la segmentación con el algoritmo de “Hk-means”. Dado que las cabezas de los espermatozoides tienen prácticamente las mismas dimensiones, el centro de la elipse ajustada a cada imagen se localizó en la misma región de la cabeza (Figura 16 panel izquierdo).

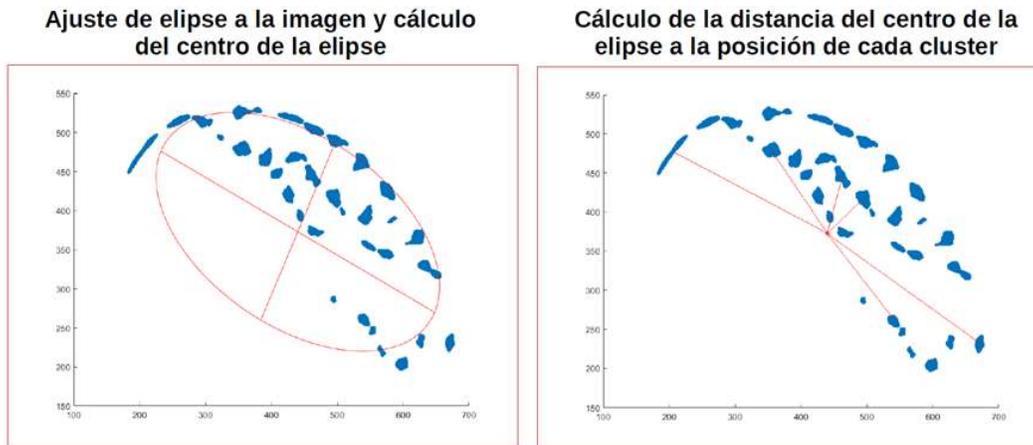


Figura 16. Ajuste de elipse a las imágenes segmentadas por Hk-means y cálculo de la distancia de cada dominio de colesterol respecto al centro de la elipse. Esta imagen corresponde a la visualización de la transformación a coordenadas XY de la imagen obtenida por segmentación hK means para el ajuste de la elipse. El eje vertical corresponde a los valores de Y y el eje horizontal corresponde a los valores de X. En el panel izquierdo se muestra la elipse ajustada a la imagen. En el panel derecho se muestra la distancia de 6 clusters (denotada por una línea roja) al centro de la elipse (marcada con un punto rojo).

Una vez ajustada la elipse a la imagen se obtuvo su centro y se calculó la distancia que hay entre cada dominio Q de colesterol al centro de la elipse P (**Figura 13**, panel derecho) mediante la ecuación de la distancia euclidiana:

$$d_E(Q, P) = \sqrt{(Qx - Px)^2 + (Qy - Py)^2}$$

En donde (Px, Py) corresponde a las coordenadas del centro del nano-dominio de colesterol y (Qx, Qy) corresponde a las coordenadas del centro de la elipse.

La significancia estadística de la diferencia en la distribución de las distancias observadas entre dos condiciones diferentes (Capacitados vs No Capacitados) se calculó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras (<https://www.rdocumentation.org/packages/dgof/versions/1.2/topics/ks.test>).

Esta prueba se utiliza para determinar si dos muestras provienen de la misma distribución, comparando su distribución de frecuencia acumulada (la probabilidad de encontrar un valor dado en el conjunto muestral). Esta es una prueba no paramétrica que se aplica a datos que no tienen una distribución normal (de forma gaussiana).

A grandes rasgos, esta prueba compara las gráficas de distribución de frecuencia acumulada midiendo la distancia promedio que hay entre las gráficas de ambas muestras, de tal manera que si la distancia es cero o casi cero (con una significancia estadística menor a 0,05) se

concluye que ambas muestras provienen de la misma distribución. En caso contrario, si la distancia es distinta a cero (con una significancia estadística menor a 0,05) se concluye que ambas muestras provienen distribuciones distintas.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 OBTENCIÓN DE LA SONDA DE COLESTEROL DRONPA-D4

7.1.1 Amplificación del plásmido pET28-Dronpa-D4 en *E. coli* DH5a

El plásmido pET28-Dronpa-D4 almacenado en el papel filtro (obtenido directamente de los creadores de esta sonda; Mizuno et al.,2011) se eluyó en buffer TE 1X y posteriormente se usó en la transformación de bacterias *E. coli* DH5a para su amplificación con el objetivo de aumentar la cantidad de plásmidos en almacén para su uso en posterior. La cantidad de plásmido recuperado fue de 39 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Para corroborar la identidad de los plásmidos recuperados se realizó primero un ensayo de restricción con doble digestión y electroforesis en gel de agarosa. Para el ensayo de restricción se utilizaron las enzimas de restricción BglII y XhoI. Según la información del mapa de restricción del plásmido (Revisar **Apéndice A.1**) se deben de obtener las siguientes bandas con el ensayo de doble digestión:

Tamaño total de pET28-Dronpa-D4 = 6307 pb

Bandas obtenidas con ensayo de doble restricción = 5126 pb y 1181 pb

Como se puede observar en la **Figura 17** los resultados concuerdan con lo predicho, en donde se pueden observar las dos bandas esperadas en los carriles correspondientes al plásmido con la doble digestión (2, 4, 6 y 8) y al plásmido no linearizado (1, 3, 5 y 7).

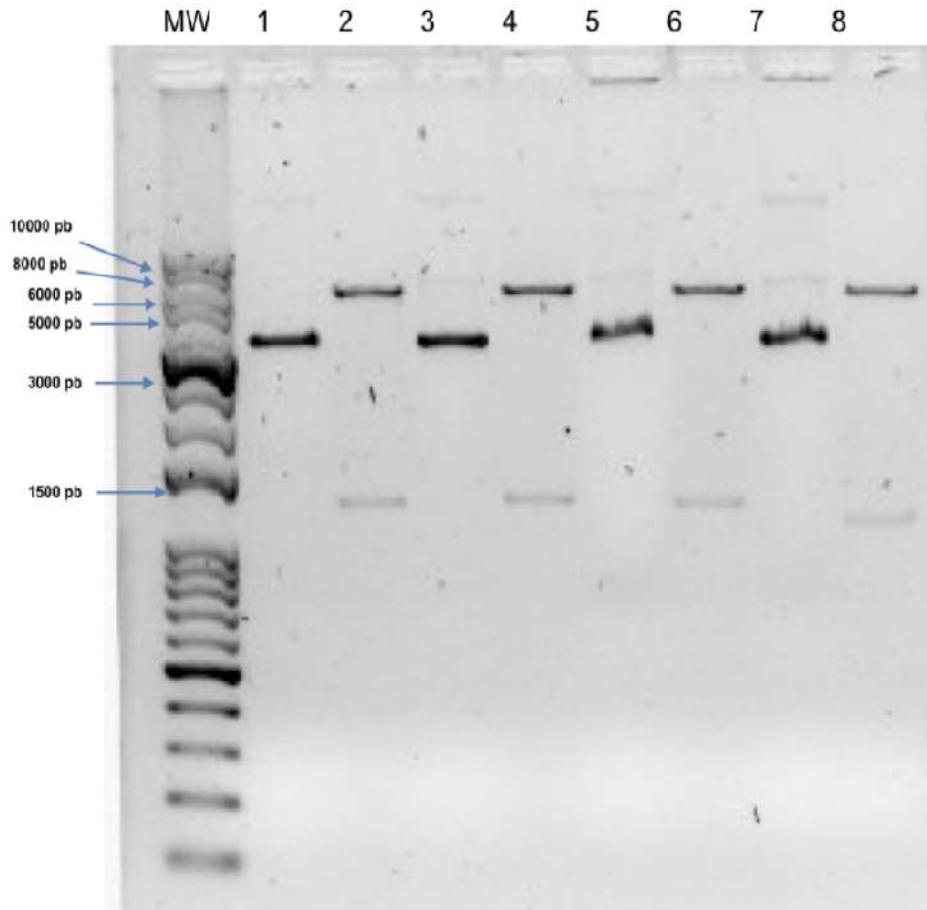


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de pET28-Dronpa-D4. El pozo 1, 3, 5 y 7 corresponde a pET28-Dronpa-D4 sin digerir, el cual se observa un peso molecular aparente de 4500 pb aproximadamente que podría deberse al súper enrollamiento del plásmido. El pozo 2, 4, 6 y 8 corresponde a pET28-Dronpa-D4 digerido con BglII y XhoI; se observan las dos bandas predichas por el mapa de restricción.

Posteriormente se corroboró la identidad del plásmido mediante la secuenciación de la región con la secuencia de Dronpa-D4. Se obtuvo una secuencia de 1148 pb (**Apéndice A.1.2**). El alineamiento de esta secuencia (Resultado de secuenciación en la **figura 18**) con la reportada por los creadores de la sonda (Secuencia original en la **figura 18**; Mizuno *et al.*, 2011) muestra una secuencia idéntica en la correspondiente al gen de Dronpa (**Figura 18**). Aunque se observaron algunos desapareamientos y huecos en la alineación en la secuencia correspondiente al dominio 4 (D4) de la toxina perfringolisina-O los ensayos mostrados en las siguientes secciones demostraron que mantuvo su función en cuanto a su especificidad por colesterol. Por lo cual podemos concluir que contamos con plásmidos que contienen codificada una versión funcional de Dronpa-D4.

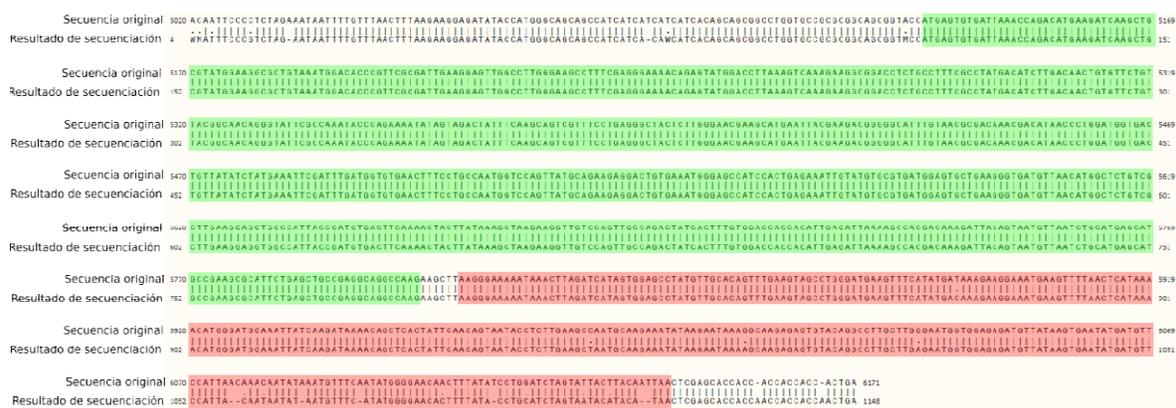


Figura 18. Alineamiento de la secuencia de Dronpa-D4 obtenida a partir del plásmido purificado (Resultado de secuenciación) contra la reportada por Mizuno et al. (Secuencia original). La sección sombreada en color verde señala la secuencia correspondiente a Dronpa y la sombreada en color rojo señala a la secuencia del dominio 4 (D4) de la toxina perfringolisina-O. La longitud de la secuencia que se muestra en esta figura está determinada por la longitud de la secuencia obtenida por secuenciación (Resultado de secuenciación). Las letras entre ambas secuencias unidas por una línea (|) corresponden a los nucleótidos emparejados idénticamente, los nucleótidos unidos por un punto (·) corresponden a los que no se emparejaron y los espacios corresponden a los huecos detectados.

7.1.2 Expresión y purificación de Dronpa-D4 en *E. coli* cepa BL21

La expresión de Dronpa-D4 se indujo en bacterias *E. Coli* BL21 y se purificó como se menciona en materiales métodos.

El peso molecular de Dronpa-D4 es de 38.32 kD. Posterior a la lisis de las bacterias por sonicación y su centrifugación para la separación del contenido citoplásmico se pudo observar la presencia de Dronpa-D4 el sobrenadante (**Figura 19** carril “lisado” flecha azul) a partir del cual se purificó. Además, se observó una cantidad considerable de Dronpa-D4 en la porción del pellet (**Figura 19** carril “Pellet” flecha amarilla) el cual fue descartado ya que corresponde a la fracción de Dronpa-D4 que pudo haber sido exportada a cuerpos de inclusión en la bacteria o a la pared celular.

La recuperación de Dronpa-D4 se obtuvo con lavados de imidazol de 250, 300 y 500 mM (**Figura 19** flechas rojas).

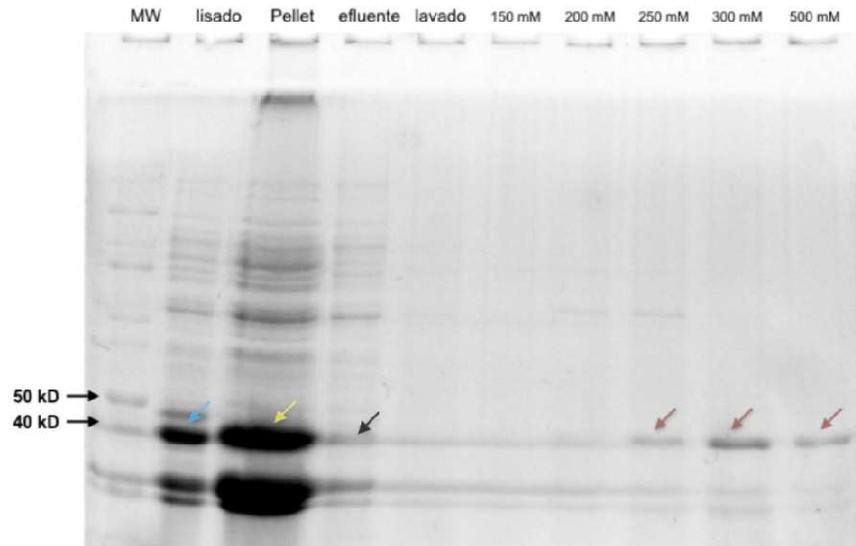


Figura 19. Electroforesis en gel de fracciones recuperadas durante la purificación de la sonda Dronpa-D4. El carril MW corresponde al carril del marcador del peso molecular, se señalan dos bandas que corresponden a las referencias de 40 y 50 kD. El carril **lisado** corresponde a la fracción de proteínas encontradas en el sobrenadante obtenido después de la centrifugación de las bacterias lisadas y el carril **pellet** corresponde a la fracción de proteínas encontradas en el precipitado. El carril **efluente** corresponde a la porción del sobrenadante recuperado después de ser pasado a través de la columna de níquel. En estos tres carriles se observa la presencia de Dronpa-D4 marcados con flechas azul, amarilla y negra. El carril **lavado** corresponde a lo recuperado del lavado de la columna de níquel; se aprecia que la presencia de proteínas es casi nula, lo que podría indicar que la mayoría de las proteínas que no son Dronpa-D4 no se asociaron a la columna y fueron descartadas en la fracción efluente. En los carriles **150 mM** y **200 mM** se aprecia lo mismo que en el carril lavado, lo que podría indicar que la porción de Dronpa-D4 necesita una mayor concentración de imidazol para disociarse de la columna de níquel. En los carriles **250, 300 y 500 mM** se observa la presencia de Dronpa-D4, siendo estas fracciones en donde se recuperó la sonda purificada.

Las fracciones recuperadas (250, 300 y 500 mM de Imidazol) fueron lavadas mediante diálisis por centrifugación con tubos Vivaspín de 20 kD y fueron concentradas hasta obtener un volumen final de 2 ml. La cuantificación de la concentración obtenida se realizó por la técnica de Bradford obteniendo una concentración final de 920 µg/ml.

Finalmente se realizó una electroforesis en gel de la muestra concentrada (**Figura 20**) utilizando 3.8 µg de Dronpa-D4. Aunque se observan remanentes de otras proteínas presentes en la purificación, la proporción de Dronpa-D4 es mayor (**Figura 20** carril “D4” flecha roja). Una vez obtenida la sonda Dronpa-D4 se procedió a realizar ensayos en espermatozoides de ratón.

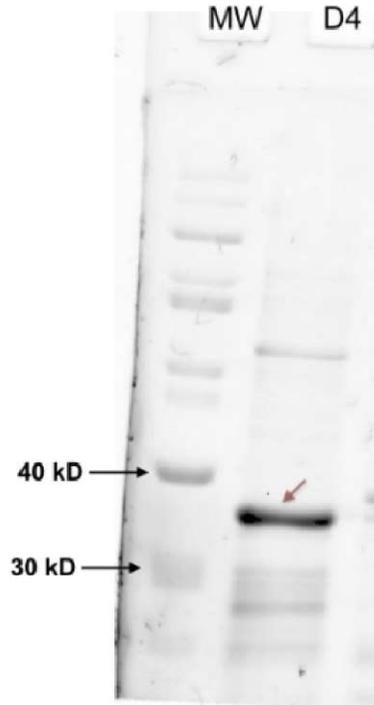


Figura 20. Electroforesis en gel de acrilamida al 10% de la purificación de Dronpa-D4. LA electroforesis se realizó en condiciones desnaturizantes. El peso molecular de Dronpa-D4 es de 38 kD, la banda correspondiente a la sonda está señalada con una flecha roja sobre el carril D4.

7.2 EL MARCAJE DE DRONPA-D4 EN LOS ESPERMATOZOIDES DE RATÓN ES ESPECÍFICO DE COLESTEROL Y SU PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN ES SIMILAR AL REPORTADO EN ESTUDIOS PREVIOS

7.2.1 Comparación del patrón de distribución de colesterol marcado con Dronpa-D4 en espermatozoides no capacitados de ratón con el patrón de distribución reportado en estudios previos

La adquisición de imágenes se realizó mediante microscopía confocal de disco giratorio en el microscopio Marianas 3I Yokogawa del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (lnma.unam.mx/wp/equipo.php) con los protocolos de adquisición mencionados en materiales y métodos.

Los primeros ensayos se hicieron en espermatozoides de ratón No Capacitados (incubados en medio TYH no capacitante). En este análisis el criterio utilizado para clasificar el patrón de distribución de colesterol se basó en la región o regiones de la cabeza en las que se observó la mayor presencia de señal de fluorescencia asociada a colesterol; estas regiones se describen en la **figura 21** panel **A**. El patrón de distribución de colesterol marcado con Dronpa-D4 (**Figura 21 C**) es similar al de espermatozoides de ratón no capacitados reportados en estudios previos en los cuales se utilizó un marcador de colesterol distinto a Dronpa-D4 (**Figura 21 B**). En dicho patrón la distribución se observa en la región del segmento ecuatorial y de la membrana acrosomal (SE y MA en la **Figura 21 A**). Con base en estas observaciones se tomó el patrón de tinción observado en las **Figura 21 C** como referencia para espermatozoides “No Capacitados” para su selección en los análisis siguientes.

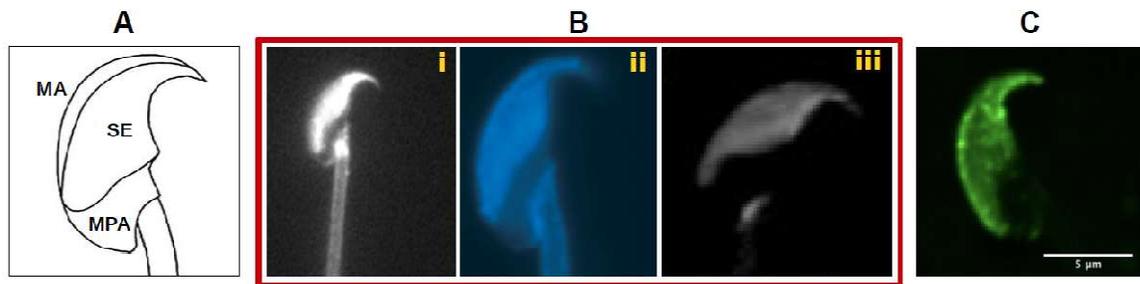


Figura 21. Distribución de colesterol en espermatozoides no capacitados de ratón reportados en estudios anteriores. **A**, Dominios de la membrana de la cabeza; MA, membrana acrosomal; SE, segmento ecuatorial; MPA, membrana post-acrosomal. **B**, distribución de colesterol marcado con Filipina en espermatozoides de ratón reportados previamente por distintos grupos de investigación (**i**: Travis & Kopf, 2002; **ii**: Selvaraj et al., 2006; **iii**: Asano et al., 2010). **C**, imagen representativa de espermatozoide de ratón “No Capacitado” fijado con paraformaldehído (4%, pH 7.4) marcado con Dronpa-D4; N = 5 ratones y 15 réplicas por cada ratón; la barra de escala mide 5 µm.

7.2.2 Control de autofluorescencia y especificidad de marcaje de Dronpa-D4 en el espermatozoide de ratón

Se realizó un control para descartar que la fluorescencia observada fuera producto de la auto-fluorescencia intrínseca de las células o a un efecto del tratamiento de las células como la fijación con paraformaldehído o un efecto de los medios de muestreo sobre las células. En este experimento los espermatozoides se trataron con el mismo procedimiento preparativo pero sin agregar la sonda Dronpa-D4 al medio de incubación. En la **Figura 22** se muestra una micrografía de campo claro (**Figura 22 Izquierda**) de un espermatozoide de ratón y una imagen de microscopía confocal con el protocolo de iluminación 2 (488 nm +

405 nm, **Figura 22** Derecha). Se observó en todos los casos la ausencia total de fluorescencia en la cabeza del espermatozoide y una escasa señal de auto-fluorescencia en la pieza media del flagelo, que posiblemente se debe a la generación de autofluorescencia por las mitocondrias como resultado de su iluminación con luz de 405nm (revisado en Monici, 2005). Con esto se puede concluir que la señal observada en los espermatozoides marcados con Dronpa-D4 (mostrados en la **Figura 21 C y 22**) es, en efecto, fluorescencia emitida por Dronpa-D4.

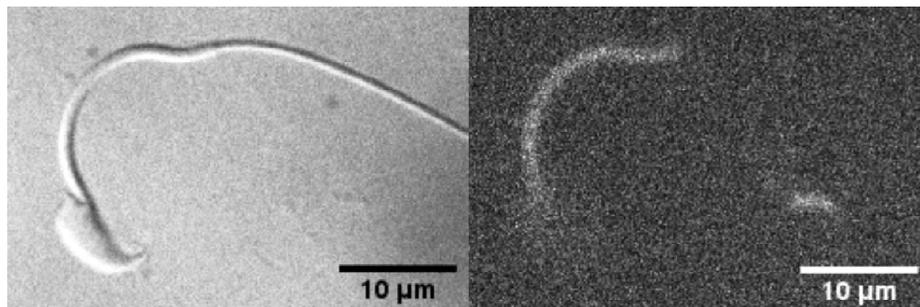


Figura 22. Control de autofluorescencia del espermatozoide de ratón. Izquierda, micrografía de campo claro espermatozoides de ratón. Derecha, micrografía de microscopía confocal de la misma región que en A con el protocolo de iluminación 2 (488 nm + 405 nm).

Para demostrar la especificidad de Dronpa-D4 al colesterol en los espermatozoides se realizaron una serie de experimentos utilizando un medio de incubación con β -Ciclodextrina (Cloudy et al., 1991). Las Ciclodextrinas son moléculas compuestas por oligosacáridos cíclicos que tienen una estructura molecular en forma de toroide (**Figura 23**). En esta molécula la región interna del toroide es hidrofóbica en comparación con la región externa en donde los grupos -OH de los monosacáridos la hacen una región hidrofílica. Debido a su hidrofobicidad, el centro del toroide es capaz de albergar moléculas hidrofóbicas. El efecto de la ciclodextrina sobre la membrana plasmática es la extracción de lípidos, mayormente de colesterol (Cloudy et al., 1991). En estudios sobre espermatozoides se ha utilizado la ciclodextrina como análogo a la albúmina para inducir la extracción de colesterol de la membrana y para simular las condiciones del medio capacitante (van Gestel, Helms, Brouwers & Gadella, 2005).

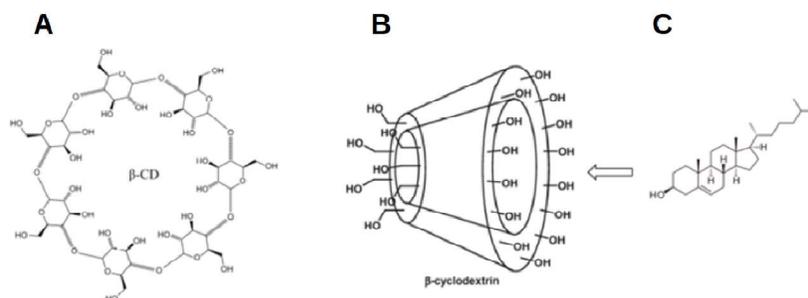


Figura 23. Estructura y geometría molecular de β -Ciclodextrina. **A**, estructura molecular de β -ciclodextrina compuesta por 7 monosacáridos enlazados de forma cíclica. **B**, geometría molecular de ciclodextrina en forma de toroide en donde la cavidad del toroide corresponde a la región hidrofóbica en donde se acomodan otras moléculas hidrofóbicas, en este caso el colesterol **C**.

En este experimento la mitad de los espermatozoides obtenidos de un ratón fueron separados en tubos eppendorf diferentes para su incubación en medio TYH modificado no capacitante con ciclodextrina a una concentración de 3 mM durante 1 hora. Posteriormente se procedió al marcaje con la sonda Dronpa-D4 como se menciona en la sección de materiales y métodos. Se observó que en los espermatozoides tratados con ciclodextrina el marcaje de Drona-D4 disminuyó drásticamente en comparación con espermatozoides no tratados con ciclodextrina (**Figura 24 A y B**). El contraste de la **Figura 24 B** esta escalada a los valores de gris de la **Figura 24 A** en donde son mucho más altos que en **B**, por que pareciera no haber señal en **B**. Sin embargo, aunque la señal es muy escasa se puede apreciar de manera evidente en la imagen sin escalar (**Figura 25 A**); esto también se puede observar en el histograma de intensidades de ambas imágenes. En el Histograma de la **Figura 25 B** se observan los valores de gris de la **Figura 24 A** y en el Histograma de la **Figura 25 C** se observan los valores de gris de la **Figura 24 B**.

Estos resultados indican que β -Ciclodextrina extrajo una gran porción del colesterol de la membrana, lo cual se ha observado en estudios previos en los que se utilizó la misma concentración de β -Ciclodextrina (3 mM) y un tiempo de incubación similar (1 – 1.5 horas; Visconti et al., 1999). Con estos resultados se concluye que Drona-D4 se une al colesterol de manera específica en la membrana de los espermatozoides.

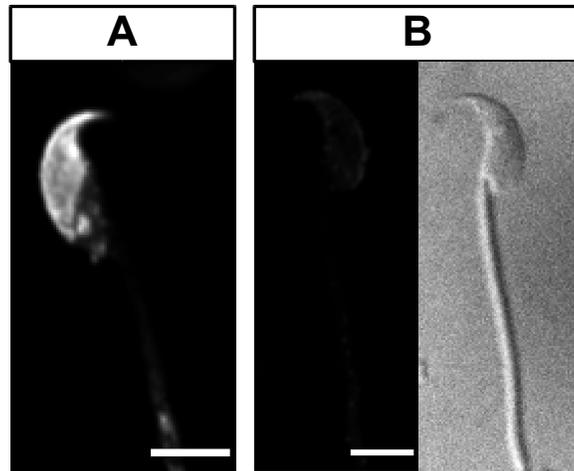


Figura 24. Espermatozoides tratados con β -Ciclodextrina marcados con Dronpa-D4. La imagen **A** corresponde a un espermatozoide No Capacitado con un patrón de tinción de Dronpa-D4 similar al representado en el panel A de la **Figura 19**. La imagen **B** corresponde al grupo de espermatozoides tratados con ciclodextrina en donde se aprecia que el marcaje con Dronpa-D4 se redujo de manera significativa en comparación con los espermatozoides no tratados (panel A). Barra de escala = 5 μ m. Para este control se utilizaron 30 espermatozoides de 4 ratones distintos.

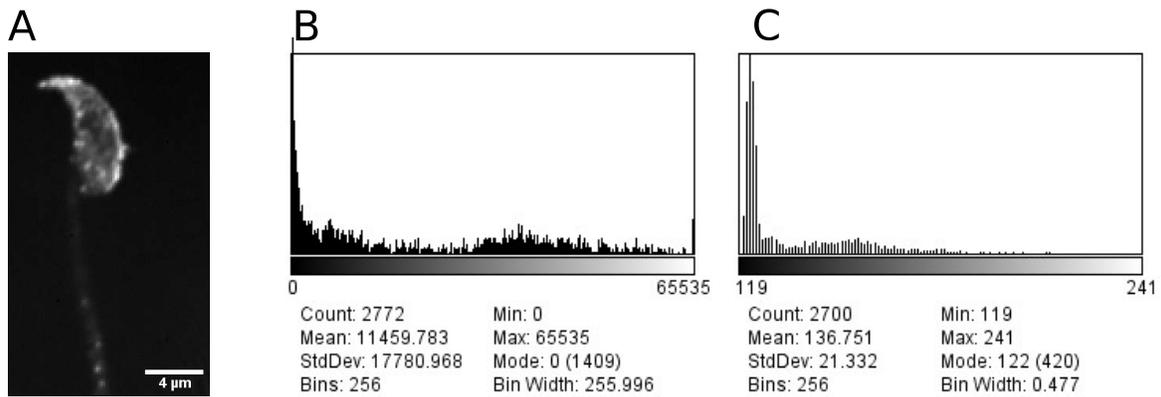


Figura 25. Señal de fluorescencia de Dronpa-D4 detectada en espermatozoides no capacitados y en espermatozoides tratados con β -Ciclodextrina. A, misma imagen que en la **Figura 24 B** pero sin escalar su histograma de valores de gris a los niveles de del histograma de la **Figura 24 A**. B, Histograma de valores de gris de la **Figura 24 A**. C, Histograma de valores de gris de la **Figura 24 B**.

7.3 CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA DE DRONPA-D4 EN DIFERENTES MEDIOS DE MUESTREO

Dronpa es una proteína fluorescente fotoactivable. El fluorocromo de Dronpa puede encontrarse en dos estados: activado (puede emitir fluorescencia) y oscuro (no emite fluorescencia) y su permanencia en uno u otro estado depende de la longitud de onda con el que es iluminado. Cuando el fluorocromo en el estado activado se excita con luz de 488 nm puede regresar a su estado basal activo emitiendo fluorescencia o puede entrar a un estado oscuro sin emitir fluorescencia (foto-apagamiento). A partir de dicho estado oscuro puede retornar a su estado activado mediante su excitación con luz de 405 nm. El efecto de la luz de 405 nm sobre Dronpa se le denomina foto-activación (revisar sección A.2 del capítulo 11). Estas características permiten modular la transición entre los estados activados-oscuros de Dronpa mediante protocolos de iluminación utilizando las longitudes de onda 488 nm y 405 nm.

Con base en lo mencionado anteriormente se utilizaron dos protocolos de iluminación (**Tabla 1**) para determinar el comportamiento de la fluorescencia de Dronpa-D4 marcando colesterol en la membrana plasmática de espermatozoides de ratón.

Nombre del Protocolo	Longitudes de onda y potencia de iluminación
Protocolo 1	488 nm (50 mW)
Protocolo 2	488 nm (50 mW) + 405 nm (10 mW)

Tabla 1. Protocolos de iluminación en espermatozoides marcados con Dronpa-D4. Los valores de las potencias de iluminación se midieron con ayuda de un potenciómetro como se menciona en la sección 6.2.4 del capítulo 6.

En el **protocolo 1** se induce la emisión de fluorescencia y el foto-apagamiento de Dronpa. En el **protocolo 2** se induce la emisión de fluorescencia, su foto-apagamiento y la foto-activación.

Se comparó el efecto de los protocolos de iluminación sobre la emisión de Dronpa-D4 mediante el cambio de la intensidad de su fluorescencia a través del tiempo observado en cada protocolo, comparando el tiempo medio de decaimiento de la fluorescencia. Esto se realizó en espermatozoides fijados y se utilizó PBS 1X como medio de muestreo (**Figura 26**).

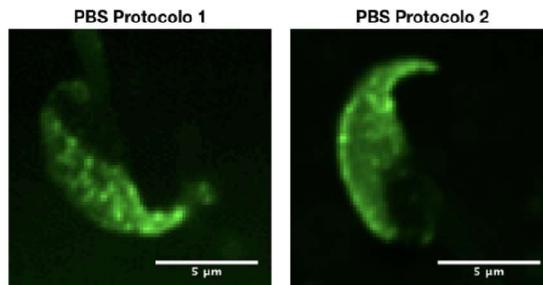
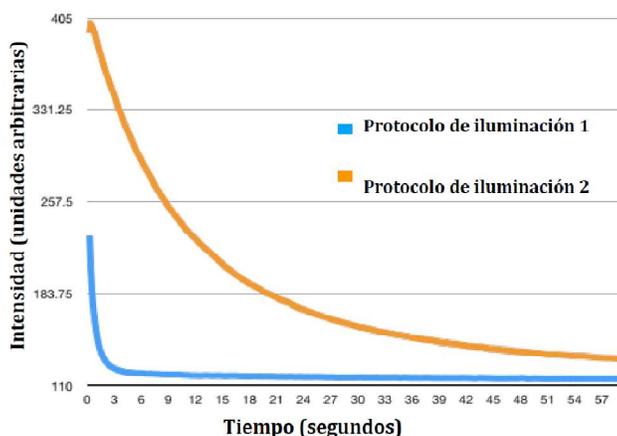


Figura 26. Patrón de tinción de espermatozoides de ratón marcados con Dronpa-D4. El protocolo 1 corresponde al muestreo hecho solo con luz 488 nm. El protocolo 2 corresponde al muestreo hecho de iluminación simultánea con luz de 405 nm y con 488 nm. N = 3 ratones y 20 réplicas totales.

Como se observa en la **Gráfica 1** la intensidad de la fluorescencia decae exponencialmente a través del tiempo. A partir de estos datos se calculó la constante de tiempo de decaimiento de la fluorescencia mediante el ajuste de un modelo de ecuación mono-exponencial. El valor de R del ajuste del modelo a los datos fue siempre mayor a 0.9.



Gráfica 1 Decaimiento de la fluorescencia de Dronpa-D4 en PBS 1X pH. 7.4. Para cada curva se utilizaron 20 series de tiempo adquiridas a partir de 20 espermatozoides distintos. Se analizaron en total 40 espermatozoides (20 para el protocolo 1 y 20 para el protocolo 2) y se utilizaron en cada caso tres ratones diferentes.

Protocolo de iluminación	Tiempo medio de decaimiento de la fluorescencia
Protocolo 1	0.786 ± 0.4 segundos
Protocolo 2	11.876 ± 0.5 segundos

Tabla 2. Constantes de tiempo de decaimiento de la fluorescencia (K_t) de Dronpa-D4. Los valores del tiempo medio de la fluorescencia se calcularon a partir de las mediciones obtenidas en el punto anterior como se explica en la sección 6.2.14 de la metodología.

Como se puede observar el decaimiento de la fluorescencia es aproximadamente 15 veces más rápida cuando se utiliza el protocolo 1 que cuando se utiliza el protocolo 2 con un K_t de 0.7 y 11.8 segundos respectivamente (**Tabla 2**).

El valor del K_t en el caso del protocolo 1 corresponde a la constante de tiempo de foto-apagamiento de la fluorescencia de Dronpa-D4 (**Gráfica 1**, curva azul) ya que el decaimiento de la fluorescencia se debe principalmente a su entrada al estado oscuro (foto-apagamiento) por efecto de la iluminación con luz de 488 nm. En cambio, debido a que en el protocolo 2 se induce la foto-activación constante de Dronpa, la contribución al decaimiento de la fluorescencia se debe principalmente a la destrucción del fluoróforo por oxidación y no a su foto-apagamiento, por lo que en este caso la constante de tiempo del decaimiento de la fluorescencia corresponde a la constante de tiempo de fotoblanqueo de la fluorescencia (Habuchi et al., 2005).

Tomando en cuenta que el tiempo de exposición de la cámara para cada imagen fue de 120 milisegundos, la cantidad de imágenes adquiridas en 11.8 segundos (tiempo medio de fotoblanqueo de Dronpa en PBS) es de 98. Dado que en el presente trabajo se pretende implementar un método de súper-resolución de detección de molécula individual es necesario aumentar el número de imágenes obtenidas ya que estos métodos ocupan entre cientos a miles de imágenes para lograr reconstruir una imagen de súper-resolución.

Una forma de aumentar el número de imágenes es aumentando la tasa de adquisición de imágenes (imágenes por segundo). Sin embargo, esto puede afectar la relación S/R y en consecuencia la calidad de la reconstrucción en términos de la resolución final obtenida y de la capacidad de evitar añadir o quitar estructuras (artefactos) a la imagen final, como se menciona en la sección **A.6 RELACION SEÑAL-RUIDO DE UNA IMAGEN** (Thompson, Larson & Webb, 2002; Endesfelder & Heilemann, 2014).

Otra forma de aumentar el número de imágenes es incrementando el K_t de fotoblanqueo mediante el uso de medios de muestreo con componentes que disminuyan la concentración de O_2 disuelto en el medio o la neutralización de la especies reactivas de oxígeno para disminuir la tasa del fotoblanqueo por oxidación del fluoróforo.

En el presente estudio se utilizaron 4 medios de muestreo para disminuir la tasa del fotoblanqueo por oxidación del fluoróforo: GOC, POC, Rutina y MEA-MB (**Apéndice**

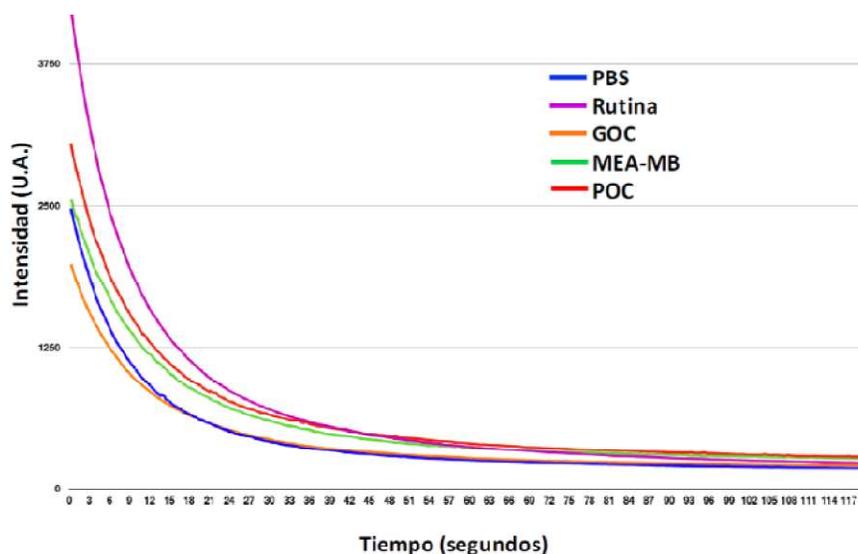
A.3; Rego et al., 2011; Swoboda et al., 2012; Bogdanov, Kudryavtseva & Lukyanov, 2012; Schäfer, van de Linde, Lehmann, Sauer & Doose, 2013).

7.3.1 Efecto de diferentes medios de muestreo sobre el decaimiento de la fluorescencia

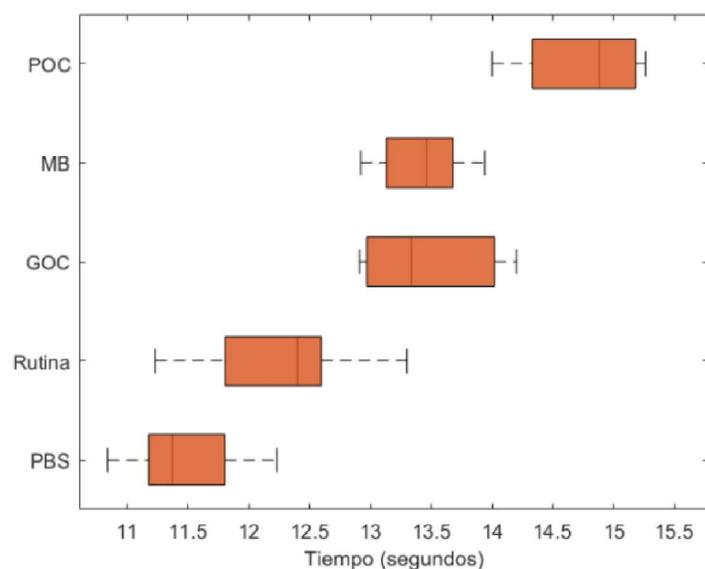
Con el objetivo de aumentar el K_t de fotoblanqueo de Dronpa-D4 se utilizaron 4 medios de muestreo: GOC, POC, Rutina y MEA-MB. La composición de cada medio y su mecanismo de acción se explica en la sección A.3 del capítulo 11.

Para caracterizar el efecto de los distintos medios de muestreo sobre Dronpa-D4 se comparó el K_t de fotoblanqueo observado para cada medio en espermatozoides marcados y fijados con PFA al 4% y pH 7.4, utilizando PBS con pH 7.4 como medio de muestreo sin efecto en la disminución de la concentración de oxígeno.

En todos los casos el decaimiento de la fluorescencia ocurrió de forma mono-exponencial (**Gráfica 2**). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en los valores del K_t de fotoblanqueo y en la intensidad inicial de la fluorescencia (**Gráfica 3** y **Tabla 3**).



Gráfica 2. Decaimiento de la fluorescencia de Dronpa-D4 en diferentes medios de muestreo. Para cada curva se utilizaron 20 series de tiempo adquiridas a partir de 20 espermatozoides distintos. Se analizaron en total 100 espermatozoides (20 por cada medio de muestreo). Los 20 espermatozoides usados para cada medio de muestreo se obtuvieron de tres ratones diferentes, utilizando en total 15 ratones.



Gráfica 3. Constante de tiempo (K_t) del fotoblanqueo de Dronpa-D4 en diferentes medios de muestreo. Cada gráfica de caja representa la distribución de los valores del K_t calculados para 20 espermatozoides pertenecientes a 3 ratones distintos para cada medio

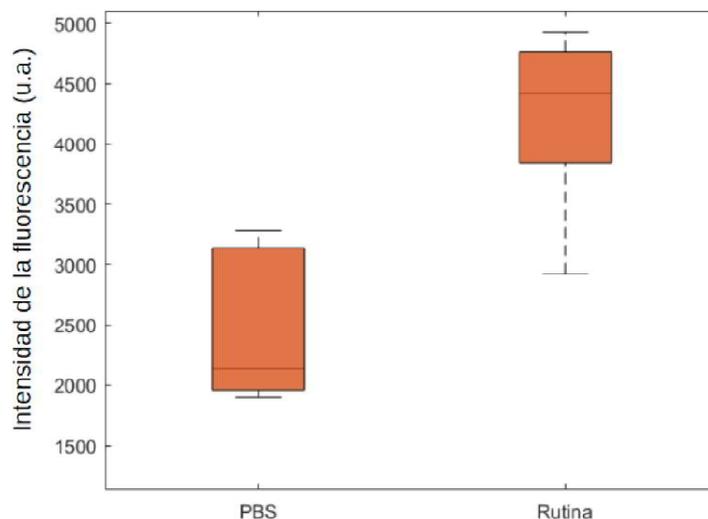
Medio de muestreo	Constante de tiempo K_t de fotoblanqueo de Dronpa-D4 (promedio \pm DS, n=3)	Significancia estadística de la diferencia de K_t respecto al K_t en PBS (p-value)
PBS	11.4 \pm 0.5 segundos	
Rutina	12.3 \pm 0.6 segundos	0.034
GOC	13.5 \pm 0.5 segundos	0.00019
MEA-MB	13.5 \pm 0.3 segundos	0.00019
POC	15 \pm 0.3 segundos	0.0000097

Tabla 3. Valores de la constante de tiempo (K_t) de fotoblanqueo de Dronpa-D4 con los distintos medios de muestreo. El valor de K_t para cada medio de muestreo se calculó a partir de 20 series de tiempo como las que se muestran en la **Gráfica 2**. El valor de p se calculó mediante una prueba t de student no pareada

El medio de muestreo en el que se observó un mayor valor de K_t en comparación con PBS fue el medio POC (15 segundos). También con los medios GOC y MEA-MB se observó un aumento del K_t (13.5 segundos para ambos), aunque fue menor que el del medio POC. El K_t observado en presencia del medio con Rutina (12.3 segundos) fue ligeramente mayor que el de PBS (11.4 segundos), pero la diferencia no fue significativa.

No obstante, se observó que Rutina provocó un aumento en la intensidad de la fluorescencia en comparación con PBS (**Gráfica 4**, p-value = 0.001) lo cual también se puede apreciar en la **Gráfica 2**, en donde con los mismos parámetros de iluminación la

intensidad inicial de la fluorescencia en presencia del medio con Rutina es mayor que en presencia de los demás medios de muestro.



Gráfica 4. Comparación de la intensidad de la fluorescencia basal inicial de Dronpa-D4 en medio de muestreo PBS y Rutina. En la gráfica se representa los valores la intensidad basal inicial de la fluorescencia de 20 espermatozoides pertenecientes a 3 ratones distintos. La significancia estadística se calculo mediante una prueba t de student no pareada.

7.3.2 Efecto de P-Fenilendiamina (PPD) sobre el decaimiento de la fluorescencia de Dronpa-D4

La elección de Dronpa se hizo tomando en cuenta que sus propiedades fotofísicas permiten su implementación en métodos de súper-resolución de detección de molécula individual, particularmente el método PALM.

Este método se basa en la detección de moléculas fluorescentes individuales por medio de la estimulación de la emisión discontinua de la fluorescencia (mejor conocida como parpadeo), de tal forma que en cada imagen se captura un conjunto pequeño de fluoróforos individuales fluorescentes los cuales se encuentran a una distancia mayor que el límite de resolución (distancia mayor a 200 nm). A su vez, esto permite determinar la localización subpíxelica para cada uno de los fluoróforos detectados en cada imagen que al final son sumadas para generar la imagen de súper resolución (sección A.5, capítulo 11).

En el caso de Dronpa la estimulación del parpadeo se hace mediante protocolos de iluminación secuencial con luz de 488 nm y 405 nm. Aunque el protocolo de iluminación 2 se diseñó para hacer parpadear a Dronpa solo se logró observar el decaimiento de la fluorescencia debido al fotoblanqueo de los fluoróforos (**figura 27 A, Gráfica 5 A**).

Como contraejemplo de lo observado en nuestros datos, en la **Figura 27 B** se muestra una adquisición de 500 imágenes de microtúbulos de células COS-7 marcadas con Alexa Fluor 647 (obtenidas en Ma, Xu & Liu, 2017) utilizadas en estudios de súper-resolución en donde se aprecia claramente el parpadeo de los fluoróforos. En esta adquisición, mediante la gráfica del cambio de la intensidad a través del tiempo (**Figura 27 C**), se puede observar la señal de un fluoróforo parpadeando (señalado en color amarillo, imágenes 1 – 500) en donde hay picos en la intensidad de la fluorescencia precedidos y seguidos por valores mínimos (**Figura 27 D**, resaltado con círculos rojos).

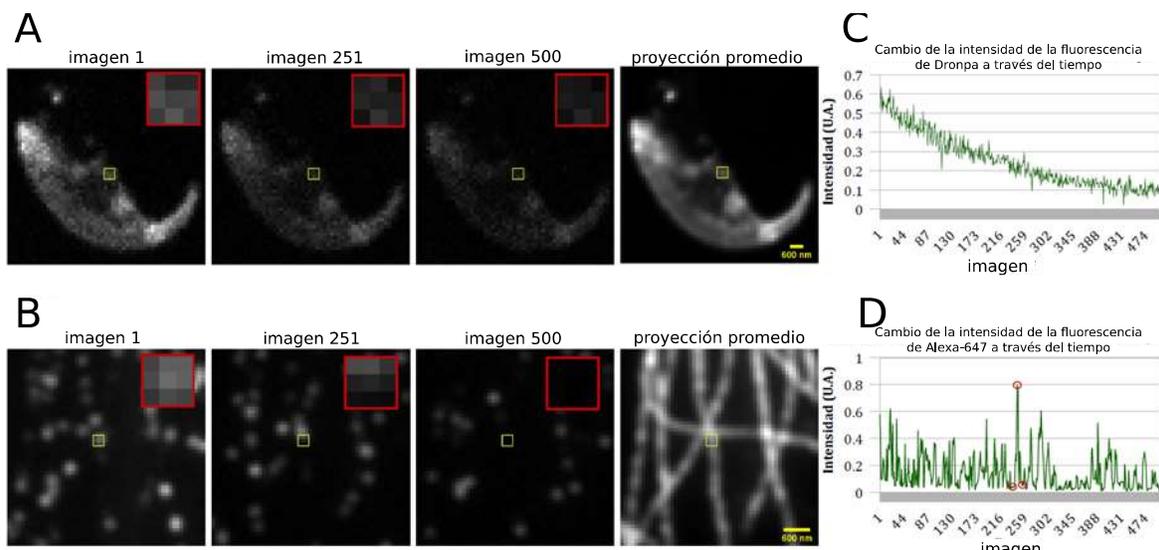
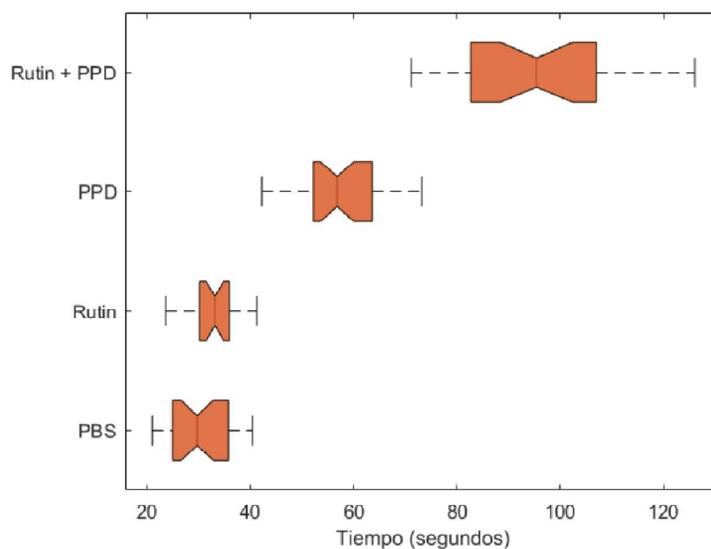


Figura 27. Cambios en la intensidad de la fluorescencia a través del tiempo de Dronpa-D4 y Alexa Fluor 647. **A**, serie de tiempo de 50 imágenes de un espermatozoide marcado con Dronpa-D4. En el cuadro amarillo está señalada la región que se usó para graficar los cambios en el tiempo de la intensidad de la fluorescencia (**C**), el cuadro rojo es la ampliación de la región señalada en amarillo. Esta región fue seleccionada por su poca densidad de fluoróforos para poder observar eventos de parpadeo. Tamaño de pixel=160nm. **B**, serie de tiempo de 50 frames de microtúbulos en células COS-7 marcadas con Alexa Fluor 647. Igual que en **A**, el cuadro amarillo señala la región usada para graficar los cambios en el tiempo de la intensidad de la fluorescencia de un fluoróforo (**D**), el cuadro rojo es la ampliación de la región señalada en amarillo. Tamaño de pixel=81nm. Los datos fueron obtenidos del material suplementario de Ma, Xu & Liu 2017.

No obstante, se ha reportado en la literatura un medio de muestreo compuesto por PPD (Rego et al., 2011) que provoca un aumento en el número de parpadeos de Dronpa. Por lo

cual se decidió probar el medio de muestreo PPD para tratar de inducir el parpadeo de Dronpa-D4 en los espermatozoides de ratón. Además, se utilizó iluminación continua para inducir la entrada al estado oscuro de Dronpa en todo momento y de esta manera poder generar las condiciones de parpadeo.

Dados los resultados obtenidos en la sección anterior se utilizó el medio de muestreo Rutina en combinación con PPD para determinar si además de generar el parpadeo de Dronpa se podría aumentar la intensidad de la fluorescencia y de esta forma aumentar la relación S/R, lo cual mejoraría la precisión del cálculo de las localizaciones de los fluoróforos detectados. Sin embargo, estas condiciones no fueron suficientes para generar el parpadeo de Dronpa. Aunque no pudimos generar condiciones para inducir el parpadeo de Dronpa se logró una disminución importante del fotoblanqueo, incluso mayor al observado con los medios de muestreo caracterizados en la sección anterior. Nuestros resultados muestran un valor de K_t de fotoblanqueo de aproximadamente 95 segundos en medio de muestreo PPD en combinación con Rutina (pH 6.9). En contraste, cuando se utilizó PPD pH 6.9 se observó un K_t de 57 segundos (**Gráfica 5, Tabla 4**). Similar a lo observado cuando se utilizó PBS con pH 7.4, no se observó diferencia entre los K_t de fotoblanqueo (alrededor de 30 segundos) entre los medios Rutina (pH 6.9) y PBS pH 6.9. El valor de K_t de cada medio de muestreo se calculó a partir de 50 series de 50 espermatozoides pertenecientes a 5 ratones distintos. El valor de p se calculó mediante una prueba t de student no pareada.



Gráfica 5. Constante de tiempo (K_t) del fotoblanqueo de Dronpa-D4 en PBS, Rutina y PPD. El valor de K_t de cada medio de muestreo se calculó a partir de 50 series de 50 espermatozoides pertenecientes a 5 ratones distintos.

Medio de muestreo	Constante (K_t) de tiempo del fotoblanqueo (promedio \pm DS, N = 5)	Significancia estadística de la diferencia del K_t respecto a PBS (p-value)
PBS pH 6.9	30.2 \pm 5.8	
Rutina	32.5 \pm 5	$p = 0.0763$
PPD	57.6 \pm 8.1	$p = 3.5607e-21$
Rutina + PPD	95 \pm 15.7	$p = 1.4443e-28$

Tabla 4. Valores de la constante de tiempo (K_t) del fotoblanqueo de Dronpa-D4 en PBS, Rutina y PPD.

Aunque no logramos generar las condiciones necesarias para el uso de Dronpa-D4 en microscopía de súper-resolución tipo PALM, el análisis sobre el efecto que tienen distintos medios de muestreo en el comportamiento de la fluorescencia de Dronpa-D4 sirve de precedente para futuras aplicaciones en experimentos de microscopía de otras modalidades.

7.4 LA DISTRIBUCIÓN DEL COLESTEROL EN LA MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE DEPENDE DE SU ESTADO CAPACITADO O NO CAPACITADO

Con base en nuestro objetivo principal, se realizó el marcaje de colesterol con Dronpa-D4 en espermatozoides incubados en medio capacitante y no capacitante como se explica en la sección de materiales y métodos.

En ambas poblaciones de espermatozoides, nombradas Capacitados y No Capacitados a partir de este punto, se observaron 5 patrones distintos de distribución de colesterol en la membrana de la cabeza. La clasificación de los cinco patrones se realizó tomando como referencia las tres regiones de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (**Figura 28** panel izquierdo).

El patrón de distribución de colesterol observado en las regiones del segmento ecuatorial y el acrosoma (SE y MA) se le nombró patrón A (**Figura 28 A**). Al patrón de distribución de colesterol localizado solo en la región acrosomal (MA) se le nombró patrón B (**Figura 28 B**). La distribución de colesterol localizada en las regiones del segmento ecuatorial y el acrosoma (SE y MA) y sobre la base de la cabeza en donde se une al flagelo se le nombró patrón C (**Figura 28 C**). A la distribución de colesterol que se observó sobre las tres regiones de la cabeza se le nombró patrón D (**Figura 28 D**). Por último, el patrón de distribución de colesterol observado en las regiones del segmento ecuatorial y acrosomal (SE y MA) y en la pieza media del flagelo (señalada con una flecha amarilla en la **Figura 28 E**) se le nombró patrón E.

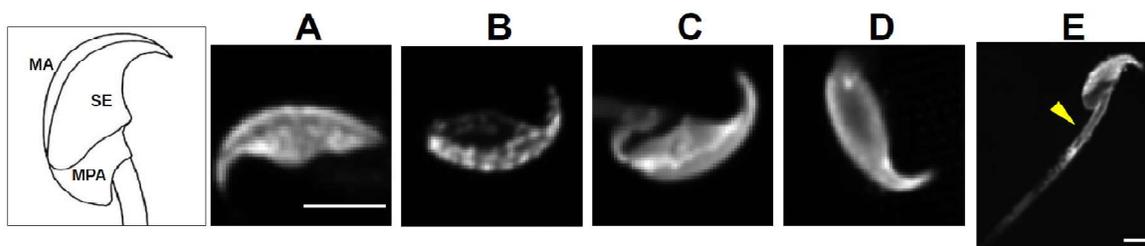
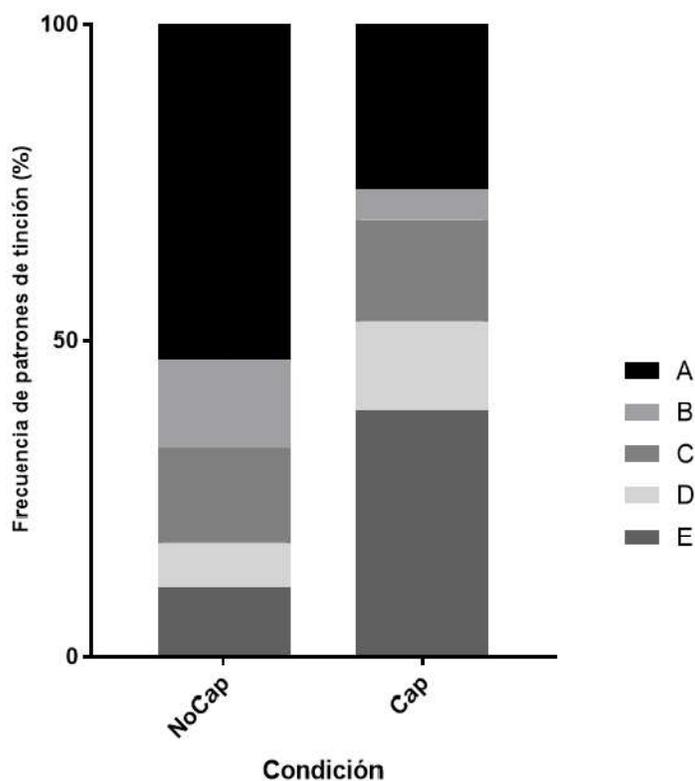


Figura 28. Casos representativos de los patrones de distribución de colesterol observados en espermatozoides de ratón. En la figura del extremo izquierdo se esquematizan las regiones en las que se divide la membrana de la cabeza para su estudio. A-E, patrones de distribución de colesterol A-E descritos en el texto. La flecha amarilla señala la pieza media del flagelo del espermatozoide. Barra de escala = 4 µm.

Del total de espermatozoides analizados en cada condición (Capacitados y No Capacitados) se observó que el porcentaje de espermatozoides que presentó cada patrón de distribución de colesterol fue diferente (**Gráfica 6**). El porcentaje de espermatozoides que presentó el patrón de distribución A fue mayor en espermatozoides No Capacitados, mientras que el porcentaje de espermatozoides que presentó el patrón de distribución E fue mayor en espermatozoides Capacitados. La cantidad de espermatozoides que presentaron los patrones B, C y D fue ligeramente distinta entre ambas condiciones fisiológicas; sin embargo su diferencia no es significativa (**Tabla 5**). El número de espermatozoides analizados fue de 200 para la condición No Capacitante y de 100 para la condición Capacitante; se utilizaron 5 ratones distintos en cada condición. La significancia estadística se obtuvo mediante una prueba t de student no pareada (2 muestras independientes).



Gráfica 6. Frecuencia de patrones de distribución de colesterol en espermatozoides capacitados (Cap) y no capacitados (No Cap). La frecuencia está expresada en el porcentaje (%) de espermatozoides que presentan cada uno de los patrones de distribución de colesterol (A, B, C, D y E) de cada condición fisiológica (Cap y No Cap).

Patrón de fluorescencia	% de Espermatozoides no capacitados	% de Espermatozoides capacitados	Significancia estadística (p-value)
A	53 %	26 %	0.015838
B	14 %	5 %	0.217939
C	15 %	16 %	0.913042
D	7 %	14 %	0.0502874
E	11 %	39 %	0.004986
Total	100 %	100 %	

Tabla 5. Frecuencias del patrón de distribución de colesterol asociado a la fluorescencia de Dronpa-D4 en espermatozoides Capacitados y no Capacitados.

7.5 EL COLESTEROL SE ORGANIZA EN DOMINIOS DE DIMENSIONES NANOMÉTRICAS EN LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE

Para poder visualizar los dominios de colesterol a escala nanométrica se utilizó el algoritmo de SRRF para generar las imágenes de súper-resolución de los espermatozoides marcados con Dronpa-D4 (explicación del funcionamiento de SRRF en **Apéndice A.6**).

En las imágenes de súper-resolución (SRRF) de ambas condiciones fisiológicas se pueden observar dominios de colesterol individuales (**Figura 29**) que no se pueden observar en las imágenes limitadas por difracción. A partir de este punto a estos dominios de colesterol detectados en las imágenes de SRRF se les llamará nano-dominios de colesterol.

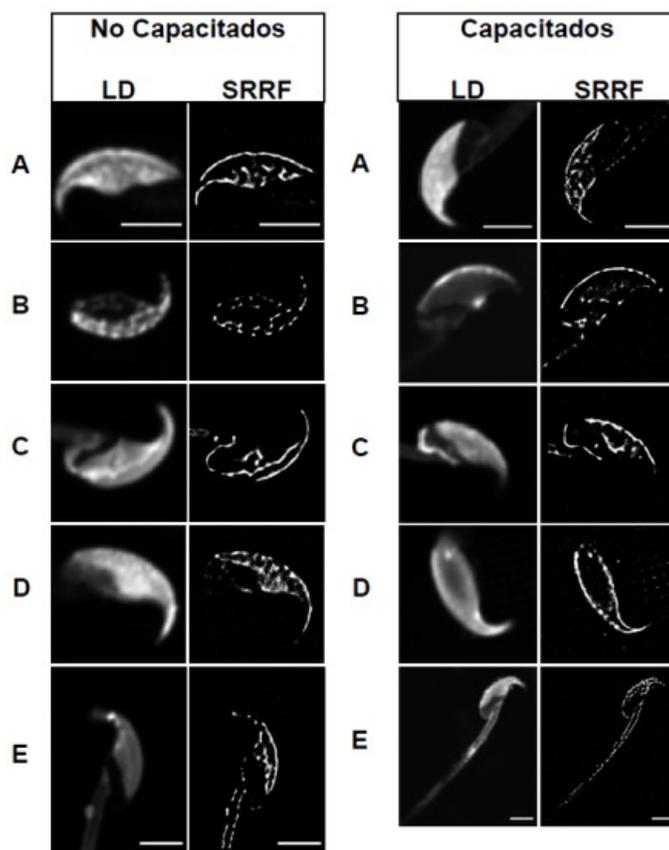


Figura 29. Reconstrucción de imágenes de súper resolución con el algoritmo de SRRF de espermatozoides capacitados y no capacitados. LD, limitado por difracción. SRRF, súper-resolución. A-E, patrones de distribución de colesterol observados en los espermatozoides en ambas condiciones fisiológicas. Barra de escala = 4 μ m.

Con el objetivo de realizar un análisis cuantitativo de las dimensiones de los nano-dominios de colesterol observados en las imágenes SRRF se procedió a calcular el área de cada uno de ellos mediante el método de segmentación basado en el algoritmo de “**Hk-means**” como se mencionó en la **sección 6.3.1**.

En la **Figura 30** se muestran dos casos representativos, uno de un espermatozoide no capacitado (panel superior) y otro de un espermatozoide capacitado (panel inferior), de la segmentación obtenida mediante el método de “**Hk-means**”.

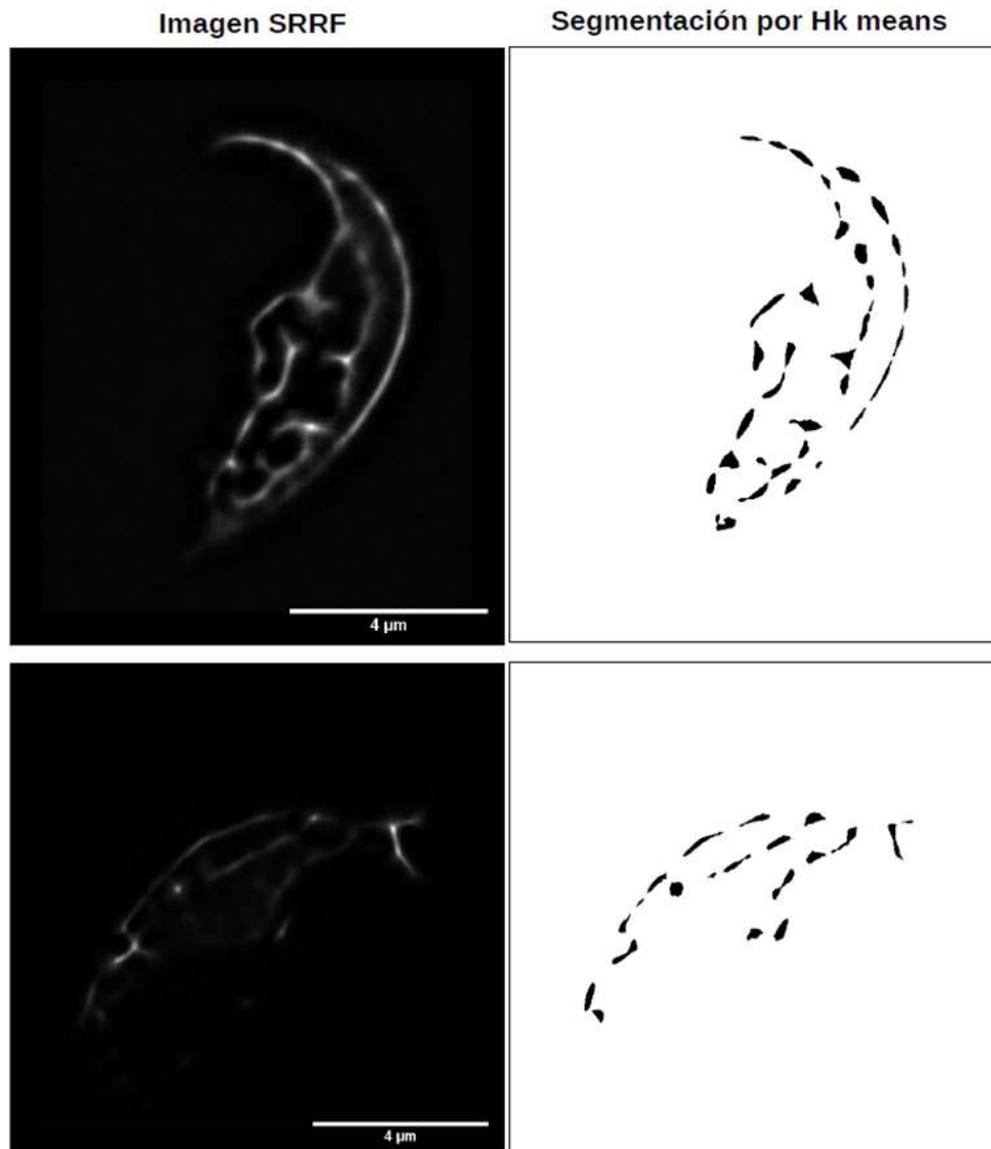


Figura 30. Segmentación de imágenes obtenida mediante el método de “Hk-means”. Izquierda, imágenes obtenidas mediante el algoritmo de SRRF. Derecha, segmentación de las imágenes SRRF obtenidas mediante Hk-means. Panel superior, espermatozoide no capacitado. Panel inferior, espermatozoide capacitado. El patrón de distribución de colesterol en ambos espermatozoides corresponde al patrón A.

Dado que solo el porcentaje de espermatozoides que presentaron el patrón de distribución de colesterol A y E cambio significativamente antes y después de ser incubados en medio capacitante se decidió hacer el análisis solo de las imágenes de espermatozoides que mostraron dichos patrones.

El área de los nano-dominios detectados mediante el algoritmo de segmentación se encontró en un rango de 560 nm^2 a 5600 nm^2 pixeles. En las gráficas de la **Figura 31 (A-D)** se muestran los nano-dominios de colesterol ordenados de menor a mayor con base en su área de cuatro casos representativos de espermatozoides no capacitados con un patrón de distribución de colesterol A. A cada nano-dominio de colesterol detectado se le etiquetó con un identificador numérico (ID, iniciando en 1 y terminando en el número de nano-dominios detectados, siendo el 1 el de menor tamaño y el último el de mayor tamaño) para poder detectarlo en la gráfica y en la imagen de la cabeza del espermatozoide.

Aunque la cantidad de nano-dominios detectados en cada espermatozoide fue distinta se puede apreciar que estos nano-dominios aparentemente se pueden categorizar en uno de cuatro grupos, según su distribución en las gráficas.

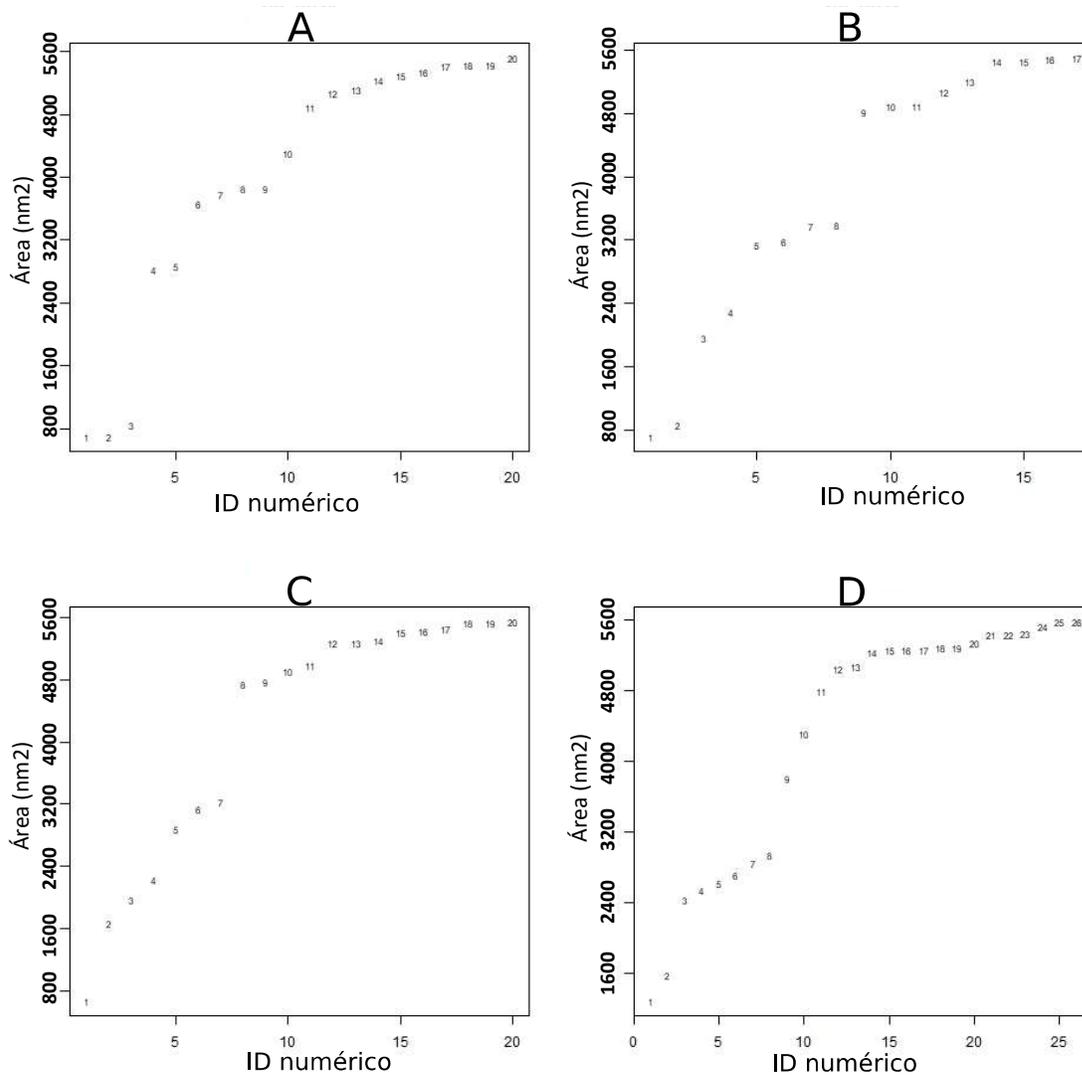


Figura 31. Área de los nano-dominios de colesterol detectados en 4 casos representativos de espermatozoides no capacitados con el patrón A de distribución de colesterol. En cada caso los nano-dominios de colesterol detectados mediante el algoritmo de segmentación de *Hk means* fueron etiquetados con un identificador (ID) numérico iniciando en 1 y terminando en el número de nano-dominios detectados. Por ejemplo, en A se detectaron 20 nano-dominios, 17 en B, 20 en C y 26 en D. El orden de numeración de cada nano-dominio se basó en su área, siendo el nano-dominio 1 el de menor tamaño y el último el de mayor tamaño.

Se realizó un análisis de agrupamiento utilizando la función “K-means” (https://afit-r.github.io/kmeans_clustering) implementada en el lenguaje de programación R para determinar qué dominios de colesterol pertenecen a cada grupo según su área (**Figura 32 A-D**). Los cuatro grupos detectados tienen las siguientes características:

Grupo 1 = dominios de colesterol con un área aproximada de entre 35 y 100 píxeles (rojo en **Figura 32**)

Grupo 2 = dominios de entre 100 y 200 píxeles de área aproximadamente (cian en **Figura 32**)

Grupo 3 = dominios de entre 200 y 300 píxeles de área aproximadamente (verde en **Figura 32**)

Grupo 4 = dominios con un área de 300 a 350 píxeles de área aproximadamente (violeta en **Figura 32**)

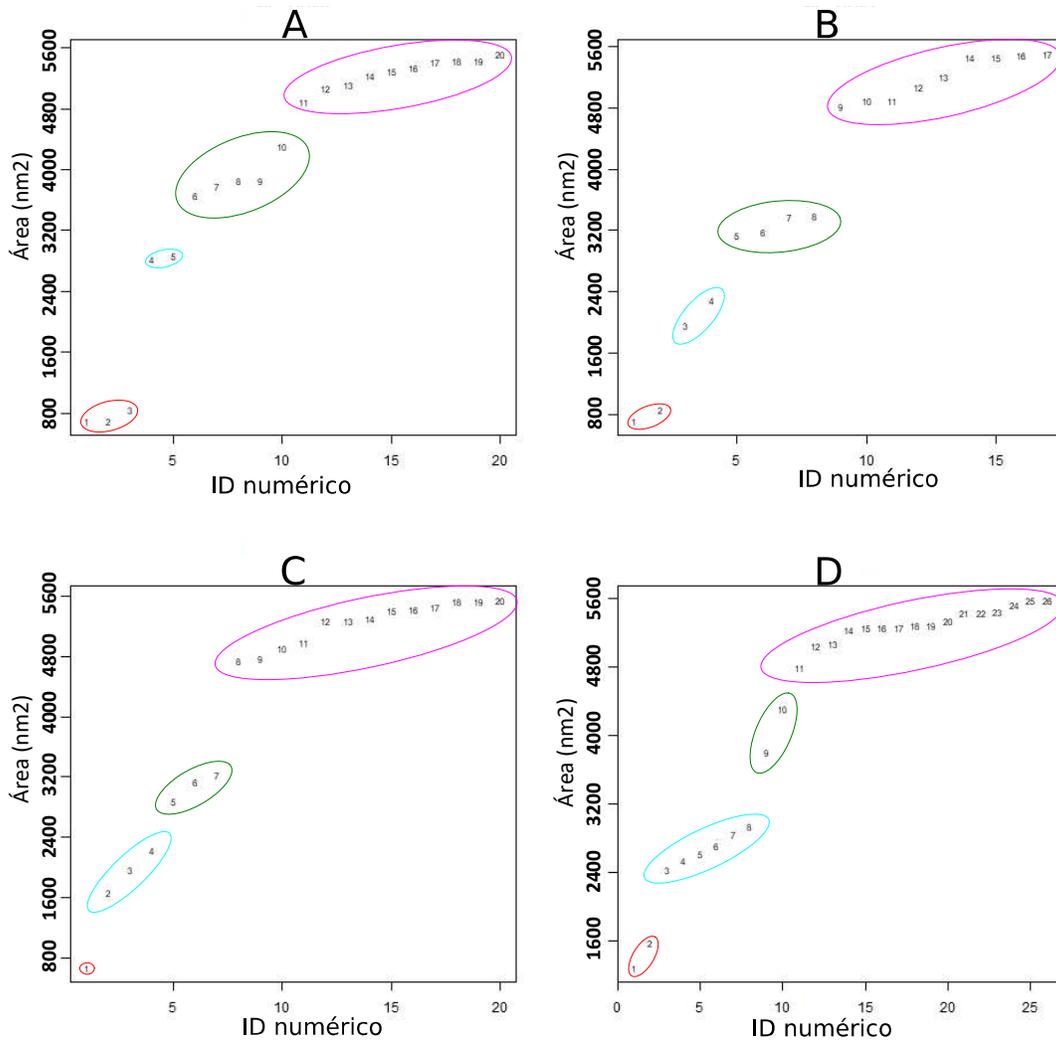


Figura 32. Análisis de agrupamiento de los nano-dominios de colesterol respecto al área observada mediante el análisis de K means. Los mismos casos representativos que en la **Figura 31**. Los cuatro grupos de nano-dominios detectados según su área se muestran en óvalos de color rojo para el grupo 1, cian para el grupo 2, verde para el grupo 3 y violeta para el grupo 4. Las características de cada grupo se describen en el texto.

Al identificar la localización de los nano-dominios de cada grupo en la cabeza del espermatozoide se observó que se distribuyen de manera heterogénea, es decir que los dominios de cierto grupo parecen estar preferentemente en una región de la cabeza. Por ejemplo, en la **Figura 31** se observa que casi todos los dominios del grupo 3 y 4 (verdes y morados) se localizan principalmente en la región apical de la cabeza. Por este motivo se realizó un análisis cuantitativo de la localización de los nano-dominios de colesterol en la cabeza del espermatozoide.

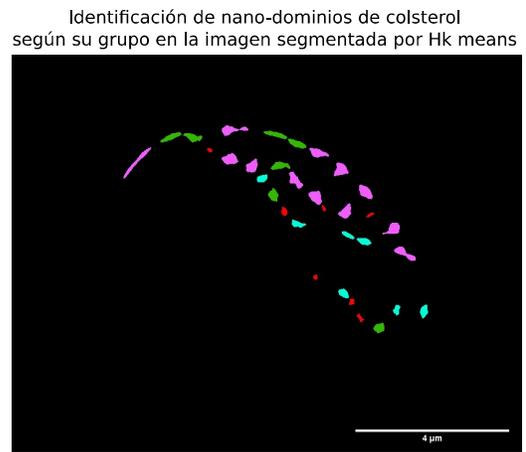
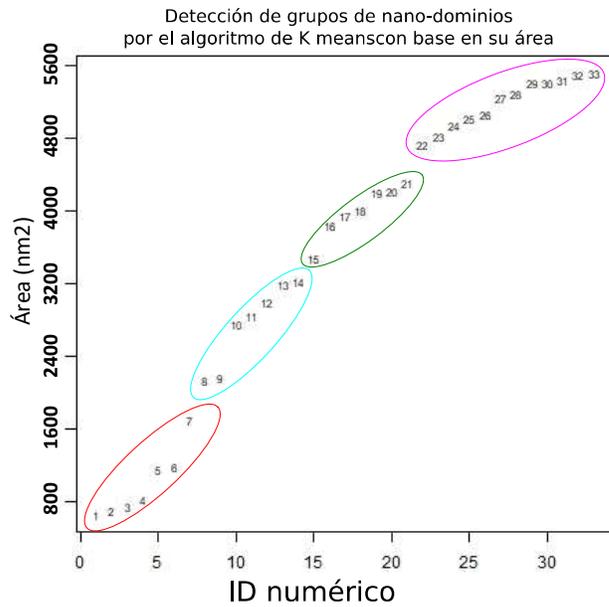
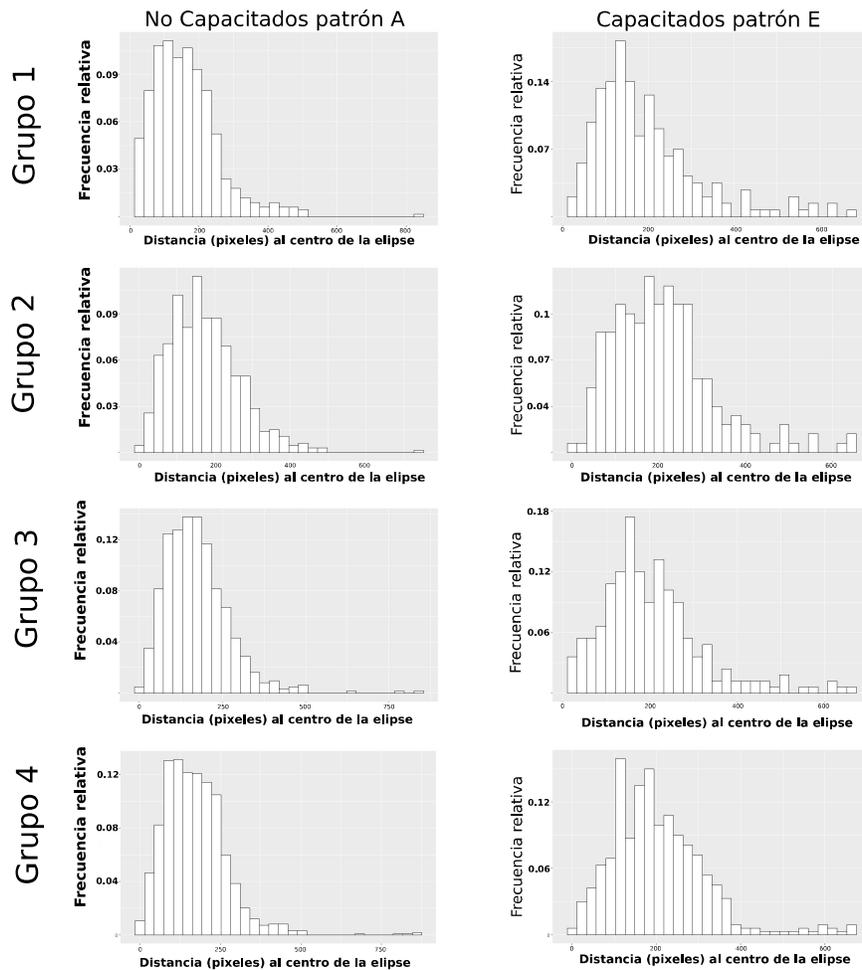


Figura 33. Visualización de los nano-dominios de colesterol según su grupo en la cabeza del espermatozoide de ratón. Caso representativo de un espermatozoide no capacitado con el patrón A de distribución de colesterol. En el panel izquierdo se muestra la gráfica de los nano-dominios ordenados de menor a mayor según su área en píxeles y la detección en cuatro grupos por el algoritmo de K means. En el panel derecho se señala la ubicación de los nano-dominios de colesterol en la cabeza en colores según el grupo en el que fueron categorizados.

7.6 LA DISTRIBUCIÓN DE LOS NANO-DOMINIOS DE COLESTEROL EN LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DEPENDEN DE SU ESTADO “CAPACITADO” O “NO CAPACITADO”

A partir de las observaciones mencionadas en la sección anterior se decidió realizar un análisis cuantitativo de la localización de los nano-dominios de colesterol en la cabeza del espermatozoide, tomando como referencia la distancia de cada nano-dominio al centro de la elipse ajustada a la cabeza, como se menciona en la **Sección 6.3.2**.

De esta manera se comparó la posición de los dominios de colesterol (en términos de su distancia al centro de la elipse) entre ambas condiciones fisiológicas, No Capacitados y Capacitados (**Gráfica 7**).



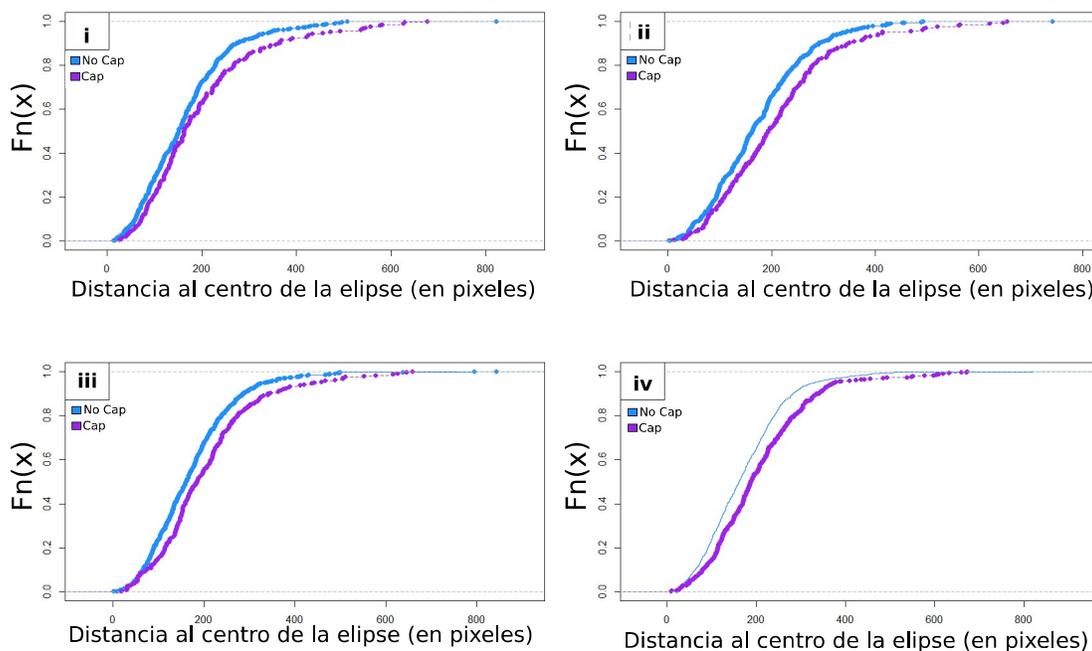
Gráfica 7. Frecuencia relativa de la distancia de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse en espermatozoides capacitados y no capacitados. Los histogramas muestran la frecuencia relativa de la distancia de los nano-dominios al centro de la elipse los cuatro grupos observados (según su área en píxeles, definidos en la sección 7.6) y por su condición fisiológica (No Capacitados y Capacitados).

En los histogramas de la **Gráfica 7** se muestran las frecuencias relativas de las distancias de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse del patrón de tinción A de espermatozoides No Capacitados y el patrón de tinción E de espermatozoides Capacitados. Se analizaron 115 espermatozoides No Capacitados con el patrón de distribución A y 50 espermatozoides Capacitados con el patrón de distribución E.

Debido a que el porcentaje de espermatozoides que presentaron estos patrones de tinción fue diferente en cada condición fisiológica se decidió aplicar la **prueba de Kolmogorov-Smirnov** a estas dos poblaciones para determinar si existe una diferencia en la localización de los nano-dominios entre espermatozoides Capacitados y No Capacitados.

A grandes rasgos, esta prueba compara la función de distribución acumulada $[Fn(x)]$ de dos distribuciones muestrales (en nuestro caso Capacitados y No Capacitados) para determinar si pertenecen a la misma distribución. Esto se hace evaluando la hipótesis **$F_n(x)$ de Cap < $F_n(x)$ de No Cap**, tomando en cuenta la distancia promedio **D** que hay entre ambas distribuciones acumuladas, de tal manera que si **D** es distinto de cero con una significancia estadística menor a 0,05 se concluye que ambas muestras pertenecen a distintas distribuciones muestrales.

La **Gráfica 8** muestra la función de distribución acumulada las distancias de los nano-dominios al centro de la elipse en espermatozoides Capacitados y No Capacitados (curva morada y azul respectivamente) por cada categoría según su área en pixeles (grupo 1 a 4).



Gráfica 8. Gráficas de la función de distribución acumulada [Fn(x)] de las distancias de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse. **i**, Fn(x) del grupo 1 (35-100 píxeles). **ii**, Fn(x) del grupo 2 (100-200 píxeles). **iii**, Fn(x) del grupo 3 (200-300 píxeles). **iv**, Fn(x) del grupo 4 (300-350 píxeles). La curva morada representa los valores de Fn(x) para espermatozoides Capacitados con patrón de tinción E. La curva azul representa los valores Fn(x) para espermatozoides No Capacitados con patrón de tinción A.

Se aprecia en la **Gráfica 8** que las distribuciones acumuladas de las distancias de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse para los espermatozoides Capacitados y No Capacitados se encuentran a diferente distancia, lo cual se demostró mediante la aplicación de la prueba Kolmogorov-Smirnov (**Tabla 6**).

Grupo (por área en nm ²)	Patrón No Capacitados	Patrón Capacitados	D	p-value
560-1600	A	E	0.10865	0.02642
1600-3200	A	E	0.14865	0.001111
3200-4800	A	E	0.14831	0.0004693
4800-5600	A	E	0.13346	5.35E-06

Tabla 6. Resultados del análisis de la diferencia en la función de distribución acumulada [Fn(x)] de las distancias de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse entre espermatozoides Capacitados y No Capacitados mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Dado que en ambas condiciones se registraron espermatozoides con los patrones de tinción de colesterol A y E se decidió comparar la distribución de los nano-dominios de colesterol entre espermatozoides Cap y No Cap con el mismo patrón de tinción (NoCap patrón A vs Cap patrón A y NoCap patrón E vs Cap patrón E). Los resultados se muestran en la **Tabla 7** para el primer caso y en la **Tabla 8** para el segundo caso. Como se puede observar, en estos casos no hubo diferencias en la distribución de los dominios ($p\text{-value} > 0.05$) excepto para el grupo 1 (área de 35 a 100 píxeles).

Grupo (por área en nm ²)	Patrón No Capacitados	Patrón Capacitados	D	p-value
560-1600	A	A	0.18112	0.002778
1600-3200	A	A	0.10778	0.1178
3200-4800	A	A	0.06717	0.4307
4800-5600	A	A	0.072738	0.1134

Tabla 7. Análisis de Kolmogorov-Smirnov para determinar la diferencia en la función de distribución acumulada [Fn(x)] de las distancias de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse entre espermatozoides Capacitados y No Capacitados con el patrón de tinción de colesterol A..

Grupo (por área en nm ²)	Patrón No Capacitados	Patrón Capacitados	D	p-value
560-1600	E	E	0.067327	0.4676
1600-3200	E	E	0.064579	0.4861
3200-4800	E	E	0.053306	0.5736
4800-5600	E	E	0.044972	0.4778

Tabla 8. Análisis de Kolmogorov-Smirnov para determinar la diferencia en la función de distribución acumulada [Fn(x)] de las distancias de los nano-dominios de colesterol al centro de la elipse entre espermatozoides Capacitados y No Capacitados con el patrón de tinción de colesterol E..

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La capacitación es el proceso mediante el cual el espermatozoide adquiere la capacidad de poder fecundar un óvulo. Un evento clave durante la capacitación del espermatozoide de mamíferos es el eflujo de colesterol fuera de la membrana celular (Flesch et al., 2001). La evidencia sugiere que el colesterol se organiza en dominios lipídicos (balsas lipídicas) cuya organización y distribución cambian debido su eflujo durante la capacitación (Zitranski et al., 2010; Tsai, Garcia-Gil, van Haeften & Gadella, 2010); sin embargo, hasta ahora no se ha podido observar dichos dominios directamente en la célula. El objetivo de este trabajo fue observar los cambios en la organización de los dominios enriquecidos en colesterol durante la capacitación del espermatozoide de ratón. Para lograr esto se propuso el uso de microscopía de súper-resolución utilizando el marcador de colesterol Dronpa-D4.

La primera fase del proyecto consistió en la expresión y purificación de Dronpa-D4. En esta primera fase corroboramos que el comportamiento de la fluorescencia de Dronpa depende de la longitud de onda con la que se ilumina, de tal forma que el decaimiento de su fluorescencia ocurre más rápido cuando la muestra se ilumina solamente con luz de 488 nm y es más lento cuando se ilumina simultáneamente con luz de 488 nm y luz de 405 nm (**Tabla 2**). Este efecto se debe a que la luz de 488 nm induce la entrada de Dronpa a su estado oscuro, del cual logra salir cuando es iluminado con luz de 405 nm. Estas propiedades fotofísicas de Dronpa permiten manipular la emisión de su fluorescencia, generando protocolos de iluminación en los cuales se induzca la emisión discontinua, mejor conocido como parpadeo, para poder llevar a cabo técnicas de microscopía de súper-resolución, especialmente de fotoactivación por luz (PALM; Betzig et al., 2006; Hess, Girirajan & Mason, 2006; Rust, Bates & Zhuang, 2006).

Sin embargo, en el presente trabajo no fue posible establecer un protocolo de muestreo con las condiciones óptimas para generar el parpadeo de Dronpa (**Figura 27**). Esto se debió probablemente a la asociación de una alta concentración de fluoróforos a la cabeza del espermatozoide dada por su alta concentración de colesterol (Parks and Lynch, 1992), lo cual impidió la separación espaciotemporal de eventos de emisión de moléculas

individuales (Thompson, Larson & Webb, 2002; Baumgart et al., 2016; Xinlei & Naifeng, 2016).

Otra razón por la que probablemente no se pudo observar el parpadeo de Dronpa fue por la baja potencia del laser utilizado. Se sabe que Dronpa requiere de altas potencias de iluminación para poder establecer las condiciones de parpadeo (Zhang et al., 2016), sin embargo debido a la técnica de microscopía que se utilizó (microscopía confocal de disco giratorio) no se pudo alcanzar la potencia ideal con la cual se pudiera hacer parpadear a Dronpa. Lo anteriormente dicho se debe a la configuración de iluminación del microscopio, en la cual el laser se divide en múltiples volúmenes confocales (hasta 1200 volúmenes confocales) que escanean simultáneamente la muestra, provocando la disminución de la potencia con la que se ilumina dicha muestra.

No obstante, durante el intento de establecer un protocolo de muestreo apto para microscopía de súper-resolución PALM, se probaron 4 medios de muestreo (Rutina, GOC, POC, MEA-MB y PPD) que se sabe reducen la concentración de oxígeno en el medio disminuyendo de esta forma el fotoblanqueamiento del fluoróforo por oxidación (Rego et al., 2011; Swoboda et al., 2012; Bogdanov, Kudryavtseva & Lukyanov, 2012; Schäfer, van de Linde, Lehmann, Sauer & Doose, 2013). Nuestros resultados demuestran que dichos medios de muestreo, menos Rutina, reducen el fotoblanqueo de Dronpa, lo cual se refleja en un aumento del tiempo medio de fotoblanqueo de Dronpa en comparación con un medio de muestreo que no reduce la concentración de oxígeno (**Tabla 3**). Un caso particular fue el uso combinado de Rutina y PPD, ya que el uso del medio con Rutina aumento significativamente la intensidad de la fluorescencia de Dronpa en comparación con los demás medios y, además el uso de PPD aumento aproximadamente un orden de magnitud el tiempo medio de fotoblanqueo, lo cual se traduce en una reducción notable del tiempo de fotoblanqueo de Dronpa. Aunque se ha demostrado que Rutina tiene un efecto antioxidante cuando se utiliza con la proteína verde fluorescente (GFP), en nuestro caso no se observó dicho efecto con Dronpa. Sin embargo, su efecto en el aumento de la intensidad de la fluorescencia de Dronpa podría estar reemplazando el efecto antioxidante de Rutina por algún otro evento molecular, por ejemplo interfiriendo positivamente en la interacción del cromóforo de Dronpa con los aminoácidos del barril β que lo mantienen en el estado activo (cis), generando más fotones por ciclo de adquisición de la imagen lo cual se ve reflejado

en un aumento en la intensidad de la señal. Los resultados obtenidos sobre el efecto de estos medios de muestreo en el fotoblanqueamiento de Dronpa quedan como precedente para su uso en futuros ensayos de microscopía óptica de súper-resolución.

La segunda fase del proyecto consistió en observar los cambios en la distribución del colesterol que ocurren en los espermatozoides durante su capacitación. Las observaciones se realizaron a nivel micrométrico, utilizando microscopía limitada por difracción, y a nivel nanométrico mediante microscopía de súper-resolución utilizando el método de SRRF (sección 6.15).

En las primeras observaciones realizadas sobre espermatozoides No Capacitados se observaron 5 patrones generales de la distribución de colesterol (**Figura 28**) que de igual manera se encontraron en espermatozoides Capacitados, pero con una frecuencia distinta con la que apareció cada patrón (**Gráfica 7**). Entre los 5 patrones observados solo el patrón A y el E tuvieron una diferencia significativa entre Capacitados y No Capacitados (**Tabla 5**). Como se puede observar en la **Gráfica 7** el patrón de distribución más frecuente en espermatozoides No Capacitados fue el patrón A, para lo cual algo similar se ha reportado en otros estudios (Travis & Kopf, 2002; Selvaraj et al., 2006; Asano et al., 2010). En cambio, en espermatozoides Capacitados fue el patrón E el de mayor frecuencia.

Si asumimos que el patrón de distribución de colesterol A corresponde a una distribución que es característica de espermatozoides No Capacitados podemos concluir que el patrón de distribución de colesterol E que aumenta en espermatozoides incubados en medio capacitante es una consecuencia de la capacitación del espermatozoide.

No obstante se observan espermatozoides con el patrón de distribución de colesterol E en los espermatozoides incubados en medio no capacitante y también observamos la presencia de espermatozoides con el patrón de distribución A en espermatozoides que han sido incubados en medio capacitante.

Estos resultados se pueden explicar teniendo en cuenta que la membrana celular de los espermatozoides puede ser alterada debido a distintos factores; por ejemplo, defectos en la maduración de los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo o a factores ambientales como cambios en la temperatura durante el manejo in vitro de las muestras pueden incluso generar la reacción acrosomal de manera espontánea (Eisenbach, Cerezales & Boryshpolets, 2015). Esto explicaría la presencia de espermatozoides con un patrón de

distribución E en las muestras que fueron incubadas en medio No Capacitante, y de igual manera explicaría la presencia de espermatozoides con el patrón de distribución A en la muestra incubada en medio capacitante.

Se realizaron dos controles para demostrar que el patrón de marcaje de Dronpa está asociado al patrón de distribución de colesterol en la membrana del espermatozoide.

El primer control se realizó iluminando muestras de espermatozoides sin marcar con Dronpa para demostrar que la fluorescencia observada se debía a la emisión de Dronpa y no a autofluorescencia de las células. Los resultados se muestran en la **Figura 22**, en el cual se puede apreciar la ausencia de fluorescencia, por lo cual se concluye que la fluorescencia observada en espermatozoides marcados se debe a la emisión de Dronpa-D4.

El segundo control se realizó para demostrar la especificidad del marcaje de Dronpa-D4 por el colesterol. Este control se realizó incubando los espermatozoides en medio con β -Ciclodextrina para extraer el colesterol de la membrana y posteriormente con la sonda Dronpa-D4, como se describe en materiales y métodos. En la **Figura 24** se observa una disminución drástica de la fluorescencia en la membrana del espermatozoide, con lo cual podemos concluir que la asociación de Dronpa al espermatozoide se debe específicamente a su interacción con el colesterol de la membrana.

Por último, las imágenes de súper-resolución obtenidas mediante el algoritmo de SRRF nos permitieron observar los dominios de colesterol a escala nanométrica, lo cual es mucho más limitado en imágenes obtenidas por microscopía limitada por difracción, como se muestra en la **Figura 29**. A partir de estas imágenes se realizó la caracterización de los dominios de colesterol observados y un análisis de su distribución espacial en la cabeza, como se menciona en la sección **6.3.2**. Los resultados demuestran, si asumimos que el patrón A es indicativo de espermatozoides no capacitados, y el patrón E es indicativo de espermatozoides capacitados, que durante la capacitación del espermatozoide ocurre una redistribución de los dominios de colesterol (**Tabla 6**). Además, se observó la ausencia de diferencia en la distribución de los dominios de colesterol entre ambas condiciones fisiológicas con el mismo patrón de distribución (**Tablas 7 y 8**) lo cual podría reflejar fenómenos como defectos en los componentes involucrados la regulación de la capacitación y también el fenómeno de la reacción acrosomal espontánea, no obstante es necesario realizar más pruebas y controles adicionales para demostrar este punto.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- El uso de medios de muestreo con sistemas secuestradores de oxígeno y antioxidantes aumenta el tiempo medio de fotoblanqueo de Dronpa-D4.
- En espermatozoides de ratón no capacitados la distribución del colesterol se encuentra mayormente en el segmento ecuatorial.
- Después de la capacitación ocurre una redistribución del colesterol hacia las demás regiones de la cabeza.
- El colesterol, en la membrana plasmática del ratón, se organiza en dominios de dimensiones nanométricas.
- Ocurre una redistribución de los dominios nanométricos de colesterol después de la capacitación del espermatozoide.

CAPÍTULO 10

PERSPECTIVAS

- Determinar si los cambios en el patrón de distribución de colesterol observado por microscopía de fluorescencia están directamente relacionados con el proceso de capacitación mediante el uso de marcadores de la capacitación (como la fosforilación de proteínas) que permitan establecer la relación directa entre la capacitación y la modificación del patrón de distribución de colesterol.
- Realizar ensayos de microscopía de súper-resolución de detección de molécula individual para visualizar con mayor resolución los nano-dominios enriquecidos en colesterol para poder analizar con mayor precisión las características de dichos nano-dominios.
- Determinar mediante microscopía de súper-resolución de detección de molécula individual si los nano-dominios enriquecidos en colesterol forman parte de balsas lipídicas utilizando marcadores de balsas lipídicas como esfingomiélna, gangliosido GM1 o Caveolina-1.

CAPÍTULO 11

APÉNDICE

A.1 SONDA DRONPA-D4

La secuencia de la sonda Dronpa-D4 se insertó en un plásmido pET28a el cual es un vector de clonación y expresión en *E. coli*. Contiene una secuencia de etiqueta de Histidinas en el N-terminal y otra en el C-terminal y una secuencia de resistencia a Kanamicina (**Figura A1**). El plásmido Dronpa-D4 tienen un tamaño de 6307 pares de bases.

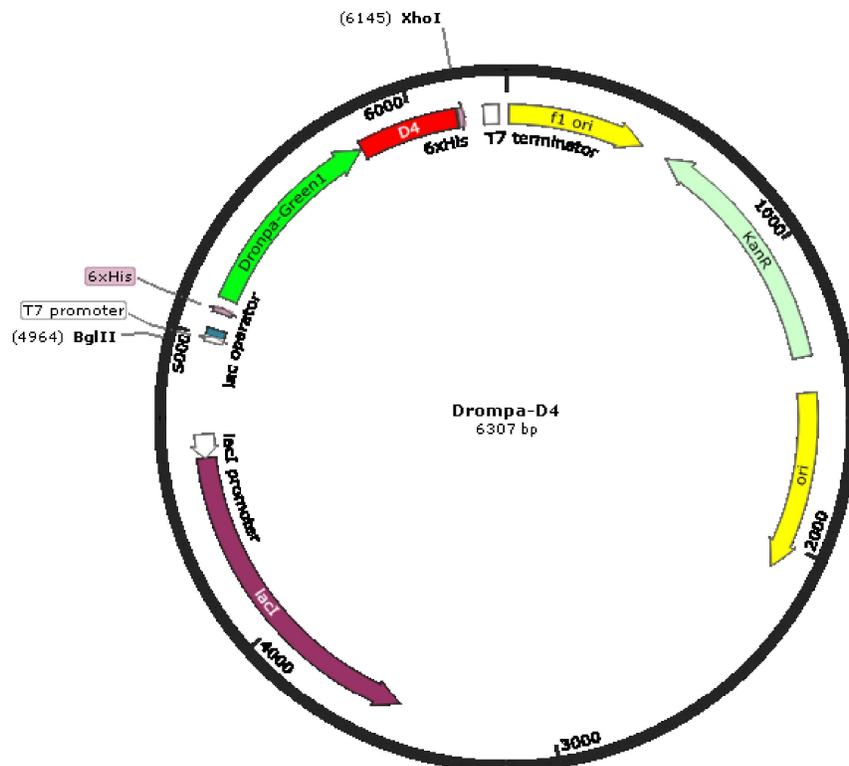


Figura A1. Mapa de restricción del plásmido pET28a-DronpaD4. En color verde se señala la región que corresponde a Dronpa. En color rojo se señala la región que corresponde a D4.

A.1.1 Secuencia reportada de pET28a-Dronpa-D4

Las letras verdes corresponden a la secuencia de Dronpa. Las letras rojas corresponden a la secuencia de D4.

tggcgaatgggacgcgccctgtagcggcgcaattaagcgcggcggtgtggtgttacgcgcagcgtgaccgctacactgccag
cgccctagcgcggcctcttctgcttcttcccttcttctcgcacgttcgccggcttccccgtcaagctctaaatcgggggctccc
tttaggggtccgatttagtgctttacggcacctcgacccccaaaaacttgattaggggtgatggttcacgtagtgggcatcgcctgat
agacgggttttcgcccttgacgttggagtcacgttcttaatagtgactcttgttccaaactggaacaacactcaacctatctcggt
ctattctttgattataagggattttgcccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcgaatttaacaaa
atattaacgtttacaatttcaggtggcactttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgttttttctaaatacattcaaatatgtatc
cgctcatgaattaattcttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccatattttgaaa
aagccgttctgtaataagagaaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcctggatcggctcgcgattccgactcg
tccaatcaatacaacctattaattcccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaatccatgagtgacgactgaatccgggtg
agaatggcaaaagtattgcatcttctcagacttgtcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcatacaacaaa
ccgttattcattcgtgattgcgctgagcgagacgaaatacgcgacgctgtttaaaggacaattacaacaggaatcgaatgcaac
cggcgcaggaactgccagcgcacatcaacaatatttcacctgaatcaggatattcttctaataacctggaatgctgtttcccggggat
cgcagtgggtgagtaacctgcatcatcaggagtagcgataaaatgcttgatggtcggaagaggcataaattccgtagccagtttag
tetgacctctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgttccagaaacaactctggcgcacgggcttccatacaatcg
atagattgctgcacctgattgcccacattatcgcgagccattataacctataaatcagcatccatggtgaaattaatcgcggcct
agagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacacccttgtattactgtttatgtaagcagacagtttattgttcatgacaaaatc
cctaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccctgtagaaaagatcaaaggatcttcttgatcctttttctgcgcgtaatct
gctgcttgcaaaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactgg
cttcagcagagcgcagatacaaaactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgctaca
tacctcgtctgtaactctgttaccagtggctgctgccagtgccgataagtcgtgcttaccgggttgactcaagacgatagttacc
ggataagggcagcggctcgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagat
acctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaaggggagaaaggcggacaggtatccgtaagcggcagggctcgg
aacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggatctttatagctctgctgggttccacactctgactgagc
gtcgattttgtgatgctcgcagggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacgggtcctggccttttctg
gcctttgtcacatgttcttctcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcgca
gccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcaggaagcggaaagcgcctgatcgggtattttctccttacgcatctgtgcg
gtatttcacaccgcatataggtgactctcagtaaatctgctctgatccgcatagttaagccagatacactccgctatcgtacgt
gactgggtcatggctgcgcccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttctgctcccggcatccgcttaca
gacaagctgtgaccgtcctcgggagctgcatgtgtcagaggtttaccgctatcaccgaaacgcgcgaggcagctcgggtaag
ctcatcagcgtggctgtgaagcattcacagatgctgctgttccatccgctcagctcgttgatttctccagaagcgttaatgctc
gcttctgataaagcgggcatgtaaggcgggttttctgtttgtcactgatgccctccgtgtaagggggatttctgttcatgggggt
aatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaacatccccggttactggaacggttgtaggggta
aacaactggcggatggatcggcgggaccagagaaaaactcagggtcaatgccagcgttcgtaatacagatgtaggtgtt
ccacagggttagccagcagcatctcgatcgagatccggaacataatggtcagggcgtgacttccgcgttccagactttacga
aacacggaaaccgaagaccattcatgttgttctcaggtcgcagacgtttgcagcagcagtcgcttcacgttcgctcgcgtatcgtt
gattcattctgtaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcagatcatgcgcaccggtggg
gccgcatccggcgataatggcctgcttctcggcaaacgtttgggtggcgggaccagtgacgaaaggctgagcagggcgtgc
aagattccgaataaccgcaagcagagccgatcatcgtcgcgctccagcgaagcggctctcggcaaaatgaccagagcgt
gccggcacctgtctacgattgcatgataaagaagacagtcataagtgcggcgacgatagcatccccgcgccaccggaag
gagctgactgggtgaaggctctcaaggcctcggctcagatcccgggtcctaagagttagctaaccttaattgcgttgcgt
cactgccgcttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatggccaacgcgcggggagaggggttgcgtatt
gggcgccaggggtgttttcttccaccagtgagacgggcaacagctgattgccctcaccgctggcctgagagagttgcagca

gcggtccacgctggttgcgccagcagcgaaaatcctgtttgatggtggttaacggcgggatataacatgagctgtcttcggtatcg
tcgtatcccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcgccagcgcctatcgtatcgtt
ggcaaccagcatcgcagtggaacgatgccctcattcagcatttgcaggttggtaaaaccggacatggcactccagtcgccttc
ccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatattatgccagccagacgcagacgcgccgagacagaacttaatgg
gcccgtaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgccagtcgcgtaccgtcttcatgggagaaaata
tactgttgatgggtgctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtcagggcagcttccacagcaatggcatcctggt
catccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgccgctttacagcttcgacgccgcttc
gttctaccatcgacaccaccacgctggcaccagttgatcggcgcgagattaatgccgcgacaatttgcgacggcgcgtgcag
ggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttcccgcagttgtgtgcacgcggttgggaatgtaattcagct
ccgcatcgcgcttccacttttcccgcgtttcgcagaaacgtggctggcctggtcaccacgcgggaaacggtctgataagaga
caccggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcattcaccaccctgaattgactctctccggcgctatcatccatac
cgcgaaaggtttgcgccattcgtatggttccggatctcgcgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagta
ggttagggccttgagcaccgccgccgcaaggaaatggtgcatgcaaggagatggcgccaacagtccccggccacggggcc
tgccaccataccacgccgaaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgcgagcccgatcttcccacgggtgatgctggcgatatag
gcgccagcaaccgcacctgtggcgcgggtgatccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgcgatctcgcgccgaaa
ttaatacactactataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaataatgttgaacttaagaaggagatataccatg
ggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctggtgccgcggcagcGTACC **atgagtgtgattaaccag
acatgaagatcaagctgcgtatggaaggcgtgtaaatggacacecgttcgcattgaaggagtggccttgggaagcctt
tcgagggaaaacagagtatggacctaaagtcaaagaaggcggacctgccttgcctatgacatcttgacaactgtgtt
ctgttacggcaacagggatttcgcaataaccagaaaatagtagactattcaagcagtcgttctgagggtactctt
gggaacgaagcatgaattacgaagacgggggcatttgaacgcgacaaacgacataacctggatggtgactgttatct
atgaaattcgatttgatggtgtaacttctgccaatggtccagttatgcagaagaggactgtgaaatgggagccatccact
gagaaattgtatgtcgtgatggagtgtgaagggtgatgtaacatggctctgtcgttgaaggaggtggccattaccgat
gtgacttcaaaactactataaagetaagaagggtgtccagttgcagactatacttgggaccaccacattgagattaaa
agccacgacaaagattacagtaatgttaactgcatgagcatgccgaagcgcattctgagctgccgaggcaggccaagA
AGCTTA **agggaaaaataaacttagatcatagtgaggcctatgttgcacagttgaagtagcctgggatgaagttcata
tgataaagaaggaaatgaagtttaactcataaaacatgggatggaaattatcaagataaaacagctcactattcaacagt
aatacctcttgaagccaatgcaagaaatataagaataaaggcaagagagtgtacaggecttcttgggaatggtggagag
atgtataagtgaatatgatgtccattaacaaacataataatgtttcaatatggggaacaactttatatcctggatctagta
ttacttacaattaaCTCGAGcaccaccaccaccactgagatccggctgtaacaaagcccgaaggaagctgagttgg
ctgctgccaccgctgagcaataactagcataaccttggggccttaaacgggtcttgaggggttttctgctgaaaggaggaactat
atccggat****

A.1.2 Secuenciación de pET28a-Dronpa-D4

Las letras verdes corresponden a la secuencia de Dronpa. Las letras rojas corresponden a la secuencia de D4.

gggwmatttcccgtctagaataatttgtttaactttaagaaggagatataccatgggcagcagccatcatcacawcatcacagcag
cggcctggtgccgcgcggcagcGGTMCCatgagtgtgattaaaccagacatgaagatcaagctgcgtatggaaggc
gctgtaaattggacacccgttccgattgaaggagttggccttgggaagccttccgagggaaaacagagtatggacctaaa
gtcaagaaggcggacctctgccttgcctatgacatcttgacaactgtgtctgttacggcaacagggtattcgccaaata
cccagaaaatatagtagactattcaagcagctgtttcctgagggctactcttgggaacgaagcatgaattacgaagacgg
gggcatttgtaacgcgacaaacgacataacctggatggtgactgttatatctatgaaattcgattgatggtgtgaacttcc
tgccaatggtccagttatgcagaagaggactgtgaaatgggagccatccaactgagaaattgtatgtgcgtgatggagtgt
gaagggtgatgtaacatggctctgtcgttgaaggaggtggccattaccgatgtgacttcaaaactactataaagctaag
aaggtgtccagttgccagactatcacttgtggaccaccacattgagattaaagccacgacaaagattacagtaattgta
atctgcatgagcatgccgaagcgcattctgagctgccgagggcaggccaagaAGCTT**aagggaataaacttagat**
catagtggagcctatgttgacagttgaaagtagcctgggatgaagttcatatgacaaagaaggaaatgaagtttaactc
ataaaacatgggatggaaattatcaagataaaacagctcactattcaacagtaatacctctgaagctaatgcaagaata
taagaataaaagcaagagagtgtagcaggccttctgagaatggtggagagatgtataagtgaatgatgttccattac
aataatataatgttcatatggggaacactttatacctgcacttagtaatacatacataaCTCGAGcaccaccaaccac
caccaactga

A.2 PROPIEDADES FOTOFÍSICAS Y QUÍMICAS DE DRONPA

Dronpa es una proteína fluorescente que fue descubierta en corales de la familia Pectiniidae. El gen de dronpa se obtuvo a partir de bibliotecas de cDNA en 2004 y posteriormente fue expresada y purificada en *E. coli* (Ando, 2004). Dronpa es clasificada como una proteína fluorescente fotoactivable ya que se puede regular la transición por sus estados oscuro (no emisor) y activado (emisor) por medio de su iluminación con luz de distinta longitud de onda que corresponden a los picos máximos de su espectro de absorción, uno a 388 nm y otro a 503 nm (Habuchi et al., 2005).

Se sabe que el estado emisor y no emisor de Dronpa depende de la configuración molecular del fluorocromo dentro del barril β que lo rodea. Cuando el fluorocromo interacciona por medio de un puente de hidrógeno con la Arginina 66 del barril β se encuentra en una configuración molecular *cis* (**ON** en la **Figura A2**). En esta configuración, la geometría molecular del fluorocromo es plana y Dronpa tiene la capacidad de ser excitado con luz de 488 nm y emitir fluorescencia, a este se le denomina estado emisor. Después de emitir fluorescencia, el fluorocromo puede romper el enlace de puente de hidrógeno con la Arginina 66 y cambiar su configuración molecular de *cis* a *trans* (**OFF** en la **Figura A2**); en esta configuración Dronpa no tiene la capacidad de emitir fluorescencia, por lo cual se le denomina estado oscuro. La configuración en *trans* del fluorocromo en éste estado es muy estable y solo puede retornar a su configuración *cis* (estado emisor) cuando Dronpa es excitado con luz de 405 nm, lo cual ocurre sin emitir fluorescencia en el proceso. Este efecto de la luz de 405 nm de cambiar la configuración del fluorocromo de Dronpa de *trans* a *cis* se le conoce como fotoactivación (Warren et al., 2013; Kaucikas, Tros & van Thor, 2014).

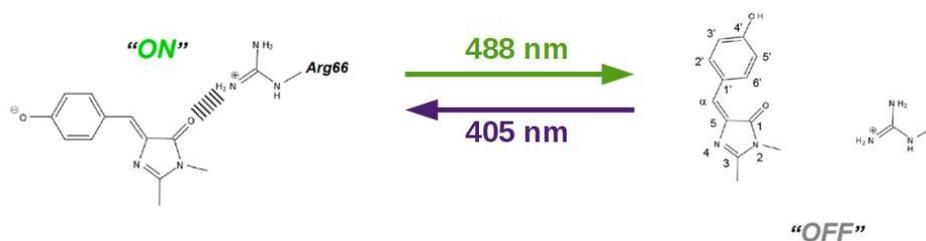


Figura A2. Configuraciones moleculares de Dronpa. El estado On corresponde al estado emisor en el cual el fluorocromo que interacciona con la Arg66 se encuentra en el estado *cis*. El estado OFF corresponde al estado no emisor *trans* en el cual no interacciona con Arg66. 488 nm y 405 nm son las longitudes de onda que

corresponde a los picos de absorción con los que se puede excitar el cromóforo de Dronpa y el efecto en su configuración molecular

Además, se sabe que el pH del medio en el que se encuentra Dronpa tiene un efecto sobre la emisión de su fluorescencia (Habuchi et al., 2005). El oxígeno del grupo fenol del fluorocromo de Dronpa puede encontrarse protonado o desprotonado en cualquiera de las dos configuraciones del fluorocromo, *cis* o *trans*. Sin embargo, cuando el estado emisor del fluorocromo (*cis*) se encuentra protonado éste no puede emitir fluorescencia, por lo cual se le considera un estado oscuro adicional (**A₁** en la **Figura A3**), el cual está en equilibrio químico con la forma no protonada (**B** en la **Figura A3**; Yadav et al., 2014; Higashino, Mizuno & Mizutani, 2016). Por lo tanto, la emisión de Dronpa disminuye en medios con pH ácidos.

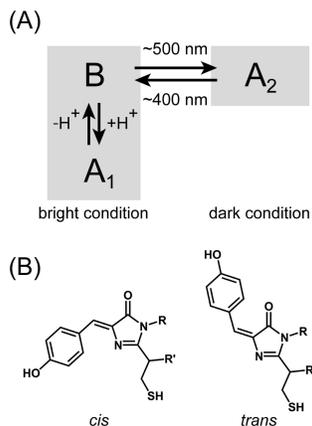


Figura A3. Protonación del cromóforo de Dronpa y su efecto en la fluorescencia. **A**, transición del estado oscuro **A₂** al estado emisor **B** dependiendo de la longitud de onda con la que es iluminado y la transición entre el estado oscuro **A₁** al estado emisor dependiendo del equilibrio químico entre su protonación o desprotonación. **B**, configuraciones moleculares del cromóforo en su estado protonado.

En resumen, refiriéndonos al diagrama de Jablonski de la transición de los estados del fluorocromo de Dronpa durante el fenómeno de fluorescencia (**Figura A4**), cuando Dronpa es iluminada con una longitud de onda de 488 nm, los electrones del estado emisor **B** (*cis*, no protonado) son excitados a un estado energético mayor, a partir del cual pueden regresar al estado basal (**B**) emitiendo fluorescencia ó entrar al estado oscuro **A₂** (*trans* protonado). El fluorocromo puede salir del estado **A₂** cuando es excitado con luz de 405 nm regresando al estado basal **B** a través de un intermediario no fluorescente **I** por medio de una reacción de transferencia de protón (ESPT) del estado excitado de **A₂** (Excitación de **A₂** →

Desprotonación de **A2** y relajación al estado **I** → modificación de *trans* no protonado a *cis* no protonado; Warren et al., 2013). El ciclo de fotoactivación de Dronpa se puede repetir iluminándola nuevamente con luz de 488 nm ó puede entrar a un segundo estado oscuro **A1** (*cis* protonado) que se encuentra en equilibrio químico con la forma **B** (*cis* no protonado).

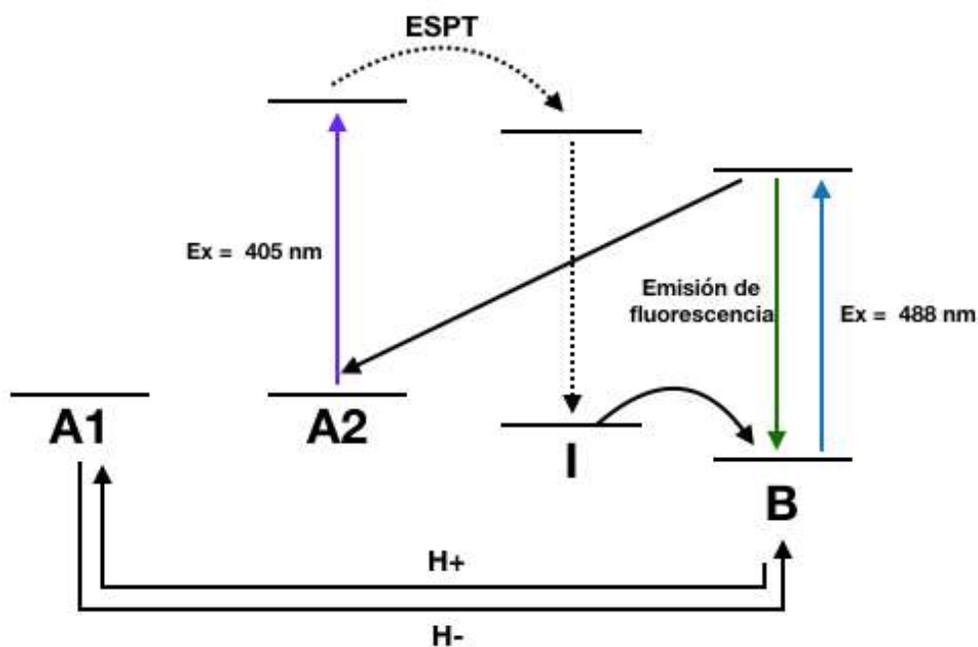


Figura A4. Diagrama de Jablonski de los estados de transición del fluorocromo de Dronpa.

A.3 SISTEMAS SECUESTRADORES DE OXÍGENO

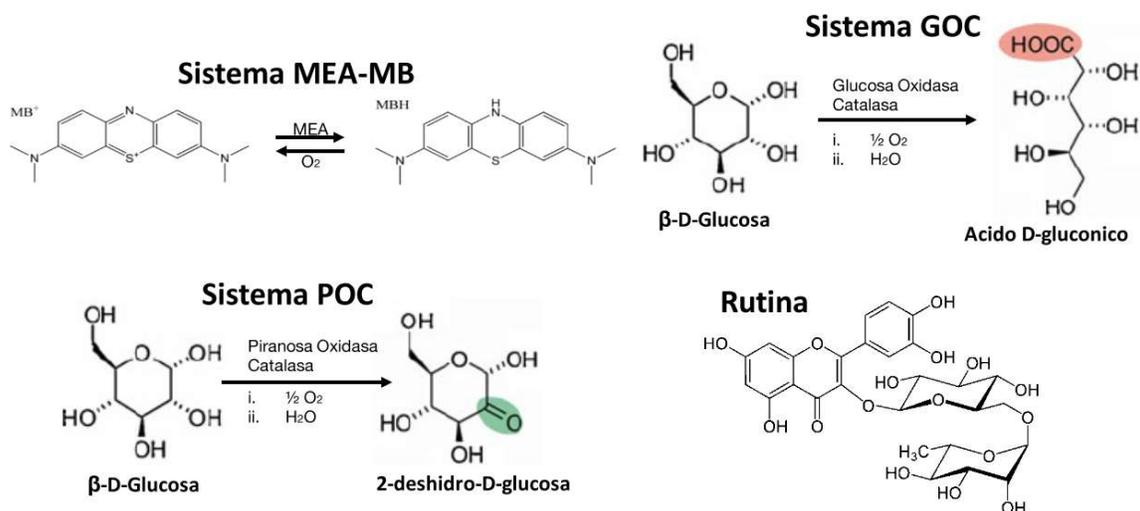


Figura A5. Sistemas secuestradores de oxígeno y anti-oxidantes

A.3.1 Sistema MEA-MB:

MEA-MB es la abreviación que se usa para llamar a al sistema secuestrador de oxígeno compuesto por Mercaptoetanolamina (MEA) y Azul de Metileno (MB). En este sistema el azul de metileno (MB) es reducido a su forma leucobase (MBH) por el agente reductor MEA. La leucobase MBH puede ser oxidada nuevamente a azul de metileno por el oxígeno presente en el medio (**Figura A5**) de tal forma que dicho oxígeno es consumido a través del tiempo, evitando así el fotoblanqueamiento de los fluoróforos por oxidación y de esta manera aumentando el tiempo medio de fotoblanqueo de la fluorescencia (Schäfer, van de Linde, Lehmann, Sauer & Doose, 2013).

A.3.2 Sistemas secuestradores de oxígeno GOC y POC:

GOC consiste en un sistema enzimático compuesto por la enzima Glucosa Oxidasa, Glucosa y la enzima Catalasa. La glucosa oxidasa oxida a la glucosa, disminuyendo la concentración de oxígeno molecular en el medio, pero genera peróxido de hidrógeno el cual es convertido a agua por la catalasa. Aunque este sistema es eficiente eliminando el

oxígeno del medio tiene la desventaja de modificar el pH ya que el compuesto final es un ácido carboxílico (**Figura A5**; Swoboda et al., 2012).

POC está compuesto por Piranosa oxidasa, Glucosa y Catalasa. Este sistema oxida a la glucosa sin generar intermediarios ácidos, por lo cual disminuye la concentración de oxígeno del medio sin cambiar el pH (**Figura A5**).

A.3.3 Medio de muestreo con Rutina:

Rutina (**Figura A5**) es un compuesto que se ha utilizado en microscopía de fluorescencia para aumentar el tiempo medio de la fluorescencia de EGFP en medios de cultivo con células vivas ya que se sabe es un antioxidante (Bogdanov, Kudryavtseva and Lukyanov, 2012). Debido a que Dronpa es similar a EGFP se decidió utilizar Rutina para intentar aumentar el tiempo medio de la fluorescencia en Dronpa al igual que ocurre con EGFP.

A.4 RELACION SEÑAL-RUIDO DE UNA IMAGEN

A grandes rasgos la relación S/R de una imagen es la comparación de cuantas veces mayor es el valor de intensidad de la fluorescencia registrado por el detector con respecto a los valores de intensidad del ruido del detector; un valor grande de S/R mejora la precisión de la localización de los emisores puntuales y evita la generación de artefactos en la imagen final debido a que los valores de intensidad del ruido son menores al valor promedio de la fluorescencia de la señal y por lo tanto son descartados por los algoritmos que generan las imágenes de súper-resolución (Thompson, Larson & Webb, 2002).

En los métodos de localización de molécula individual para poder hacer la reconstrucción de la imagen de súper-resolución se adquieren miles de imágenes de la estructura que se quiere resolver con el propósito de registrar el mayor número de fluoróforos individuales que se encuentran marcando dicha estructura. En cada imagen se captura un conjunto pequeño de fluoróforos individuales emitiendo fluorescencia los cuales se encuentran a una distancia mayor que el límite de resolución (distancia mayor a 200 nm) con el propósito de determinar su localización subpixélica, esto se realiza para cada uno de los fluoróforos detectados en cada imagen y al final se suman todas las localizaciones subpixélicas generando así la imagen final de súper resolución. Lo ideal sería hacer la localización de todos los fluoróforos que marcan la estructura para poder hacer su reconstrucción completa, lo cual no es posible ya que la emisión de algunos fluoróforos es irreversiblemente extinguida debido a efectos del fotoblanqueo por la oxidación del fluorocromo o, en el caso de las proteínas fluorescentes, la desnaturalización de la estructura de la proteína.

Los métodos de súper resolución que no se basan en la detección de moléculas individuales utilizan el análisis de la variación de la intensidad de las imágenes a través del tiempo para deducir la estructura que se encuentra limitada por la difracción. Estos métodos utilizan un menor número de imágenes (<100) pero suelen ocupar un mayor poder de cómputo para hacer el análisis.

A.5 MICROSCOPIA DE SÚPER-RESOLUCIÓN PALM

Este método consiste en la reconstrucción de imágenes con resolución nanométrica a partir de la localización precisa de moléculas fluorescentes individuales que transitan entre un estado oscuro (no emisor de fluorescencia) y un estado activado (emisor de fluorescencia).

Esto se logra mediante la activación con luz de una determinada longitud de onda de un conjunto de fluoróforos que se encuentran a una distancia mayor que la del límite de resolución. A estos emisores se les puede ajustar un modelo a su patrón de difracción que es proyectado en los detectores digitales llamado Función de Dispersión Puntual (PSF) a partir del cual se puede determinar la localización sub-pixélica de cada molécula, la cual corresponde al centro de su PSF. Esto se hace constantemente para un conjunto distinto de moléculas, de tal forma que después de la adquisición de miles de imágenes se obtiene la localización sub-pixélica de la mayoría de las moléculas que conforman a la estructura que se quiere visualizar a partir de las cuales se puede generar la imagen final de súper resolución (**Figura A5**; Betzig et al., 2006; Hess, Girirajan & Mason, 2006).



Figura A6. Principio del funcionamiento de Microscopia de localización de fotoactivación de fluorescencia FPALM. El objetivo de esta técnica es reconstruir la imagen de súper-resolución de una estructura sub-celular a partir de la localización de fluoróforos individuales en su estado activo, captados a través de miles de imágenes. Esto se logra con la manipulación de la activación y apagamiento de la fluorescencia por medio de la iluminación de los fluoróforos con luz de distintas longitudes de onda.

A.6 SUPER-RESOLUTION RADIAL FLUCTUATIONS (SRRF)

El método de SRRF es un método de súper-resolución que se basa en el análisis espacial y temporal de las fluctuaciones de la fluorescencia registrado en una secuencia de imágenes adquiridas por medio de microscopía de campo amplio o microscopía TIRF (Gustafsson et al., 2016). Este método genera imágenes de súper-resolución a partir de dicho análisis sin involucrar la detección y localización de fluoróforos individuales como en los métodos de PALM y STORM (Betzig et al., 2006; Hess, Girirajan & Mason, 2006; Rust, Bates & Zhuang, 2006). El algoritmo SRRF está implementado como un plugin de acceso libre de ImageJ.

El método de reconstrucción consiste en dos etapas: 1) análisis espacial en donde se calcula los mapas de radialidad de cada imagen de la secuencia de imágenes adquirida originalmente (**Figura A7 a**). 2) análisis temporal en donde se colapsa toda la información obtenida en el primer análisis, generando la imagen final de súper-resolución (**Figura A7 b**).

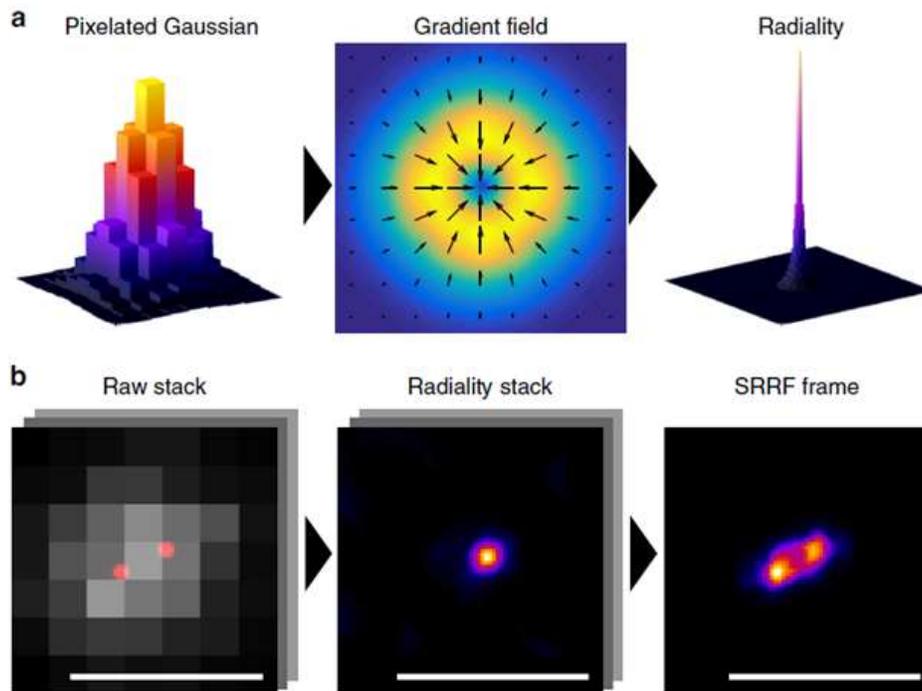


Figura A7. Generación de imágenes de súper resolución por medio del algoritmo de SRRF. a) ejemplo del cálculo del mapa de radialidad de una simulación de una PSF (función de dispersión de punto) de un fluoróforo proyectada sobre una imagen. Izquierda, gráfica de superficie 3D de una PSF pixelada. Centro, gráfica de superficie de la magnitud del gradiente (las flechas corresponden a la dirección del gradiente). Derecha, grafica de superficie 3D de la radialidad medida de la PSF. b) Análisis temporal de SRRF y generación de la imagen final. Izquierda, simulación de una secuencia de 100 imágenes de 2 fluoróforos separados a una distancia de 135 nm cuya emisión fluctúa a través del tiempo. Centro, mapas de radialidad (imágenes de radialidad) calculadas para cada una de las 100 imágenes de la secuencia original. Derecha,

imagen final de súper resolución en donde se observan los dos fluoróforos separados, obtenida a partir del análisis temporal de las 100 imágenes de radialidad calculadas previamente.

Los mapas de radialidad se obtienen de la siguiente manera:

Primero se calcula el gradiente de la imagen mediante la convolución de dicha imagen con un kernel para cada dirección XY de la imagen (**Figura A8 b** línea roja), definido como:

$$\mathbf{G}_x = [-1 \ 0 \ 1] * I$$

$$\mathbf{G}_y = \begin{bmatrix} -1 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} * I$$

Este kernel puede ser modificado por el usuario dependiendo de las características de las imágenes adquiridas, se puede hacer más grande para imágenes con una relación señal ruido baja.

Posteriormente se realiza un análisis a nivel sub-pixélico. Se divide cada uno de los pixeles de la imagen en subpixeles (magnificación del pixel, **Figura A8 a**); a partir de cada subpixel (**Figura A8 a** color naranja) se establece N puntos de muestreo de la radialidad (**Figura A8 a** puntos azules) a una distancia r_i del sub-pixel que se está analizando (**Figura A8 a** y **b** líneas naranjas). A partir de cada punto de muestreo se calcula la dirección del gradiente \mathbf{G}_i (**Figura A8** flecha negra) que se refiere a la dirección hacia la que se localiza la mayor intensidad de la señal (**Figura A8** estrella roja “*fluorophore position*”). A partir de estos datos se calculan dos valores:

1) La mínima distancia perpendicular d_i del sub-pixel analizado hacia la línea de dirección del gradiente \mathbf{G}_i (**Figura A8** línea negra) y 2) el producto punto Θ normalizado de \mathbf{G}_i con r_i . Con estos datos se calcula el grado de convergencia de la línea de gradiente al sub-pixel analizado mediante la ecuación:

$$c_i = \text{sgn}(\Theta) \left[\frac{(1 - d_i)}{|r_i|} \right]^2$$

En donde c_i puede tomar valores de -1 a 1 dependiendo del ángulo θ que hay entre \mathbf{G}_i y r_i . De tal forma que para gradientes que convergen el valor será positivo y para valores que divergen el valor será negativo.

Finalmente la radialidad para cada pixel X,Y de cada imagen(t) se calcula mediante la convergencia promedio de los N puntos de muestreo de la siguiente manera:

$$R_t(x, y) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N c_i.$$

Finalmente, estos valores pueden ser ponderados mediante la intensidad interpolada en el sub-pixel (X_c, Y_c). En los mapas de radialidad, los valores negativos de cada sub-pixel indican la ausencia de fluoróforos mientras que los valores positivos indican su presencia. Debido a que la ausencia de emisores en una imagen de la secuencia no disminuye la

probabilidad de su presencia en imágenes posteriores de la secuencia, los valores negativos de radialidad son escalados a cero.

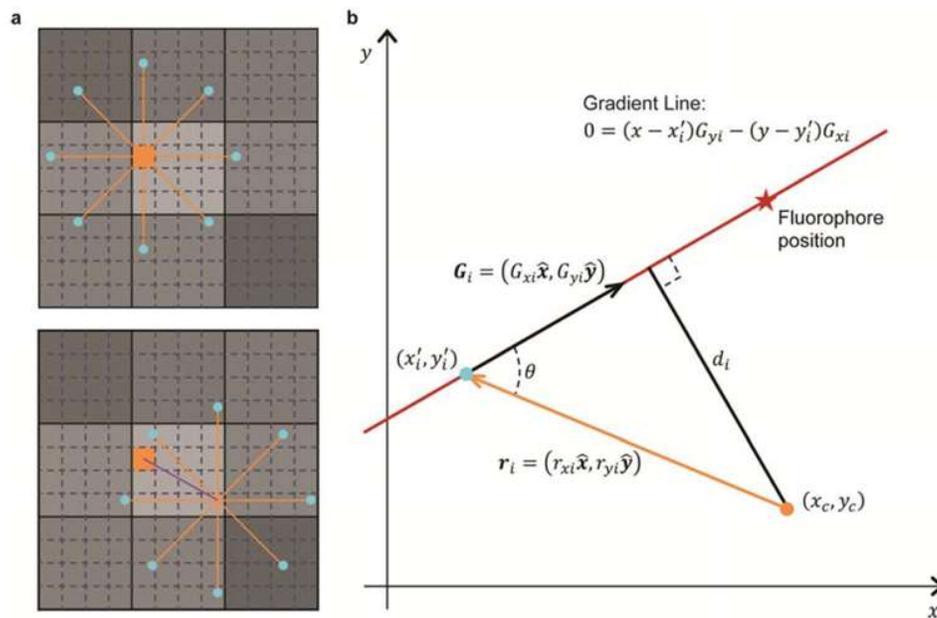


Figura A8. Fundamento teórico del cálculo de radialidad en el algoritmo de SRRF. a) arriba: análisis de la radialidad a partir de un subpixel (naranja). Abajo: corrección de movimiento utilizando un vector precalculado (línea morada) por el algoritmo de SRRF. **b)** Esquema de los valores calculados por el algo de SRRF descritos en el texto.

A.7 PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES

A.7.1 Publicación “Nanoscale organization of rotavirus replication machineries”

Debido a la experiencia técnica en el uso de los microscopios Confocal y TIRF obtenida durante mi proyecto de maestría fui invitado a colaborar en el proyecto *Nanoscale organization of rotavirus replication machineries* en colaboración con el grupo de investigación del Dr Carlos F Arias y la Dra Susana López del instituto de biotecnología, UNAM. Mi participación en este proyecto consistió en la adquisición de las imágenes de los viroplasmata (centros de replicación viral en las células infectadas) y en la estandarización de los protocolos de iluminación en el microscopio TIRF. También contribuí en el procesamiento de las imágenes para su análisis y en la reconstrucción de las mismas con el método de súper-resolución de “análisis bayesiano de fluctuaciones de la fluorescencia (3B)”. También aporte el protocolo para la preparación de los medios de muestreo, en este caso se utilizó el medio GLOX. Todo lo anterior fue posible gracias a lo aprendido durante el presente proyecto de maestría.

RESEARCH ARTICLE

Nanoscale organization of rotavirus replication machineries

Yasel Garcés Suárez^{1*}, Jose L Martínez^{1*}, David Torres Hernández^{1,2}, Haydee Olinca Hernández^{1,3}, Arianna Pérez-Delgado¹, Mayra Méndez³, Christopher D Wood^{1,2}, Juan Manuel Rendon-Mancha³, Daniela Silva-Ayala^{1,4}, Susana López¹, Adán Guerrero^{1,2*}, Carlos F Arias^{1*}

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ²Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ³Centro de Investigación en Ciencias, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico

Abstract: Rotavirus genome replication and assembly take place in cytoplasmic electron dense inclusions termed viroplasmata (VPs). Previous conventional optical microscopy studies observing the intracellular distribution of rotavirus proteins and their organization in VPs have lacked molecular-scale spatial resolution, due to inherent spatial resolution constraints. In this work we employed super-resolution microscopy to reveal the nanometric-scale organization of VPs formed during rotavirus infection, and quantitatively describe the structural organization of seven viral proteins within and around the VPs. The observed viral components are spatially organized as five concentric layers, in which NSP5 localizes at the center of the VPs, surrounded by a layer of NSP2 and NSP4 proteins, followed by an intermediate zone comprised of the VP1, VP2, VP6. In the outermost zone, we observed a ring of VP4 and finally a layer of VP7. These findings show that rotavirus VPs are highly organized organelles.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.42906>

Introduction

Rotavirus is a non-enveloped virus composed of three concentric layers of proteins that enclose a genome constituted by eleven segments of double stranded RNA (dsRNA) that encode six structural proteins (VP1 to VP4, VP5 and VP7) and six non-structural proteins (NSP1 to NSP6). The inner layer is formed by dimers of VP2 that enclose the viral genome and small numbers of molecules of the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), VP1, and the capping enzyme, VP3. This nucleoprotein complex constitutes the core of the virus, which is surrounded by an intermediate protein layer of trimers of VP6, to form double-layered particles (DLPs). The surface of the virion is occupied by two polypeptides, VP7, a glycoprotein, and VP4, which forms spikes that protrude from the VP7 shell (Estes and Greenberg, 2013). Replication of the rotavirus genome and assembly of DLPs take place in cytoplasmic electron dense inclusions termed viroplasmata (VPs) (Estes and Greenberg, 2013). Once the double-shelled particles are assembled, they bud from the cytoplasmic VPs into the adjacent endoplasmic reticulum (ER). During this process, which is mediated by the interaction of DLPs with the ER transmembrane viral protein NSP4, the particles acquire a temporary lipid bilayer, modified by VP7 and NSP4, which after being removed in the lumen of the ER by an unknown mechanism, yields the mature triple-layered virions (Estes and Greenberg, 2013). It has been reported that VP4 is located between the VP and the ER membrane and it is incorporated into triple-layered

***For correspondence:** adenog@ibt.unam.mx (ASG); arias@ibt.unam.mx (CFA)

[†]These authors contributed equally to this work

Present address: [†]Harvard Medical School, Boston, United States

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 14

Received: 17 October 2019
Accepted: 22 July 2019
Published: 25 July 2019

Reviewing editor: Arup K Chakraborty, Massachusetts Institute of Technology, United States

© Copyright Garcés Suárez et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Garcés Suárez et al. eLife 2019;8:e42906. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.42906> 1 of 33

A.7.2 Participación en el congreso “Focus On Microscopy 2019” llevado a cabo en Londres UK en Abril del 2019

Con parte de los resultados obtenidos en el presente proyecto de maestría se realizó un poster para su presentación en el congreso *Focus On Microscopy 2019* llevado a cabo en Londres UK en Abril del 2019.

El resumen del poster se puede consultar el siguiente link http://www.focusonmicroscopy.org/2019/PDF/1214_Torres-Hernandez.pdf

Este mismo poster fue presentado en el simposio de verano del 2019 del Instituto de Biotecnología, UNAM.



STUDY OF THE NANOSCOPIC ORGANIZATION OF CHOLESTEROL ENRICHED DOMAINS IN THE CELL MEMBRANE OF MOUSE SPERM



David Torres-Hernández, Angélica Esperanza Beltrán-Rodríguez, Adán Oswaldo Guerrero-Cárdenas, Alberto Darszon, Ma. Del Carmen Beltrán-Núñez, José Luis De la Vega-Beltrán, Christopher Wood
 Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

1. INTRODUCTION

Capacitation is an essential process of sperm maturation that occurs in the uterus. A key event for this process is the cholesterol efflux from the cell membrane. Evidence suggests cholesterol is a component of lipid nanodomains (lipid rafts) whose organization and distribution change due to its efflux during the capacitation, however until now it has not been possible to observe these nanodomains directly in the sperm. We propose the use of a cholesterol probe based on a evisioly photoactivatable fluorescent protein (Dronpa) fluorescent protein and super-resolution microscopy to imaging the cholesterol-enriched nanodomains directly in the cell membrane of mouse spermatozoa

2. MATERIALS & METHODS

2.1 Sample preparation:

Viable CDI mouse spermatozoa obtained by “swim up” technique were incubated with Dronpa-D4 and then fixed with PFA 4%. Dronpa-D4 was expressed and purified from *E. coli* BL21 by His-tag purification with Nickel Column.

2.2 Microscope Settings:

Imaging was performed on a 3i Marianas Yokogawa WI spinning disk confocal and sample was illuminated simultaneously with 488 nm and 405 nm lasers, with the latter intensity regulated to minimize dark-state permanence without inducing excessive photo bleaching (figure 1).

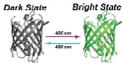


Figure 1. Photophysical properties of Dronpa.

2.3 Evaluation of different imaging media composition

PBS pH 6.9, Rutin in PBS pH 6.9 and PPD in PHEM buffer (PIPES 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 10 mM & MgCl 2 mM) pH 6.9 were used to reduce photo bleaching of Dronpa. Determination of the half-time of fluorescence photo bleaching (τ) to evaluate imaging media was performed as described in Figure 2.

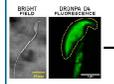


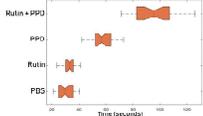
Figure 2. Determining the half-time of fluorescence photo bleaching (τ) from the video sequence.

2.4 Super-resolution microscopy:

We decided to use SRRF (super-resolution radial fluctuations) for super-resolution image reconstruction. The photoactivatable fluorescent protein Dronpa is suitable for single molecule localization microscopy such as PALM and STORM however our data set are composed of video sequences shorter than required by these methods. That is why we decided to use SRRF since only require a few hundreds of images to generate the final super-resolution image instead of thousands as PALM and STORM methods do. We are currently working in the generation of a protocol to perform PALM and STORM microscopy.

3. RESULTS

3.1 Half-time of fluorescence photo bleaching (τ) of Dronpa-D4 bound to cholesterol in fixed mouse spermatozoa membranes in different imaging media



Imaging media	half-time of fluorescence photo bleaching (mean ± SD, n = 5)	Significant difference to PBS 1 (p-value)
PBS pH 6.9	30.2 ± 5.8	
Rutin	22.8 ± 5	p = 0.0763
PPD	57.6 ± 8.1	p = 2.5497e-21
IP Phenylethylamine	95 ± 15.7	p = 1.6443e-28

3.2 Fluorescence patterns observed in capacitated and non capacitated mouse sperms due to cholesterol distribution

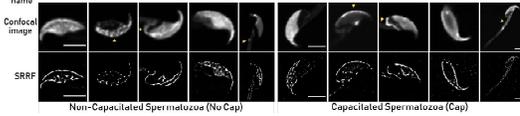


Figure 3. Representative images of the fluorescence patterns due to differential cholesterol distribution in the cell membrane of the spermatozoa. There are two different types of sperms corresponding to a different physiological condition each one (Cap and No Cap) four main fluorescence patterns were observed in both cases. A corresponds to a Dronpa-Ca distribution in a zone known as Equatorial Segment (ES) and Acrosome. B corresponds to Apical distribution (yellow arrowhead), C corresponds to ES distribution and distribution at the base of the head (yellow arrowhead). D shows a distribution all along the head. Finally, E shows the typical CD distribution and a presence of Dronpa-D4 along the mid piece of the flagellum (yellow arrowhead). SRRF correspond to super-resolution image reconstructions from the confocal images. Scale bars 4 microns.

3.3 Relative frequency of fluorescence patterns observed in Cap and No Cap mouse spermatozoa

Fluorescence pattern	Relative frequency (n = 5)	
	No Cap sperm	Cap sperm
A	54%	21.3%
B	15%	3.3%
C	20%	14.9%
D	5.5%	11.5%
E	5.5%	49%
Total	100%	100%

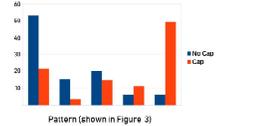


Figure 3. Relative frequency of fluorescence patterns observed in Cap and No Cap mouse spermatozoa.

4. CONCLUSIONS

The half-time of fluorescence photo bleaching using PPD or Rutin + PPD as an imaging medium could be increased from 30 to 57 seconds for PPD (twofold approx) and to 95 seconds for Rutin + PPD (threefold approx).

There are at least four fluorescence patterns associated to cholesterol distribution as indicated by the Dronpa-D4 probe in the cell membrane of mouse sperm.

The frequency among different patterns of cholesterol distribution are different between the two physiological conditions tested. Particularly the frequency of patterns A and differ greatly, being the most frequent in non capacitated spermatozoa and the most frequent in capacitated spermatozoa.

5. OUTLOOKS

We are currently working on improving an illumination protocol to make Dronpa blink with TIRF microscopy in order to be capable of perform PALM and STORM imaging.

While we have characterized differences in cholesterol distribution at the microscale between capacitated and non-capacitated sperm, we are also interested in analyzing any differences in distribution at the nanoscopic scale. We are currently performing cluster analysis using Ripley's function (K) in an attempt to delineate differences at sub-diffraction scales in potentially lipid raft distribution and size.

BIBLIOGRAPHY

Rogovin A, Kudryavtseva E, Lukyanov K (2012) Anti-Fading Media for Live Cell Super-Resolution Imaging. *J Cell Biol* 197:202-209.

Q) Rego E, Dhan L, Haskins J, Winkler L, Johnson G, Kamp Hughes, N., Davidson M, and Gustafson M (2018) Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoactivatable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(10): 5915-5920.

Quasthoff N, Cully S, Ashdown C, Owen D, Pereira P, and Henriques B (2016) Fast three-color super-resolution fluorescence microscopy with image through super-resolution radial fluctuations. *Nature Communications* 7(1)

ACKNOWLEDGMENTS

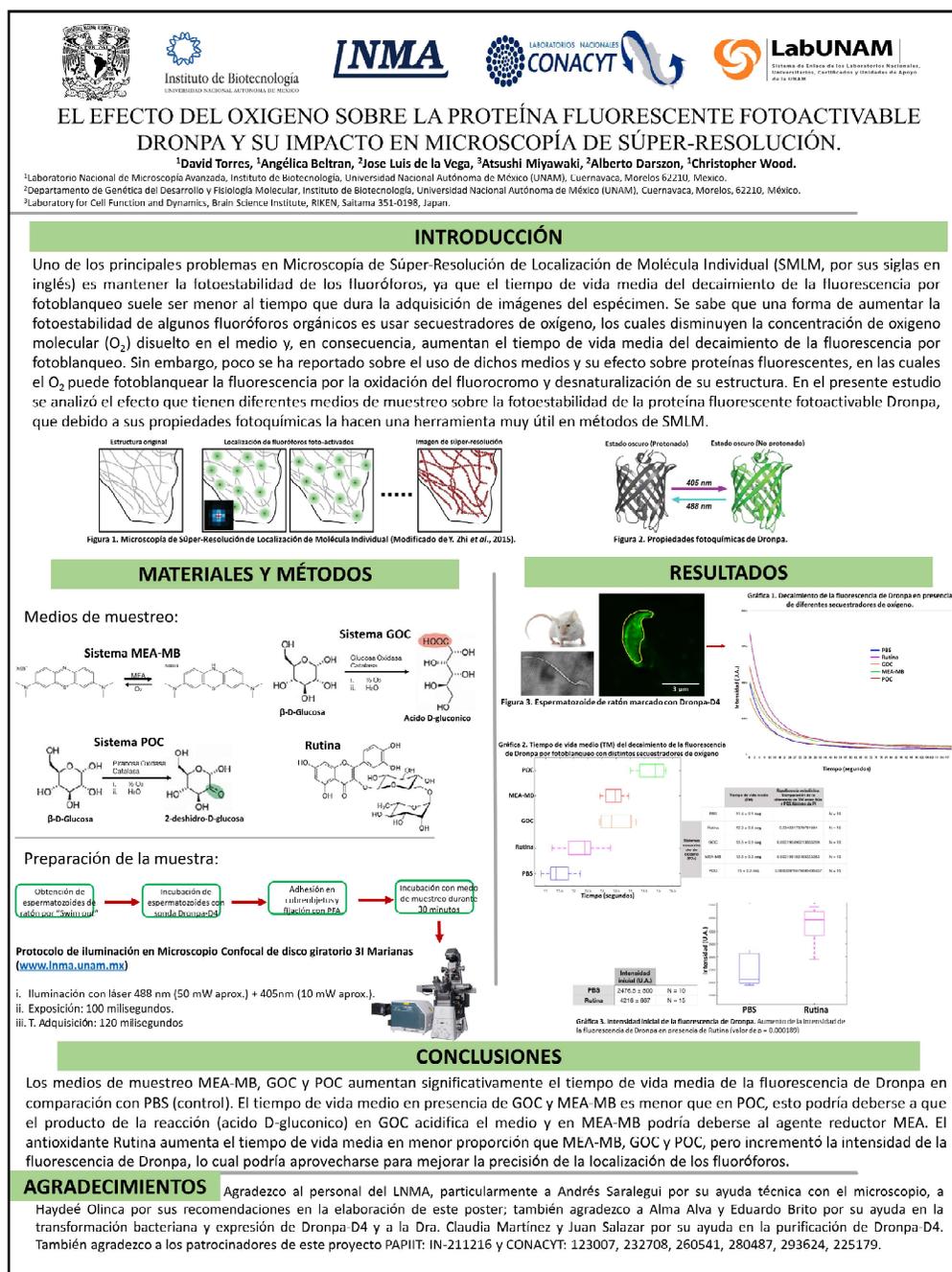
This work was supported by the program PAPIIT: IN-21216 from National University Autonomous of Mexico (UNAM) and CONACYT: 1250077, 233708, 365650, 2801687, 295624, 225179 as well as the CONACYT master grant 631097.

CONTACT INFORMATION

David Torres Hernandez
 Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
 Mail address: Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62100.
 Phone: (52 777) 3291867
 Email: davidth@iit.unam.mx

A.7.3 Presentación de poster en la semana académica de invierno 2017 llevado a cabo en el Instituto de Biotecnología en Diciembre del 2017

Los resultados obtenidos durante el proyecto de maestría sobre el efecto de diferentes medios de muestreo secuestradores de oxígeno para reducir el fotoblanqueo de Dronpa fueron presentados en un poster en la semana académica de invierno 2017.



BIBLIOGRAFÍA

Alasmari, W., Costello, S., Correia, J., Oxenham, S., Morris, J., & Fernandes, L. et al. (2013). Ca²⁺ Signals Generated by CatSper and Ca²⁺ Stores Regulate Different Behaviors in Human Sperm. *Journal Of Biological Chemistry*, 288(9), 6248-6258. doi: 10.1074/jbc.m112.439356

Albrechtová, J., Albrecht, T., Ďureje, L., Pallazola, V., & Piálek, J. (2014). Sperm Morphology in Two House Mouse Subspecies: Do Wild-Derived Strains and Wild Mice Tell the Same Story?. *Plos ONE*, 9(12), e115669. doi: 10.1371/journal.pone.0115669

Alessandra Cambi & Diane S. Lidke (2015). Cell Membrane Nanodomains: From Biochemistry to Nanoscopy. CRC Press Taylor & Francis Group. International Standard Book Number-13: 978-1-4822-0991-4 (eBook – PDF).

Ando, R. (2004). Regulated Fast Nucleocytoplasmic Shuttling Observed by Reversible Protein Highlighting. *Science*, 306(5700), 1370-1373. doi: 10.1126/science.1102506

Asano, A., Nelson, J., Zhang, S., & Travis, A. (2010). Characterization of the proteomes associating with three distinct membrane raft sub-types in murine sperm. *PROTEOMICS*, 10(19), 3494-3505. doi: 10.1002/pmic.201000002

Asano, A., Nelson-Harrington, J., & Travis, A. (2013). Phospholipase B Is Activated in Response to Sterol Removal and Stimulates Acrosome Exocytosis in Murine Sperm. *Journal Of Biological Chemistry*, 288(39), 28104-28115. doi: 10.1074/jbc.m113.450981

Asano, A., Selvaraj, V., Buttke, D., Nelson, J., Green, K., Evans, J., & Travis, A. (2009). Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: Identification of three distinct sub-types of membrane rafts. *Journal Of Cellular Physiology*, 218(3), 537-548. doi: 10.1002/jcp.21623

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K., 1999. Short protocols in molecular biology. Cuarta edición. Michigan: Wiley.

B. M. Gadella & R. A. P. Harrison. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* (127), 2407-2420.

B. M. Gadella & R. A. P. Harrison. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* (127), 2407-2420.

Baumgart, F., Arnold, A., Leskovar, K., Staszek, K., Fölser, M., & Weghuber, J. et al.

(2016). Varying label density allows artifact-free analysis of membrane-protein nanoclusters. *Nature Methods*, 13(8), 661-664. doi: 10.1038/nmeth.3897

Belmonte, S., López, C., Roggero, C., De Blas, G., Tomes, C., & Mayorga, L. (2005). Cholesterol content regulates acrosomal exocytosis by enhancing Rab3A plasma membrane association. *Developmental Biology*, 285(2), 393-408. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.07.001

Bernabò, N., Agostino, R., Ordinelli, A., Mattioli, M., & Barboni, B. (2016). The maturation of murine spermatozoa membranes within the epididymis, a computational biology perspective. *Systems Biology In Reproductive Medicine*, 62(5), 299-308. doi: 10.1080/19396368.2016.1205679

Betzig, E., Patterson, G., Sougrat, R., Lindwasser, O., Olenych, S., & Bonifacino, J. et al. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313(5793), 1642-1645. doi: 10.1126/science.1127344

Bogdanov, A., Kudryavtseva, E., & Lukyanov, K. (2012). Anti-Fading Media for Live Cell GFP Imaging. *Plos ONE*, 7(12), e53004. doi: 10.1371/journal.pone.0053004

Brukman, N., Nuñez, S., Puga Molina, L., Buffone, M., Darszon, A., Cuasnicu, P., & Da Ros, V. (2018). Tyrosine phosphorylation signaling regulates Ca²⁺ entry by affecting intracellular pH during human sperm capacitation. *Of Cellular Physiology*. doi: 10.1002/jcp.27337

Buttke, D., Nelson, J., Schlegel, P., Hunnicutt, G., & Travis, A. (2006). Visualization of GM1 with Cholera Toxin B in Live Epididymal Versus Ejaculated Bull, Mouse, and Human Spermatozoa. *Biology Of Reproduction*, 74(5), 889-895. doi: 10.1095/biolreprod.105.046219

Carquin, M., D'Auria, L., Pollet, H., Bongarzone, E., & Tyteca, D. (2016). Recent progress on lipid lateral heterogeneity in plasma membranes: From rafts to submicrometric domains. *Progress In Lipid Research*, 62, 1-24. doi: 10.1016/j.plipres.2015.12.004

Chung, J., Shim, S., Everley, R., Gygi, S., Zhuang, X., & Clapham, D. (2014). Structurally Distinct Ca²⁺ Signaling Domains of Sperm Flagella Orchestrate Tyrosine Phosphorylation and Motility. *Cell*, 157(4), 808-822. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.056

Cloudy, P., Létoffé, J., Germain, P., Bastide, J., Bayol, A., & Blasquez, S. et al. (1991). Physicochemical characterization of cholesterol-beta cyclodextrin inclusion complexes. *Journal Of Thermal Analysis*, 37(11-12), 2497-2506. doi: 10.1007/bf01912796

Cohen, R., Buttke, D., Asano, A., Mukai, C., Nelson, J., & Ren, D. et al. (2014). Lipid Modulation of Calcium Flux through CaV2.3 Regulates Acrosome Exocytosis and

- Fertilization. *Developmental Cell*, 28(3), 310-321. doi: 10.1016/j.devcel.2014.01.005
- Cohen, R., Mukai, C., & Travis, A. (2016). Lipid Regulation of Acrosome Exocytosis. *Sperm Acrosome Biogenesis And Function During Fertilization*, 107-127. doi: 10.1007/978-3-319-30567-7_6
- Danielli, J., & Davson, H. (1935). A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal Of Cellular And Comparative Physiology*, 5(4), 495-508. doi: 10.1002/jcp.1030050409
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. (2011). Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiological Reviews*, 91(4), 1305-1355. doi: 10.1152/physrev.00028.2010
- delBarco-Trillo, J., & Roldan, E. (2013). Effects of metabolic rate and sperm competition on the fatty-acid composition of mammalian sperm. *Journal Of Evolutionary Biology*, 27(1), 55-62. doi: 10.1111/jeb.12275
- Demarco, I., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., de la Vega-Beltrán, J., & Hockensmith, J. et al. (2002). Involvement of a Na⁺/HCO Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation. *Journal Of Biological Chemistry*, 278(9), 7001-7009. doi: 10.1074/jbc.m206284200
- Dubois, L., Ronquist, K., Ek, B., Ronquist, G., & Larsson, A. (2015). Proteomic Profiling of Detergent Resistant Membranes (Lipid Rafts) of Prostatomes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(11), 3015-3022. doi: 10.1074/mcp.m114.047530
- Edidin, M. (2003). Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(5), 414-418. doi: 10.1038/nrm1102
- Eisenbach, M., Cerezales, S., & Boryshpolets, S. (2015). Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance. *Asian Journal Of Andrology*, 17(4), 628. doi: 10.4103/1008-682x.154308
- Endesfelder, U., & Heilemann, M. (2014). Art and artifacts in single-molecule localization microscopy: beyond attractive images. *Nature Methods*, 11(3), 235-238. doi: 10.1038/nmeth.2852
- Ernesto, J., Weigel Muñoz, M., Battistone, M., Vasen, G., Martínez-López, P., & Orta, G. et al. (2015). CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *The Journal Of Cell Biology*, 210(7), 1213-1224. doi: 10.1083/jcb.201412041
- Fishman, E., Jo, K., Nguyen, Q., Kong, D., Royfman, R., & Cekic, A. et al. (2018). A novel atypical sperm centriole is functional during human fertilization. *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-04678-8

Frits M. Flesch, Jos F. H. M. Brouwers, Patricia F. E. M. Nievelstein, Arie J. Verkleij, Lambert M. G. van Golde, Ben Colenbrander, Barend M. Gadella. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science* 2001 114: 3543-3555;

Fujita, A., Cheng, J., Hirakawa, M., Furukawa, K., Kusunoki, S., & Fujimoto, T. (2007). Gangliosides GM1 and GM3 in the Living Cell Membrane Form Clusters Susceptible to Cholesterol Depletion and Chilling. *Molecular Biology Of The Cell*, 18(6), 2112-2122. doi: 10.1091/mbc.e07-01-0071

Gadella, B., & Leahy, T. (2015). New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian Journal Of Andrology*, 17(4), 561. doi: 10.4103/1008-682x.153309

Gadella, B., & Luna, C. (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*, 81(1), 74-84. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.005

Gaibelet, G., Tercé, F., Allart, S., Lebrun, C., Collet, X., Jamin, N., & Orlowski, S. (2017). Fluorescent probes for detecting cholesterol-rich ordered membrane microdomains: entangled relationships between structural analogies in the membrane and functional homologies in the cell. *AIMS Biophysics*, 4(1), 121-151. doi: 10.3934/biophy.2017.1.121

Goldman, J., Andrews, S., & Bray, D. (2004). Size and composition of membrane protein clusters predicted by Monte Carlo analysis. *European Biophysics Journal*, 33(6), 506-512. doi: 10.1007/s00249-004-0391-6

Gustafsson, N., Culley, S., Ashdown, G., Owen, D., Pereira, P., & Henriques, R. (2016). Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nature Communications*, 7(1). doi: 10.1038/ncomms12471

Habuchi, S., Ando, R., Dedecker, P., Verheijen, W., Mizuno, H., Miyawaki, A., & Hofkens, J. (2005). From The Cover: Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 102(27), 9511-9516. doi: 10.1073/pnas.0500489102

Harrison, R., & Miller, N. (2000). cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Molecular Reproduction And Development*, 55(2), 220-228.

Hendler, R. (1971). Biological membrane ultrastructure. *Physiological Reviews*, 51(1), 66-97. doi: 10.1152/physrev.1971.51.1.66

- Hermo, L., Pelletier, R., Cyr, D., & Smith, C. (2009). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 3: Developmental changes in spermatid flagellum and cytoplasmic droplet and interaction of sperm with the zona pellucida and egg plasma membrane. *Microscopy Research And Technique*, NA-NA. doi: 10.1002/jemt.20784
- Herrick, S., Schweissinger, D., Kim, S., Bayan, K., Mann, S., & Cardullo, R. (2004). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *Journal Of Cellular Physiology*, 202(3), 663-671. doi: 10.1002/jcp.20172
- Hess, S., Girirajan, T., & Mason, M. (2006). Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical Journal*, 91(11), 4258-4272. doi: 10.1529/biophysj.106.091116
- Higashino, A., Mizuno, M., & Mizutani, Y. (2016). Chromophore Structure of Photochromic Fluorescent Protein Dronpa: Acid-Base Equilibrium of Two Cis Configurations. *The Journal Of Physical Chemistry B*, 120(13), 3353-3359. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b01752
- Inaba, K. (2003). Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zoological Science*, 20(9), 1043-1056. doi: 10.2108/zsj.20.1043
- Ishikawa, T. (2015). Cryo-electron tomography of motile cilia and flagella. *Cilia*, 4(1), 3. doi: 10.1186/s13630-014-0012-7
- James, P. (2004). Compartmentalisation of the sperm plasma membrane: a FRAP, FLIP and SPFI analysis of putative diffusion barriers on the sperm head. *Journal Of Cell Science*, 117(26), 6485-6495. doi: 10.1242/jcs.01578
- Jin, S., & Yang, W. (2016). Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated?. *Oncotarget*, 8(2). doi: 10.18632/oncotarget.12274
- Kaucikas, M., Tros, M., & van Thor, J. (2014). Photoisomerization and Proton Transfer in the Forward and Reverse Photoswitching of the Fast-Switching M159T Mutant of the Dronpa Fluorescent Protein. *The Journal Of Physical Chemistry B*, 119(6), 2350-2362. doi: 10.1021/jp506640q
- Kwitny, S., Klaus, A., & Hunnicutt, G. (2010). The Annulus of the Mouse Sperm Tail Is Required to Establish a Membrane Diffusion Barrier That Is Engaged During the Late Steps of Spermiogenesis1. *Biology Of Reproduction*, 82(4), 669-678. doi: 10.1095/biolreprod.109.079566
- Lagache, T., Lang, G., Sauvonnnet, N., & Olivo-Marin, J. (2013). Analysis of the Spatial Organization of Molecules with Robust Statistics. *Plos ONE*, 8(12), e80914.

doi: 10.1371/journal.pone.0080914

Lakowicz, J. (2013). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3rd ed.). New York, NY: Springer.

Lishko, P., & Mannowetz, N. (2018). CatSper: a unique calcium channel of the sperm flagellum. *Current Opinion In Physiology*, 2, 109-113. doi: 10.1016/j.cophys.2018.02.004

Lombardi, J. (2012). *Comparative vertebrate reproduction* (pp. 202-208). New York: Springer.

Luque, G., Dalotto-Moreno, T., Martín-Hidalgo, D., Ritagliati, C., Puga Molina, L., & Romarowski, A. et al. (2018). Only a subpopulation of mouse sperm displays a rapid increase in intracellular calcium during capacitation. *Journal Of Cellular Physiology*, 233(12), 9685-9700. doi: 10.1002/jcp.26883

Ma, H., Fu, R., Xu, J., & Liu, Y. (2017). A simple and cost-effective setup for super-resolution localization microscopy. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-01606-6

Mark S Wuttke, Jochen Buck & Lonny R Levin. (2001) Bicarbonate-Regulated Soluble Adenylyl Cyclase. *JOP. J. Pancreas (Online) 2001; 2(4 Suppl):154-158*.

Martin-Hidalgo, D., Hurtado de Llera, A., Calle-Guisado, V., Gonzalez-Fernandez, L., Garcia-Marin, L., & Bragado, M. (2018). AMPK Function in Mammalian Spermatozoa. *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(11), 3293. doi: 10.3390/ijms19113293

Medarde, N., Muñoz-Muñoz, F., López-Fuster, M., & Ventura, J. (2013). Variational modularity at the cell level: insights from the sperm head of the house mouse. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 179. doi: 10.1186/1471-2148-13-179

Membrane Proteins - Lessons - Tes Teach. (2020). Retrieved 15 May 2020, from <https://www.tes.com/lessons/GH4IZSU6Aezlog/membrane-proteins>

Miki, K., Willis, W., Brown, P., Goulding, E., Fulcher, K., & Eddy, E. (2002). Targeted Disruption of the Akap4 Gene Causes Defects in Sperm Flagellum and Motility. *Developmental Biology*, 248(2), 331-342. doi: 10.1006/dbio.2002.0728

Mizuno, H., Abe, M., Dedecker, P., Makino, A., Rocha, S., & Ohno-Iwashita, Y. et al. (2011). Fluorescent probes for superresolution imaging of lipid domains on the plasma membrane. *Chemical Science*, 2(8), 1548. doi: 10.1039/c1sc00169h

Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review*, 227-256. doi: 10.1016/s1387-

2656(05)11007-2

Morigaki, K., & Tanimoto, Y. (2018). Evolution and development of model membranes for physicochemical and functional studies of the membrane lateral heterogeneity. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(10), 2012-2017. doi: 10.1016/j.bbamem.2018.03.010

Mortimer, D. (2018). The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *MHR: Basic Science Of Reproductive Medicine*. doi: 10.1093/molehr/gay040

Ohad Gal (2020). fit_ellipse (https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/3215-fit_ellipse), MATLAB Central File Exchange. Retrieved April 14, 2020.

Owen, D., Williamson, D., Magenau, A., & Gaus, K. (2012). Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution. *Nature Communications*, 3(1). doi: 10.1038/ncomms2273

Parks, J., & Lynch, D. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2), 255-266. doi: 10.1016/0011-2240(92)90024-v

Pike, L. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal Of Lipid Research*, 47(7), 1597-1598. doi: 10.1194/jlr.e600002-jlr200

Pitnick, S., Wolfner, M., & Dorus, S. (2019). Post-ejaculatory modifications to sperm (PEMS). *Biological Reviews*, 95(2), 365-392. doi: 10.1111/brv.12569

R. Mackie, A., S. James, P., Ladha, S., & Jones, R. (2001). Diffusion Barriers in Ram and Boar Sperm Plasma Membranes: Directionality of Lipid Diffusion Across the Posterior Ring1. *Biology Of Reproduction*, 64(1), 113-119. doi: 10.1095/biolreprod64.1.113

Rahbek-Clemmensen, T., Lycas, M., Erlendsson, S., Eriksen, J., Apuschkin, M., & Vilhardt, F. et al. (2017). Super-resolution microscopy reveals functional organization of dopamine transporters into cholesterol and neuronal activity-dependent nanodomains. *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-00790-3

Rego, E., Shao, L., Macklin, J., Winoto, L., Johansson, G., & Kamps-Hughes, N. et al. (2011). Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(3), E135-E143. doi: 10.1073/pnas.1107547108

Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., & Frenoux, J. et al. (2006).

Lipid Remodeling of Murine Epididymosomes and Spermatozoa During Epididymal Maturation. *Biology Of Reproduction*, 74(6), 1104-1113. doi: 10.1095/biolreprod.105.049304

Roggero, C., De Blas, G., Dai, H., Tomes, C., Rizo, J., & Mayorga, L. (2007). Complexin/Synaptotagmin Interplay Controls Acrosomal Exocytosis. *Journal Of Biological Chemistry*, 282(36), 26335-26343. doi: 10.1074/jbc.m700854200

Rust, M., Bates, M., & Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, 3(10), 793-796. doi: 10.1038/nmeth929

Schäfer, P., van de Linde, S., Lehmann, J., Sauer, M., & Doose, S. (2013). Methylene Blue- and Thiol-Based Oxygen Depletion for Super-Resolution Imaging. *Analytical Chemistry*, 85(6), 3393-3400. doi: 10.1021/ac400035k

Schäfer, P., van de Linde, S., Lehmann, J., Sauer, M., & Doose, S. (2013). Methylene Blue- and Thiol-Based Oxygen Depletion for Super-Resolution Imaging. *Analytical Chemistry*, 85(6), 3393-3400. doi: 10.1021/ac400035k

Schatten, H. (2004). *Germ cell protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press.

Selvaraj, V., Asano, A., Buttke, D., McElwee, J., Nelson, J., & Wolff, C. et al. (2006). Segregation of micron-scale membrane sub-domains in live murine sperm. *Journal Of Cellular Physiology*, 206(3), 636-646. doi: 10.1002/jcp.20504

Selvaraj, V., Asano, A., Buttke, D., Sengupta, P., Weiss, R., & Travis, A. (2009). Mechanisms underlying the micron-scale segregation of sterols and GM1 in live mammalian sperm. *Journal Of Cellular Physiology*, 218(3), 522-536. doi: 10.1002/jcp.21624

Selvaraj, V., Buttke, D., Asano, A., McElwee, J., Wolff, C., & Nelson, J. et al. (2007). GM1 Dynamics as a Marker for Membrane Changes Associated With the Process of Capacitation in Murine and Bovine Spermatozoa. *Journal Of Andrology*, 28(4), 588-599. doi: 10.2164/jandrol.106.002279

Singer, S., & Nicolson, G. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, 175(4023), 720-731. doi: 10.1126/science.175.4023.720

Skerget, S., Rosenow, M., Petritis, K., & Karr, T. (2015). Sperm Proteome Maturation in the Mouse Epididymis. *PLOS ONE*, 10(11), e0140650. doi: 10.1371/journal.pone.0140650

Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N., Weyand, I., Seifert, R., & Kaupp, U. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature*, 471(7338), 382-386. doi: 10.1038/nature09769

Swoboda, M., Henig, J., Cheng, H., Brugger, D., Haltrich, D., Plumeré, N., & Schlierf, M. (2012). Enzymatic Oxygen Scavenging for Photostability without pH Drop in Single-Molecule Experiments. *ACS Nano*, 6(7), 6364-6369. doi: 10.1021/nn301895c

Thompson, R., Larson, D., & Webb, W. (2002). Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophysical Journal*, 82(5), 2775-2783. doi: 10.1016/s0006-3495(02)75618-x

Thompson, R., Larson, D., & Webb, W. (2002). Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophysical Journal*, 82(5), 2775-2783. doi: 10.1016/s0006-3495(02)75618-x

Tomes, C., Michaut, M., Blas, G., Visconti, P., Matti, U., & Mayorga, L. (2002). SNARE Complex Assembly Is Required for Human Sperm Acrosome Reaction. *Developmental Biology*, 243(2), 326-338. doi: 10.1006/dbio.2002.0567

Travis, A., & Kopf, G. (2002). The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *Journal Of Clinical Investigation*, 110(6), 731-736. doi: 10.1172/jci0216392

Treviño, C., Serrano, C., Beltrán, C., Felix, R., & Darszon, A. (2001). Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Letters*, 509(1), 119-125. doi: 10.1016/s0014-5793(01)03134-9

Tsai, P., Garcia-Gil, N., van Haften, T., & Gadella, B. (2010). How Pig Sperm Prepares to Fertilize: Stable Acrosome Docking to the Plasma Membrane. *Plos ONE*, 5(6), e11204. doi: 10.1371/journal.pone.0011204

Tsukamoto, M., Hiyama, E., Hirotani, K., Gotoh, T., Inai, T., & Iida, H. (2016). Translocation of Tektin 3 to the equatorial segment of heads in bull spermatozoa exposed to dibutyryl cAMP and calyculin A. *Molecular Reproduction And Development*, 84(1), 30-43. doi: 10.1002/mrd.22763

van Gestel, R., Brewis, I., Ashton, P., Helms, J., Brouwers, J., & Gadella, B. (2005). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *MHR: Basic Science Of Reproductive Medicine*, 11(8), 583-590. doi: 10.1093/molehr/gah200

van Gestel, R., Helms, J., Brouwers, J., & Gadella, B. (2005). Effects of methyl- β -cyclodextrin-mediated cholesterol depletion in porcine sperm compared to somatic cells. *Molecular Reproduction And Development*, 72(3), 386-395. doi: 10.1002/mrd.20351

van Meer, G., & Simons, K. (1988). Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *Journal Of Cellular Biochemistry*, 36(1), 51-58. doi: 10.1002/jcb.240360106

- van Meer, G., Voelker, D., & Feigenson, G. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(2), 112-124. doi: 10.1038/nrm2330
- Varea Sánchez, M., Bastir, M., & Roldan, E. (2013). Geometric Morphometrics of Rodent Sperm Head Shape. *Plos ONE*, *8*(11), e80607. doi: 10.1371/journal.pone.0080607
- Visconti, P., Ning, X., Fornés, M., Alvarez, J., Stein, P., Connors, S., & Kopf, G. (1999). Cholesterol Efflux-Mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm: Cholesterol Release Signals an Increase in Protein Tyrosine Phosphorylation during Mouse Sperm Capacitation. *Developmental Biology*, *214*(2), 429-443. doi: 10.1006/dbio.1999.9428
- Waheed, A., & Freed, E. (2009). Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. *Virus Research*, *143*(2), 162-176. doi: 10.1016/j.virusres.2009.04.007
- Warren, M., Kaucikas, M., Fitzpatrick, A., Champion, P., Timothy Sage, J., & van Thor, J. (2013). Ground-state proton transfer in the photoswitching reactions of the fluorescent protein Dronpa. *Nature Communications*, *4*(1). doi: 10.1038/ncomms2460
- Wolfe, C., James, P., Mackie, A., Ladha, S., & Jones, R. (1998). Regionalized Lipid Diffusion in the Plasma Membrane of Mammalian Spermatozoa. *Biology Of Reproduction*, *59*(6), 1506-1514. doi: 10.1095/biolreprod59.6.1506
- Xinlei, W., & Naifeng, L. (2016). Super-resolution of remote sensing images via sparse structural manifold embedding. *Neurocomputing*, *173*, 1402-1411. doi: 10.1016/j.neucom.2015.09.012
- Yadav, D., Lacomat, F., Dozova, N., Rappaport, F., Plaza, P., & Espagne, A. (2014). Real-Time Monitoring of Chromophore Isomerization and Deprotonation during the Photoactivation of the Fluorescent Protein Dronpa. *The Journal Of Physical Chemistry B*, *119*(6), 2404-2414. doi: 10.1021/jp507094f
- Zhang, X., Zhang, M., Li, D., He, W., Peng, J., Betzig, E., & Xu, P. (2016). Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, *113*(37), 10364-10369. doi: 10.1073/pnas.1611038113
- Zitranski, N., Borth, H., Ackermann, F., Meyer, D., Vieweg, L., & Breit, A. et al. (2010). The "acrosomal synapse". *Communicative & Integrative Biology*, *3*(6), 513-521. doi: 10.4161/cib.3.6.13137