



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Ciencia Animal

Las vesículas extracelulares de plasma seminal regulan la funcionalidad de los espermatozoides de epidídimo en la especie porcina.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción

AUTOR/A: Moya Fernández, Ana

Tutor/a: Ibáñez Escriche, Noelia

Cotutor/a externo: Matas Parra, Carmen

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Ciencia Animal

Las vesículas extracelulares de plasma seminal regulan la funcionalidad de los espermatozoides de epidídimo en la especie porcina.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Animal y
Biotecnología de la Reproducción

Curso 2023/2024

Autora: Ana Moya Fernández

Tutorizado por: Carmen Matás Parra



UNIVERSIDAD
DE MURCIA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Agradecimientos

Durante este año he reflexionado mucho sobre lo afortunada que soy, entre uno de los motivos por los que he llegado a la conclusión de ello, ha sido en parte gracias a la elección de este máster, ya que no solo he aprendido y sigo aprendiendo muchísimo, si no que he conocido gente fantástica y he vivido experiencias inolvidables.

En primer lugar, agradecer a mi jefa y tutora Carmen, por guiarme durante este trayecto. Gracias por todas las oportunidades que me has dado, cada día contigo es un aprendizaje nuevo que hace que me sienta llena por dentro con este trabajo.

Gracias Santa, no he podido tener mejor profesora que tú. Gracias por las risas, por el apoyo en los momentos de bajón y por ayudarme siempre, has hecho que todo sea más fácil. Soy muy afortunada de tenerte como compañera.

Agradecer a Celia, Sonia, Cristina, María, Laura y una vez más a Santa por los momentos de risas y por las largas horas de almuerzo hablando de todo tipo de temas, por la ayuda y por todo el apoyo que me habéis dado.

Agradecer al departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia por confiar en mí y por la oportunidad que me habéis dado de estar aprendiendo con vosotros. Todos vosotros habéis hecho que me apasione aún más el mundo de la reproducción animal.

Agradecer a mis amigas, por permanecer siempre a mi lado y apoyarme. Siempre lo digo, vosotras sois familia para mí.

Agradecer a mi familia, por su amor y por su apoyo incondicional. Por enseñarme el valor del esfuerzo y la dedicación.

Agradecer a Msol, por acogerme en Barcelona, me has hecho crecer como persona y me siento muy afortunada de tenerte en mi vida.

Agradecer por último a Elisa, Ana e Irene, mis niñas, desde el primer momento que nos vimos conectamos y a partir de ahí hemos vivido un montón de experiencias y momentos divertidos. He tenido tanta suerte de conoceros, sin vosotras nada de esto hubiera sido lo mismo.

ÍNDICE

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Summary | 2 |
| 3. Introducción..... | 3 |
| 4. Revisión bibliográfica | 4 |
| 4.1 Recorrido de los espermatozoides en el tracto reproductor masculino | 4 |
| 4.1.1 Túbulo seminífero | 4 |
| 4.1.2 Epidídimo | 5 |
| 4.1.3 Maduración espermática en epidídimo..... | 7 |
| 4.1.4 Glándulas sexuales accesorias y su participación en la producción del plasma seminal | 8 |
| 4.2 Vesículas extracelulares del plasma seminal | 9 |
| 4.2.1 Lugar de producción de las VEs..... | 10 |
| 4.2.2 Composición y contenido de las PS- VEs | 10 |
| 4.3 Efecto de las PS-VEs sobre la funcionalidad de los espermatozoides | 11 |
| 4.3.1 Otras funciones de las PS-VEs relacionadas con la fertilidad..... | 12 |
| 4.3.2 Efectos de las PS-VEs sobre la conservación espermática..... | 13 |
| 4.3.3 Efectos de las PS-VEs sobre la capacitación espermática..... | 13 |
| 5. Hipótesis y objetivos | 14 |
| 6. Material y métodos | 15 |
| 6.1 Preparación de soluciones y reactivos | 15 |
| 6.1.1 Medios para realización de western blot | 15 |
| 6.1.2 Medios para montaje de ovocitos | 16 |
| 6.2 Medios de manipulación, lavado y cultivo de gametos..... | 16 |
| 6.2.1 Preparación de medios de manipulación espermática | 16 |
| 6.2.2 Preparación de medios para lavado y cultivo de gametos..... | 17 |
| 6.3 Material biológico | 18 |
| 6.3.1 Obtención de espermatozoides | 18 |
| 6.4 Determinación de parámetros de funcionalidad espermática | 19 |
| 6.4.1 Concentración de espermática | 19 |
| 6.4.2 Motilidad espermática | 19 |
| 6.4.3 Evaluación de vitalidad espermática e integridad acrosomal..... | 19 |
| 6.4.4 Actividad metabólica mitocondrial | 20 |
| 6.4.5 Morfoanomalías..... | 21 |
| 6.4.6 Evaluación de capacitación espermática | 21 |
| 6.5 Pruebas de penetración espermática in vitro | 22 |

| | | |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.5.1 | Obtención y maduración in vitro de los complejos cumulus oophorus (COCs)..... | 22 |
| 6.5.2 | Fecundación in vitro (FIV) | 23 |
| 6.5.3 | Evaluación de los parámetros de fecundación: fijación y tinción de gametos..... | 23 |
| 6.5.4 | Obtención de las vesículas extracelulares del plasma seminal..... | 24 |
| 6.6 | Diseño experimental..... | 27 |
| 6.6.1 | Experimento 1. Efecto de las VEs del plasma seminal sobre la conservación de espermatozoides de epidídimo durante 0, 24, 48 72 h a 15°C..... | 27 |
| 6.6.2 | Experimento 2. Efecto de las VEs del plasma seminal sobre la funcionalidad espermática..... | 28 |
| 6.7 | Análisis estadístico | 30 |
| 7. | Resultados | 30 |
| 7.1 | Caracterización de las PS-VEs | 30 |
| 7.2 | Pruebas de conservación..... | 31 |
| 7.2.1 | Motilidad espermática | 31 |
| 7.2.2 | Evaluación de viabilidad y daño acrosomal | 34 |
| 7.2.3 | Evaluación de la actividad metabólica | 35 |
| 7.2.4 | Actividad de PKA y fosforilación de tirosina | 36 |
| 7.2.5 | Fecundación in vitro (FIV)..... | 38 |
| 8. | Discusión..... | 38 |
| 9. | Conclusiones | 42 |
| 10. | Bibliografía..... | 42 |
| 11. | Anexos..... | 48 |

1. Resumen

Las vesículas extracelulares (VEs) son nanovesículas producidas por la mayoría de los epitelios y forman parte de los fluidos corporales. Las VEs del plasma seminal (PS-VEs) son producidas por el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias, se encuentran implicadas en varios aspectos funcionales del espermatozoide, como la motilidad, la viabilidad, la integridad acrosomal, la actividad metabólica y la capacitación. La mayor parte de los estudios realizados se han centrado en espermatozoides eyaculados por lo que ya han estado en contacto con las secreciones propias del plasma seminal y con las PS-VEs pudiendo ser esto una de las principales causas de la variabilidad entre los resultados encontrados sobre la función de las PS-VEs.

En el presente estudio se ha evaluado el efecto de las PS-VEs sobre espermatozoides obtenidos de epidídimo durante 72 h de conservación, tiempo que habitualmente se conservan las dosis de inseminación. El motivo de estudio sobre la conservación es el potencial uso de las PS-VEs como suplemento para mejorar la calidad de las dosis seminales utilizadas en inseminación artificial. Las PS-VEs se obtuvieron de eyaculados procedentes de machos con fertilidad probada. El método para aislar las VEs fue ultracentrifugación. Posteriormente, para comprobar que la metodología empleada era la adecuada y siguiendo las directrices de la sociedad internacional de vesículas extracelulares (MISEV), las VEs fueron caracterizadas mediante dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía electrónica de transmisión (TEM), determinación de la concentración de proteínas y determinación de las tetraspaninas CD81, CD63 y HSP70 (específicas de las membranas de las VEs). Los espermatozoides de epidídimo se resuspendieron en el diluyente comercial MRA y se incubaron con PS-VEs durante 72 h. Se evaluaron a las 0, 24, 48 y 72 h, la motilidad mediante CASA y, la viabilidad, integridad acrosomal y la actividad metabólica mediante citometría de flujo. Estos mismos parámetros fueron evaluados tras la incubación de los espermatozoides a 38,5°C durante 5h (prueba de termorresistencia) tras 24 y 72 h de conservación. Para evaluar la funcionalidad espermática, se determinó la actividad de la proteína quinasa A (PKA) y fosforilación de tirosina de espermatozoides capacitados mediante western blot. También se realizaron pruebas de fecundación *in vitro* (FIV) a las 0 y tras 48 h de conservación espermática con PS-VEs. Los parámetros de FIV evaluados fueron % de ovocitos penetrados, número de espermatozoides por ovocito y espermatozoides adheridos a la zona pelúcida.

Los resultados de motilidad revelaron que la suplementación con PS-VEs en los espermatozoides del epidídimo mejoraba la motilidad total a las 24 y 48 horas y la motilidad progresiva a las 48 horas. Sin embargo, la integridad acrosomal y la viabilidad empeoraron con la presencia de PS-VEs en todos los tiempos. La actividad metabólica no se vió afectadas por la presencia de PS-VEs. En relación con la prueba de termorresistencia, no existieron diferencias entre ambos grupos. Con respecto a la funcionalidad, se observó una disminución de la actividad de la PKA en espermatozoides incubados con PS-VEs. En cuanto a la fosforilación de tirosina se observó que las PS-VEs impiden la fosforilación de proteínas de 20 kDa. Los resultados de FIV mostraron que la incubación de espermatozoides con PS-VEs disminuía el porcentaje de penetración, el número de espermatozoides por ovocito penetrados y la adhesión de estos a la zona pelúcida. En conclusión, se ha observado que la suplementación con PS-VEs mejora parámetros de motilidad y regula la capacitación espermática disminuyendo la fosforilación de proteínas y los parámetros de fecundación.

2. Summary

Extracellular vesicles (EVs) are nanovesicles produced by most epithelia and are present in body fluids. Seminal plasma EVs (SP-EVs) are produced by the epididymis and accessory sex glands. They are involved in various functional aspects of spermatozoa such as motility, viability, acrosomal integrity, metabolic activity and capacitation. Most studies have focused on ejaculated spermatozoa, which have already been in contact with seminal plasma secretions and SP-EVs. This contact may be a major cause of the variability observed in the results regarding the function of SP-EVs.

The present study evaluated the effect of SP-EVs on epididymal spermatozoa during 72 hours of storage, which is the usual storage period for insemination doses. The focus on storage is due to the potential use of SP-EVs as a supplement to improve the quality of semen doses used for artificial insemination. SP-EVs were obtained from ejaculates of males with proven fertility. The method used to isolate the EVs was ultracentrifugation. To ensure that the method used was appropriate and in accordance with the guidelines of the International Society for Extracellular Vesicles (MISEV), the EVs were characterised by dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM), determination of protein concentration and identification of the tetraspanins CD81, CD63 and HSP70 (specific for EV membranes). Epididymal spermatozoa were resuspended in

commercial extender MRA and incubated with SP-EVs for 72 hours. They were evaluated at 0, 24, 48 and 72 hours for motility by CASA and for viability, acrosomal integrity and metabolic activity by flow cytometry. The same parameters were evaluated after incubation of the spermatozoa at 38.5°C for 5 hours (thermoresistance test) after 24 and 72 hours of storage. To assess sperm functionality, protein kinase A (PKA) activity and tyrosine phosphorylation (P-Tyr) of capacitated spermatozoa were determined by Western blot. In vitro fertilisation (IVF) assays were also performed after 0 and 48 hours of sperm storage with EVs. The IVF parameters evaluated were the percentage of penetrated oocytes, the number of spermatozoa per oocyte and the number of spermatozoa attached to the zona pellucida.

The motility results showed that supplementation with SP-EVs in epididymal spermatozoa improved total motility at 24 and 48 hours and progressive motility at 48 hours. However, acrosomal integrity and viability deteriorated in the presence of SP-EVs at all time points. Metabolic activity was not affected by the presence of SP-EVs. No differences were observed between the two groups in the thermo-resistance test. In terms of functionality, a decrease in PKA activity was observed in spermatozoa incubated with SP-EVs. In terms of tyrosine phosphorylation, SP-EVs were found to inhibit the phosphorylation of 20 kDa proteins. IVF results showed that incubation of spermatozoa with SP-EVs decreased the penetration rate, the number of spermatozoa per penetrated oocyte and their adhesion to the zona pellucida. In conclusion, it was observed that supplementation with SP-EVs improves motility parameters and regulates sperm capacitation by decreasing protein phosphorylation and fertilisation parameters.

3. Introducción

Tras abandonar los testículos, los espermatozoides aún no han adquirido la capacidad de desplazarse progresivamente o de fecundar. Para ello, deben pasar por un proceso de maduración epididimaria en el tracto reproductivo masculino y la capacitación posterior en el genital de la hembra. La maduración epididimaria se puede definir como aquellos cambios que ocurren en los espermatozoides durante su trayecto a lo largo del conducto epididimario, que les confiere la adquisición de movimiento y la capacidad de fecundar. Como parte de este proceso, los espermatozoides sufren una serie de modificaciones bioquímicas y fisiológicas como son la incorporación de nuevas moléculas derivadas del

epitelio epididimario y cambios postraduccionales de proteínas endógenas sintetizadas durante la espermiogénesis en el testículo.

Una vez maduros, los espermatozoides se almacenan en la cola del epidídimo hasta que se produce la eyaculación, dónde salen a través del conducto deferente mezclándose con la secreción de las glándulas accesorias. Estas secreciones junto con las del epidídimo y los testículos constituyen el plasma seminal (PS).

Entre los componentes del PS, encontramos las VEs, las cuales, en el verraco son producidas por el epidídimo, la próstata y las glándulas vesiculares. En su interior se encuentran distintas moléculas que interactúan con los espermatozoides regulando su actividad. Algunas de las funciones descritas son estimular la motilidad total y progresiva, inhibir la capacitación prematura, regular el estrés oxidativo, mejorar la viabilidad o aportar propiedades antioxidantes (Du et al., 2016).

A raíz estos resultados, se ha sugerido la suplementación de los espermatozoides con estas PS-VEs con fines de mejorar su conservación. Sin embargo, la mayor parte de estudios se ha centrado en analizar los efectos de las PS-VEs en los espermatozoides eyaculados, que ya han estado en contacto con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias. Por todo ello, este estudio se ha realizado con el fin de evaluar los efectos de las VEs de las glándulas accesorias en los espermatozoides maduros del epidídimo, los cuales, únicamente han estado en contacto con las VEs del epidídimo (epididimosomas). Además, se valora el uso de las PS-VEs como suplemento de dosis de inseminación con el fin de mantener la conservación espermática.

4. Revisión bibliográfica

4.1 Recorrido de los espermatozoides en el tracto reproductor masculino

4.1.1 Túbulo seminífero

Los espermatozoides se producen en los testículos mediante la espermatogénesis que es el proceso por el que se forman los espermatozoides a partir de las células germinales (espermatogonias). A nivel anatómico, el testículo se divide en tabiques de tejido conectivo, en su interior se encuentran los lóbulos (figura 1), estos contienen de 1 a 3 túbulos seminíferos que se encuentran rodeados por el compartimento intersticial (Weinbauer et al., 2001).

En el compartimento intersticial se encuentran las células de Leydig que producen testosterona, encargada del desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, así como del correcto funcionamiento de las glándulas sexuales accesorias. Además, el intersticio también contiene células inmunitarias, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, fibroblastos y tejido conectivo laxo (Weinbauer et al., 2001).

En los túbulos seminíferos encontramos células germinales, células somáticas, células peritubulares (forman capas concéntricas que están separadas por capas de colágeno) y las células de Sertoli. Estas últimas se encuentran en la membrana basal y se extienden hacia la luz del túbulo a lo largo del epitelio germinal, que es dónde tiene lugar la diferenciación, maduración morfológica y fisiológica de las espermatogonias hasta producir el espermatozoide maduro. Sus funciones son mantener un microambiente tubular apropiado y permitir el desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis (Weinbauer et al., 2001).

La espermatogénesis se divide en cuatro fases (Weinbauer et al., 2001):

1. División mitótica, se produce la división y proliferación de las espermatogonias.
2. División meiótica, se produce la división de los espermatocitos (células germinales tetraploides) que dan como resultado células germinales haploides (espermátidas).
3. Transformación de las espermátidas en espermatozoides testiculares (espermioogénesis).
4. Liberación de los espermatozoides del epitelio a la luz tubular (espermiación).

Una vez liberados, estos pasan por los conductos eferentes hasta llegar al epidídimo dónde se produce su maduración.

4.1.2 Epidídimo

El epidídimo es un conducto único con grandes circunvalaciones que conecta los conductos eferentes con el conducto deferente (figura 1). Anatómicamente se divide en el segmento inicial (zona más próxima al testículo), cabeza, cuerpo y cola (zona más alejada del testículo). Este conducto se encuentra formado por un epitelio muy diferenciado en función de la región. A pesar de ser un epitelio estratificado en toda su longitud, la morfología celular varía según la función que se desarrolle en esa región.

Además, la luz de este conducto va incrementando desde la cabeza hasta la cola (Breton et al., 2016). Los tipos celulares que podemos encontrar son:

-Células estrechas, son las predominantes en el segmento inicial, con morfología alargada y cuya función principal es la de secretar de forma activa protones hacia la luz, a través de la bomba V-ATPasa, para mantener un entorno luminal adecuado durante la maduración de los espermatozoides (Breton et al., 2019).

-Células claras, se encuentran a lo largo de todo el epidídimo, tienen una morfología cúbica y su función es la de secretar al igual que las células estrechas protones para mantener el ambiente luminal, estas son capaces de responder a las variaciones de pH en el lumen, siendo esto muy importante para la fertilidad masculina (Breton et al., 2019).

-Células principales, son las más abundantes en todo el epitelio del epidídimo. Poseen microvellosidades para maximizar la identificación del contenido luminal. Aportan iones, agua, ATP y la mayoría de las proteínas del fluido epididimario. Además, secretan los epididimosomas, capaces de transferir al espermatozoide, glicoproteínas, lípidos y microARN (Breton et al., 2019).

-Células basales, estas se encuentran en todo el epidídimo, aunque su morfología varía dependiendo del segmento en el que se encuentren. Su función no está muy clara, pero se ha indicado su papel como mediadores endocrinos y de protección contra especies reactivas de oxígeno (Breton et al., 2019).

Gracias a la actividad de estas células se permite que cada segmento muestre una expresión diferencial de genes y mantenga distintas concentraciones de iones luminales que son esenciales para llevar a cabo una remodelación del espermatozoide, que culminará con la adquisición de la capacidad fecundante (Breton et al., 2019).

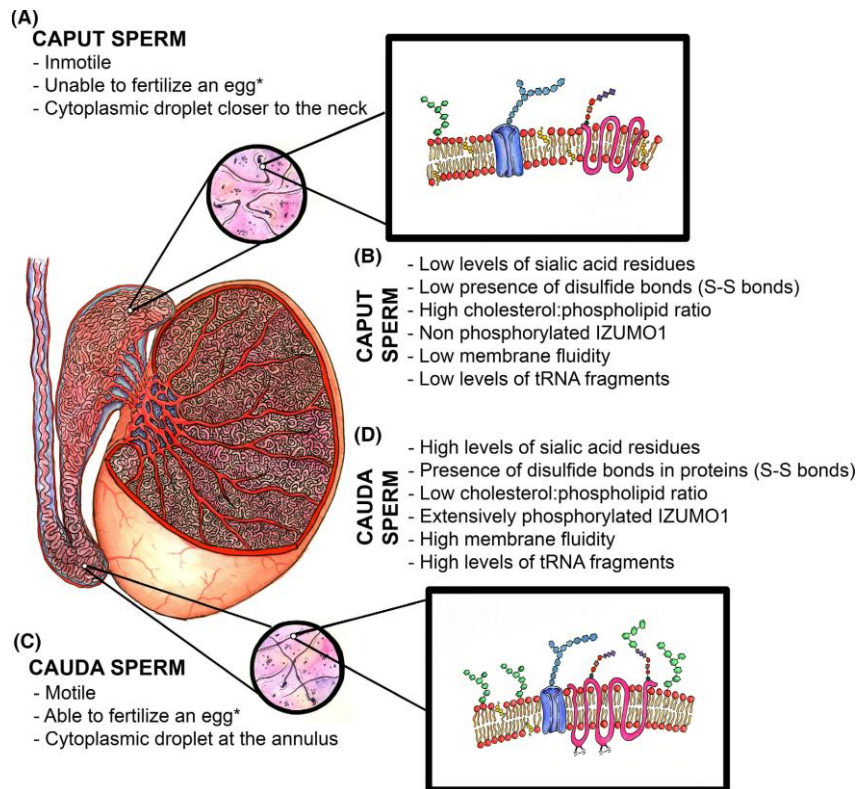


Figura 1: Representación esquemática de testículos, epidídimo y espermatozoides de mamífero. (A) Morfología y características funcionales de los espermatozoides inmaduros en la cabeza del epidídimo. (B) Características moleculares de espermatozoides inmaduros de la cabeza. (C) Morfología y características funcionales de los espermatozoides maduros de la cola del epidídimo. (D) Características moleculares de espermatozoides maduros de la cola. Imagen tomada de Gervasi & Visconti, (2017).

4.1.3 Maduración espermática en epidídimo

Cuando los espermatozoides abandonan el testículo son células incapaces de fecundar. Esta capacidad será adquirida durante su tránsito a través del epidídimo, proceso conocido como maduración espermática. A grandes rasgos, la maduración espermática consiste en un conjunto de cambios bioquímicos y moleculares que permiten a los espermatozoides capacitarse en el tracto femenino y fecundar.

En los primeros tramos del epidídimo, principalmente se produce la reabsorción de proteínas producidas en el testículo (albúmina, transferrina y clusterina) y proteínas secretadas por el epidídimo (Guyonnet et al., 2011). La cola del epidídimo funciona como un lugar de almacenamiento de los espermatozoides maduros.

Los cambios que se observan en los espermatozoides durante el tránsito epididimario son (Guyonnet et al., 2011):

- Cambios en el proteoma del espermatozoide. Debido a que los espermatozoides son células transcripómicamente inactivas, se piensa que estos adquieren proteínas mediante tres factores: Absorción directa de proteínas procedentes del líquido epididimal, epididimosomas que se unen a los espermatozoides y les transfieren proteínas, y por conexiones estrechas entre el entre el espermatozoide y la superficie del epitelio apical.
- Cambios moleculares en la superficie de los espermatozoides, que incluyen la adición, eliminación y/o modificación de azúcares y lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide.
- Migración de la gota citoplasmática.
- Adquisición de la motilidad progresiva, esto ocurre en la cola del epidídimo.

4.1.4 Glándulas sexuales accesorias y su participación en la producción del plasma seminal

Cuando se produce la eyaculación, los espermatozoides abandonan la cola del epidídimo a través del conducto deferente que desemboca en el conducto eyaculador, aquí los espermatozoides se mezclan con las secreciones provenientes de las glándulas sexuales accesorias, que en el caso de la especie porcina son las glándulas vesiculares, la próstata y las glándulas bulbouretrales. Son de tipo exocrino y su actividad es dependiente de andrógenos. Aportan sustancias importantes para la conservación, protección y fertilidad del eyaculado (Bonet et al., 2013). Su secreción junto con la producida por el testículo y el epidídimo forman el plasma seminal y constituyen la parte líquida del eyaculado (Bonet et al., 2013).

Las glándulas vesiculares se encuentran a ambos lados de la vejiga (Bonet et al., 2013) y secretan su contenido a la uretra, cerca de dónde desembocan los conductos deferentes (Badía et al., 2003). Secretan la mayor parte de proteínas del plasma seminal (Strzezek, 2002).

La próstata se encuentra dividida en dos partes, el cuerpo prostático y la próstata diseminada (Dyce et al., 2012). Las células prostáticas secretan mucina cuya función es lubricar y proteger el epitelio uretral frente a patógenos. Además, secretan sustancias

inmunomoduladoras y liberan la mayor parte de las VEs conocidas como prostasomas (Badía et al., 2003).

Las glándulas bulbouretrales producen una secreción blanquecina que contiene glicoproteínas que forman un tapón de gel que evita el reflujo del semen (Badía et al., 2004).

Además, en el PS se encuentran iones inorgánicos, hormonas, proteínas y péptidos, incluidas citoquinas y enzimas, colesterol, ADN y ARN, que pueden estar protegidos dentro de PS-VEs para evitar la degradación (Rodríguez-Martínez, et al., 2021).

Entre las funciones del plasma seminal encontramos: servir como medio de transporte para los espermatozoides, mantener su viabilidad mediante el sustento de las altas necesidades metabólicas que tienen, protegerlos del sistema inmunológico de la hembra afectando a las funciones inmunológicas de las células T, B, macrófagos..., y, actuar sobre el tracto reproductivo femenino estableciendo un entorno propicio para la implantación óptima del embrión, el desarrollo embrionario temprano e invasión del trofoblasto. Siendo importante para el buen resultado del embarazo (Bromfield, 2014).

4.2 Vesículas extracelulares del plasma seminal

Las VEs son estructuras esféricas de un tamaño de 30-350 nm de diámetro, morfológicamente heterogéneas, liberadas por las células funcionales de los epitelios que forman parte de los fluidos corporales (Barranco et al., 2023; Jeppesen et al., 2019). Su contenido se caracteriza por la presencia de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que son transportados en su interior evitando la degradación (Jeppesen et al., 2019). Las funciones principales son permitir la comunicación entre células y regular diferentes procesos biológicos (Lozano Ramos et al., 2019).

Atendiendo a su origen y tamaño, las VEs se han clasificado como exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos.

Los exosomas son vesículas de tamaño comprendido entre 40-120 nm y proceden de las vesículas intraluminales que se encuentran dentro de los endosomas (Barranco et al., 2019). Cuando estos maduran se conocen como cuerpos multivesiculares y se localizan en el interior de la célula. Una parte de ellos se fusionan con el contenido lisosomal degradándose, pero otra parte, se fusionan con la membrana plasmática liberando los exosomas. No obstante, aún se sigue investigando los mecanismos implicados en la fusión

de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática (Stahl & Raposo, 2019).

Las microvesículas son vesículas de tamaño comprendido entre 50–1000 nm que emergen directamente de la membrana plasmática por eventos de gemación (Crescitelli et al., 2013; Moreno-Gonzalo et al., 2017)

Los cuerpos apoptóticos (800–5000 nm) son VEs provenientes de las fases finales de apoptosis celular en la que se genera una gran variedad de vesículas mediante un proceso llamado desmontaje de células apoptóticas (Crescitelli et al., 2013; Hristov et al., 2004).

Dependiendo del origen, las PS-VEs pueden diferir en tamaño, morfología, composición y función biológica (Aalberts et al., 2014; Simon et al., 2018).

Las PS-VEs fueron descritas por primera vez en 1978 en el eyaculado humano (Ronquist et al., 1978). A partir de ese momento numerosas investigaciones han puesto de manifiesto su presencia en eyaculados de varias especies, como conejos (Metz et al., 1968), toros (Agrawal & Vanha-Perttula, 1986a, 1986b), ratón (Nixon et al., 2015), carneros (Breitbart et al., 1983; Breitbart & Rubinstein, 1982), caballos (Arienti et al., 1998; Minelli et al., 1998), gallos (Cordeiro et al., 2021) y verracos (Piehl et al., 2006).

En los últimos años ha habido un gran estudio sobre caracterización, contenido y funciones de las VEs por lo que ha sido necesaria la creación de una sociedad internacional (MISEV) orientada a su estudio, métodos para su aislamiento y caracterización de forma que los resultados de los investigadores puedan ser comparados entre ellos y haya mayores avances en su estudio.

4.2.1 Lugar de producción de las VEs

Las PS-VEs son producidas prácticamente por todos los tejidos especializados del tracto reproductivo masculino, incluyendo testículos, epidídimo y glándulas accesorias (vesículas seminales y próstata) (Tamessar et al., 2021). Dentro de estos, los más estudiados han sido los epididimosomas y los prostasomas. En el cerdo, se ha observado que la mayor concentración de PS-VEs se encuentra en la fracción rica (El-Hajj Ghaoui et al., 2004).

4.2.2 Composición y contenido de las PS- VEs

Las PS-VEs del verraco se caracterizan por su alto contenido en lípidos. Presentan una relación colesterol/fosfolípidos muy elevada, siendo la esfingomiélna la que se encuentra en mayor proporción (Piehl et al., 2006). En el interior de las PS-VEs se han identificado

diversos biotipos de sRNA, como miRNA, piRNA... implicados en la regulación de la transcripción, fosforilación de proteínas y en distintas vías de transducción de señales vinculadas a la espermatogénesis, homeostasis y calidad espermática (Xu et al., 2020).

Con relación al contenido de proteínas, en el verraco se han identificado un total de 988 (Barranco et al., 2023). Entre ellas destacan las esperadhesinas, que se han relacionado con la maduración, metabolismo, capacitación y supervivencia frente a la congelación de los espermatozoides (Druart et al., 2019). La ELSPBP1 asociada con el reconocimiento espermático y la CYBRDQ que se vincula con el estrés oxidativo entre otras (Barranco et al., 2023). Otras de las proteínas relevantes para la identificación de las VEs son el grupo de las tetraspaninas, que tienen cuatro dominios transmembrana y dos hélices extracelulares (Jiang et al., 2015). Las más abundantes en el verraco con la CD9, CD63 y CD81 que se presentan en distinto nivel de expresión según el tipo de vesícula (Machtinger et al., 2016). La CD9 es común en todas las VEs, la CD81 es común en los exosomas del plasma seminal porcino y la CD63 se encuentra principalmente en microvesículas (Álvarez-Rodríguez et al., 2018; Barranco et al., 2019). La CD9 y la CD81 constituyen una zona de unión con las integrinas necesarias para la comunicación con las células (Álvarez-Rodríguez et al., 2018).

4.3 Efecto de las PS-VEs sobre la funcionalidad de los espermatozoides

La mayor parte de efectos y funciones de las PS-VEs se han estudiado tomando como modelo los espermatozoides eyaculados y bajo condiciones *in vitro*. Se ha observado que las PS-VEs estimulan la reacción acrosómica, mejoran la motilidad total y progresiva, la vitalidad y reducen el estrés oxidativo (Du et al., 2016).

Con relación al efecto sobre el acrosoma, se ha visto que las PS-VEs funcionan como catalizadores enzimáticos produciendo una serie de cambios bioquímicos que desencadenan la reacción acrosomal (Hasan et al., 2021). Por otro lado, el mecanismo por el cual las PS-VEs mejoran la motilidad parece estar relacionado con la regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular de los espermatozoides (Park et al., 2011). También se ha determinado que, las PS-VEs controlan la transferencia de zinc, ion que es necesario para mantener la estabilidad de membrana y la motilidad espermática (Mogielnicka-Brzozowska et al., 2015). Hay estudios en los que se ha observado que las PS-VEs modulan la síntesis de ATP regulando la actividad metabólica en los espermatozoides (Guo et al., 2019). También se ha mostrado que las PS-VEs mejoran la supervivencia

espermática del verraco tras la descongelación (Alcântara-Neto et al., 2020). Sin embargo, Piehl et al., (2013) indicaron la ausencia de efecto de las PS-VEs en la reacción acrosomal y en la motilidad, pero sí sobre la capacitación, inhibiéndola.

Con respecto al efecto de las PS-VEs sobre los espermatozoides de epidídimo, no hay muchos estudios descritos en la bibliografía. Algunos investigadores han observado que al cultivar espermatozoides de epidídimo con prostasomas, afectan a la motilidad y al éxito en la fertilización *in vitro* e *in vivo* en espermatozoides de ratón (Tamessar et al., 2021).

El estudio del papel de las PS-VEs sobre los espermatozoides de epidídimo resulta interesante ya que estos únicamente han estado en contacto con los epididimosomas, al contrario de lo que ocurre con los espermatozoides de eyaculado que están interaccionando con las VEs de las glándulas accesorias. De hecho, autores como Cordeiro et al., (2021) opinan que esta situación sea una de las responsables de la existencia de la gran variabilidad en los resultados obtenidos entre laboratorios.

Hay trabajos en la literatura que manifiestan una relación entre las PS-VEs y la subfertilidad masculina (Cordeiro et al., 2021). Belleannée et al., (2013) observaron que las características de las PS-VEs de semen de pollos fértiles eran diferentes a las subfértiles. Además, en espermatozoides de hombre se ha determinado que la procedencia de las PS-VEs según provengan de un semen de buena o mala calidad afectan a la calidad de los espermatozoides. Las PS-VEs de eyaculados normospermicos mejoraron la motilidad y la capacitación al contrario de lo que pasaba en el grupo de hombres con eyaculados astenospermicos (Barceló et al., 2018; Murdica et al., 2019). Al parecer, la explicación a estos resultados se encontraba relacionada con los miARN y las proteínas que se encuentran en las PS-VEs (Candenas & Chianese, 2020). Un estudio en toros demostró que las vesículas procedentes de eyaculados de machos con buena fertilidad pueden mejorar el semen de machos de baja fertilidad, mejorando las capacidades fecundantes de los espermatozoides *in vitro* (Lange-Consiglio et al., 2022).

4.3.1 Otras funciones de las PS-VEs relacionadas con la fertilidad

Es interesante hablar sobre los efectos descritos de las PS-VEs en el tracto reproductivo femenino. Se ha documentado que ayudan a modular el entorno inmunológico e inflamatorio uterino permitiendo la supervivencia y mantenimiento de la función de los

espermatozoides, así como el desarrollo del embrión, la implantación, y el desarrollo de la placenta posteriormente (Bai et al., 2018; Parra et al., 2023).

Se ha observado un efecto positivo en la producción de embriones *in vitro* cuando los medios MIV, FIV y CIV se suplementan con PS-VEs (Barranco et al., 2024). Resultados similares fueron observados en el estudio de Ma et al., (2022), estos autores comprobaron que al suplementar el medio de fecundación con epididimosomas, mejoraba el desarrollo embrionario. También pueden tener la capacidad de modular la función de las células de cúmulo cuando estas se agregan al medio de maduración participando en la fisiología de los ovocitos porcinos (Mateo-Otero et al., 2022).

4.3.2 Efectos de las PS-VEs sobre la conservación espermática

La necesidad de preservar los espermatozoides para su posterior uso en fecundación *in vitro* o en inseminación artificial ha crecido debido al avance de las técnicas de reproducción asistida (Waberski et al., 2019). Los espermatozoides del verraco tienen la ventaja de poder conservarse durante varios días a 15-20°C cuando se utiliza un diluyente de inseminación, lo que facilita el almacenamiento de las dosis seminales y su posterior difusión (Cheng et al., 2022). No obstante, la fertilidad de los espermatozoides conservados disminuye a lo largo del tiempo y es prácticamente nula en menos de una semana. Por ello, dado el efecto beneficioso de las PS-VEs sobre los espermatozoides, la implementación de su uso como un suplemento podría ser una opción para el mantenimiento o mejora de la calidad espermática. Sin embargo, hasta ahora solo parece haber dos estudios sobre los efectos que presentan las PS-VEs en la conservación con semen fresco. En dichos estudios se puso de manifiesto que el uso de PS-VEs como aditivo mantenía la motilidad total, mejoraba la motilidad progresiva, la integridad de la membrana plasmática, la integridad acrosomal, la actividad metabólica, inhibía la capacidad de unión a la zona pelúcida y aumentaba la capacidad antioxidante. Además, mantenían estas propiedades durante el almacenamiento hasta 5 días (Du et al., 2016; Wang et al., 2024).

4.3.3 Efectos de las PS-VEs sobre la capacitación espermática

La capacitación es el proceso por el cual el espermatozoide sufre cambios estructurales y funcionales que le confieren la hipermotilidad y la capacidad de fecundar el ovocito. *In vivo* este proceso ocurre a lo largo del tracto reproductivo femenino y se caracteriza por los cambios producidos a nivel de la permeabilidad de membrana espermática,

consecuencia de la pérdida de colesterol, así como el intercambio de fosfolípidos que incrementan la fluidez de la membrana. Estas modificaciones conducen a la apertura de canales que permiten la entrada de HCO_3^- y Ca^{2+} , la activación del adenilato ciclasa (AC) y a la formación de AMPc. El AMPc es clave para activación de la proteína quinasa A y la fosforilación de diversas proteínas (Purohit et al., 1999). La capacitación espermática también se puede producir *in vitro* imitando los procesos anteriormente descritos.

En los espermatozoides de humanos se ha observado que las PS-VEs regulan la capacitación y la reacción acrosomal al actuar sobre las proteínas que se fosforilan en tirosina (Bechoua et al., 2011). En el verraco se ha demostrado que esta influencia de las PS-VEs sobre la fosforilación de la tirosina es limitada (Roca et al., 2022). Piehl et al., (2013) observaron que las PS-VEs disminuyen la capacitación prematura de los espermatozoides. Se ha relacionado la clusterina, que es una proteína vinculada a la capacitación, con las PS-VEs ya que se ha demostrado que cantidades bajas de clusterina en las PS-VEs podría ser un diagnóstico de infertilidad masculina humana (Parra et al., 2023). Además, las PS-VEs transfieren factores de incapacitación como las espermadhesinas (Du et al., 2016), que estabilizan las membranas evitando la capacitación y la exocitosis acrosómica (Du et al., 2016). Se ha evaluado también el efecto de la capacitación mediante la FIV observándose que bajo la presencia de las PS-VEs el porcentaje de ovocitos penetrados disminuye (Barranco et al., 2024).

5. Hipótesis y objetivos

Por todo lo descrito anteriormente, la hipótesis que hemos planteado en este trabajo es la siguiente: el suplemento de PS-VEs a espermatozoides de epidídimo diluidos en un diluyente comercial podría mejorar la conservación.

Para aceptar o rechazar nuestra hipótesis, proponemos los siguientes objetivos:

- i. Obtención y caracterización de las PS-VEs de eyaculados de verracos de fertilidad probada.
- ii. Determinar la calidad espermática de espermatozoides de epidídimo incubados con PS-VEs.
- iii. Analizar el efecto de las PS-VEs sobre los espermatozoides epididimarios conservados a 15°C durante 72 h
- iv. Determinar cómo afectan las PS-VEs de sobre la capacitación espermática y la fecundación *in vitro*

6. Material y métodos

6.1 Preparación de soluciones y reactivos

A no ser que se indique lo contrario, los reactivos utilizados fueron adquiridos en Sigma Aldrich.

6.1.1 Medios para realización de western blot

Para la realización de western blot se usaron i) buffer de muestra 5X (tabla 1), ii) buffer de electroforesis (tabla 2), iii) buffer de transferencia (tabla 3). Para lavar las membranas tras la transferencia de las proteínas y después de la incubación con los anticuerpos se utilizó la solución TTBS (tabla 5) y TPBS (tabla 4).

Tabla 1: Buffer de muestra 5X

| Componentes | Concentración |
|-------------------------|---------------|
| SDS | 0.5 g |
| Tris 1M Ph 6,8 | 1,56 ml |
| Glicerol | 2.5 ml |
| Azul de bromofenol | 5 mg |
| H ₂ O MilliQ | 0.84 ml |

Tabla 2: Buffer de electroforesis

| Componentes | Concentración (10X) | Concentración (1X) |
|-------------------------|---------------------|--------------------|
| Trizma-Base | 30 g | 3 g |
| Glicina | 144 g | 14.4 g |
| SDS | 10 g | 1 g |
| H ₂ O MilliQ | 10 L | 1 L |

Tabla 3: Buffer de transferencia

| Componentes | Concentración (1X) |
|-------------------------|--------------------|
| Trizma-base | 3.01 g |
| Glicina | 14.4 g |
| Metanol | 200 ml |
| H ₂ O MilliQ | 800 ml |

Tabla 4: Composición de la solución TPBS

| Componentes | Concentración |
|---------------------|---------------|
| PBS 10X (Comercial) | 100 ml |
| H2O MilliQ | 900 ml |
| Tween 20 | 1 ml |

Tabla 5: Composición de la solución TTBS

| TBS 10X | TTBS |
|--------------------------------|-------------------------------|
| 500 ml H ₂ O MilliQ | 100ml TBS 10X |
| 24,22 g Trizma-base | 900ml H ₂ O MilliQ |
| 87,70 g NaCl | 1ml Tween 20 |
| Ph 7.5 | |

6.1.2 Medios para montaje de ovocitos

En la tabla 6 se muestra la preparación del medio de montaje utilizado para la tinción de los ovocitos.

Tabla 6: Composición medio de montaje

| Componentes | Volumen |
|---------------|--------------|
| PBS 0.1%-PVA | 6.25 ml |
| Glicerol | 6.25 ml |
| Hoechst-Stock | 6.25 μ l |

6.2 Medios de manipulación, lavado y cultivo de gametos

6.2.1 Preparación de medios de manipulación espermática

- Medio de dilución espermática: El medio utilizado para la conservación de los espermatozoides fue el diluyente MRA (KUBUS, S.A. Madrid, España). Su preparación consistió en diluir 4g de MRA en 90mL de agua Milli Q. Se dejó estabilizar 2 h a 38,5°C antes de su uso.
- Medio de capacitación espermática y fecundación *in vitro*: Para la incubación de los espermatozoides durante la capacitación y para la coincubación de los espermatozoides con los ovocitos durante la FIV se utilizó el medio Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvate (TALP) (Tabla 7).

Tabla 7: Composición medio TALP

| Componentes | Concentración (mM) |
|---------------------------------------------------|---------------------|
| NaCl | 114.06 |
| KCl | 3.2 |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 0.50 |
| Lactato sódico | 18.00 |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O | 0.35 |
| Glucosa | 5.00 |
| NaHCO ₃ | 25.07 |
| Cafeína | 2.00 |
| Lactato cálcico 5H ₂ O | 8.00 |
| PVA | 1 mg/ml |
| Sulfato de Kanamicina | 0.17 |
| Rojo fenol | 0.003 |
| BSA | 6,6 10 ⁴ |
| Piruvato sódico | 1.1 10 ⁵ |

6.2.2 Preparación de medios para lavado y cultivo de gametos

Para lavar los ovarios tras la llegada de matadero se utilizó solución CETAB 0.04% (Tabla 8) y solución salina fisiológica (SSF) (Tabla 9), precalentados previamente en una estufa a 38,5°C.

Tabla 8: Composición medio lavado ovarios CETAB stock y solución de cetab 0.04%

| CETAB stock | Solución CETAB 0.04% |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| 25 ml etanol absoluto | 20ml CETAB stock |
| 5 g Cetrimida | 500ml H ₂ O bidestilada |
| 475 ml H ₂ O bidestilada | |

Tabla 9: Composición solución salina fisiológica (SSF)

| Componentes | g/1L |
|------------------------------|------|
| NaCl | 9 |
| Kanamicina | 0,1 |
| H ₂ O bidestilada | 1 L |

Para la maduración de los ovocitos se utilizó el medio North Carolina State University-37 (NCSU-37)(Petters et al., 2020) A y B (Tabla 11).

Tabla 10: Composición de los medios NCSU-Stock y suplementado.

| Medio NCSU-Stock (Mm) | Concentración (Mm) |
|-------------------------------------|--------------------|
| NaCl | 108.73 |
| NaHCO ₃ | 25.07 |
| KCl | 4.78 |
| KH ₂ PO ₄ | 1.19 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 1.19 |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 1.70 |
| Glucosa | 5.55 |
| Glutamina | 1.00 |
| D-Sorbitol | 12.00 |
| Penicilina G | |
| Estreptomicina | |
| Cisteína | 0.57 |
| β-mercaptoetanol | 50 μm |
| Insulina | 5 mg/L |

Tabla 11: Composición de medio NCSU-37 (A) y (B).

| Medio NCSU-37 (A) | Medio NCSU-37 (B) |
|------------------------------------------|----------------------|
| NCSU-37 suplementado | NCSU-37 suplementado |
| Fluido folicular porcino (PFF) 10% (v/v) | PFF 10% (v/v) |
| dbAMPc 1 mM | |
| PMSG/hCG 10 μl/ml | |

6.3 Material biológico

6.3.1 Obtención de espermatozoides

6.3.1.1 Espermatozoides eyaculados

Los eyaculados se obtuvieron por el método de mano enguantada y procedían de verracos de fertilidad probada. Una alícuota de 10 mL de eyaculado completo fue utilizada para análisis espermático y obtención de PS-VEs.

6.3.1.2 Espermatozoides de epidídimo

Los epidídimos utilizados se obtuvieron de testículos de verracos sacrificados en matadero (El Pozo S.A, Alhama de Murcia, Murcia, España). Fueron transportados al laboratorio en un período máximo de 30 minutos tras el sacrificio del animal. Una vez en

el laboratorio, se eliminaron los restos de sangre mediante lavados con solución salina. Posteriormente, se disecó la cola del epidídimo para la visualización del conducto deferente. Con un catéter BD Insyte™ de 24G (381212, Becton Dickinson Infusion Therapy Systems, Inc., Sandy, Utah, USA) adaptado a una jeringa se canalizó el conducto deferente y mediante aire presurizado se obtuvieron las muestras espermáticas.

6.4 Determinación de parámetros de funcionalidad espermática

6.4.1 Concentración de espermática

La concentración espermática se determinó con el espectrofotómetro Spermacue (Minitube, Tiefenbach-Alemania). Dado que los espermatozoides de epidídimo están altamente concentrados, previo a determinar la concentración se procedió a la dilución de la muestra 1:4 en diluyente MRA. Se realizaron tres mediciones seguidas para cada muestra, y se calculó la media de dichas mediciones.

6.4.2 Motilidad espermática

Se empleó un sistema asistido por computadora para analizar la motilidad de los espermatozoides, conocido como C.A.S.A (Computer-Assisted Sperm Analysis), utilizando un sistema ISAS® (PROISER I+D S.L., Valencia, España) conectado a un microscopio de contraste de fases negativo ($\times 1000$; Leica DMR, Wetzlar, Alemania) y una cámara digital (Basler Vision, Ahrensburg, Alemania). Las muestras se dispusieron en una cámara SpermTrack® (STP-21006, PROISER I+D S.L., Valencia, España) de 20 μm , mantenida a una temperatura de 38,5°C. Se capturaron 5 imágenes de cada muestra y se evaluaron los parámetros: porcentaje de espermatozoides móviles (MotT, %), porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo (MotP,%), espermatozoides rápidos (Rápidos), espermatozoides con velocidad media (Medios), espermatozoides con velocidad lenta (Lentos), velocidad de desplazamiento curvilínea (VCL), velocidad de desplazamiento rectilínea (VSL), velocidad de trayectoria (VAP), desplazamientos laterales de la cabeza (ALH), linealidad espermática (LIN), índice de rectitud espermática (STR), oscilación lateral de la cabeza (WOB) y frecuencia de cruzamiento (BCF).

6.4.3 Evaluación de vitalidad espermática e integridad acrosomal

El estudio de la viabilidad e integridad acrosomal se realizó mediante el uso de fluorocromos y un citómetro de flujo. Se utilizó el yoduro de propidio (IP) para evaluar la vitalidad espermática ya que penetra en el interior de los espermatozoides muertos que

presentan la membrana rota. Para la integridad del acrosoma se utilizó la lectina *Arachis hipogaea* (PNA-FICT) unida a fluoresceína. Esta lectina se une al contenido del acrosoma, por lo que marca los espermatozoides con acrosoma dañado.

Para la evaluación, las muestras de espermatozoides epididimarios conservados en MRA se prepararon con una concentración de 200.000 spz/ml en PBS (sterile-filtered, suitable for cell culture, Sigma- Aldrich). Se incubaron con 5 μ L de IP de una solución stock (500 μ g/mL) y con 5 μ L de PNA-FITC (200 μ g/mL) a 37°C durante 10 minutos. La medición de la fluorescencia se realizó mediante el citómetro de flujo Guava Easy-cyte 6-2 (Millipore, Hayward, CA, EE. UU.) con un láser azul de 488 nm, un sensor FL-1 con un filtro de paso de banda de 525/30 nm para detectar el PNA-FITC, y un sensor FL-2 con un filtro de paso de banda de 695/50 nm para detectar el IP. Se aplicó una puerta de dispersión frontal y lateral para excluir agregados e impurezas del análisis. Se analizaron 3000 eventos y se registraron dos medidas por muestra. Los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando el programa Expo32ADC (Beckman Coulter Inc.). Para corregir la superposición espectral, se implementó un proceso de compensación de fluorescencia en el que se identificaron cuatro subconjuntos de espermatozoides: viables sin daño acrosomal, muertos sin daño acrosomal, muertos con daño acrosomal y viables con daño acrosomal.

6.4.4 Actividad metabólica mitocondrial

Para el estudio de la actividad metabólica mitocondrial se utilizó citometría de flujo. El fluorocromo utilizado para evaluar la actividad metabólica fue la rodamina (Rh123) que penetra en las mitocondrias que se encuentran activas generando una fluorescencia verde. Para este propósito, se incubaron 200.000 spz/mL, con 0.5 μ l de Rh123 (Rodamina 123, R-8004, 5 mg, diluida en DMSO a 0.53 mM) y 0.5 ml de PBS. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 10 minutos, seguida de una centrifugación a 1000g durante 3 minutos. El pellet se resuspendió en 500 μ l de PBS. La fluorescencia fue medida mediante un citómetro de flujo Guava Easy-cyte 6-2 (Millipore, Hayward, CA, EE. UU) utilizando un láser azul de 488 nm con un sensor FL-1 con un filtro de paso de banda de 525/30 nm. Se identificaron dos subconjuntos de espermatozoides: Los que presentaban fluorescencia que tenían actividad metabólica mitocondrial y los ausentes en fluorescencia que no tenían actividad.

6.4.5 Morfoanomalías

Para determinar las formas anormales de los espermatozoides, se realizó la fijación de estos en solución salina formolada al 0.3% en una dilución 1:10. Posteriormente, se evaluaron al microscopio de contraste de fases a una magnificación de 100X, contando 100 espermatozoides por muestra. El porcentaje de morfoanomalías evaluadas se clasificaron en anomalías de la cabeza (macro o microcabeza, o cabezas sueltas), presencia de gotas en el flagelo (proximal o distal) y anomalías del flagelo (cola en látigo o en ovillo).

6.4.6 Evaluación de capacitación espermática

6.4.6.1 Determinación de la actividad de PKA, fosforilación de tirosina y tubulina mediante western blot

Para evaluar la capacitación espermática los espermatozoides fueron incubados durante 2 h en el medio de capacitación TALP. Transcurrido el tiempo de capacitación se procedió a la extracción de las proteínas espermáticas y a su análisis mediante Western blot (WB) según el método descrito por Navarrete et al., (2015). Los espermatozoides fueron sometidos a una centrifugación a 13500 g durante 2 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y los espermatozoides se resuspendieron con 600 µl de PBS a 4°C. Luego, se centrifugó a 15500 g durante 3 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y los pellets se mezclaron con un tampón de muestra (buffer de muestra) 5X, incubándolos durante 5 minutos a 100°C. Posteriormente, se centrifugó nuevamente a 15500 g durante 5 minutos, y los sobrenadantes que contenían las proteínas fueron transferidos a nuevos tubos para llevar a cabo el análisis mediante WB.

Para la electroforesis, se utilizó un gel de poliacrilamida con sulfato de sodio al 12% (geles Mini-Protean TGX, Bio-rad). El primer pocillo se cargó con un estándar de proteínas de peso molecular conocido (Precision plus protein standards dual color, Bio-rad) con un rango entre 10 y 250 kDa. Se aplicó una corriente de 40mAmp/gel durante 30 minutos. Para la transferencia de membrana, se utilizó una membrana de nitrocelulosa de polivinilideno difluoruro (PVDF) de 0.45 µm (Immobilon®-P Transfer Membranes), aplicando una corriente de 250 mAmp durante 90 minutos.

Las membranas se lavaron con solución salina tamponada con TTBS y se bloquearon las uniones inespecíficas con leche/BSA (dependiendo del anticuerpo utilizado) al 5% en TTBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las membranas

con TTBS y se incubaron con los anticuerpos fosfotirosina (Millipore clone 4G 10, 1:10000), PKA (Cell Signaling Technology 9624, 1:10000) y tubulina (Sigma- T0198, 1:5000) a 4°C durante toda la noche. Luego, se procedió a lavar las membranas y a su incubación con los anticuerpos secundarios anti-ratón HRP (Bio-rad 170-6516, 1:10000) y anti-conejo HRP (Santa Cruz sc2004, 1:10000) a 4°C durante 1 o 2 horas, dependiendo del anticuerpo incubado. Las bandas inmunorreactivas positivas se detectaron mediante un sustrato de quimioluminiscencia (ECL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), y la quimioluminiscencia fue capturada mediante el equipo Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare).

6.5 Pruebas de penetración espermática in vitro

6.5.1 *Obtención y maduración in vitro de los complejos cumulus oophorus (COCs)*

Los ovarios se obtuvieron de hembras sacrificadas en el matadero (El Pozo S.A, Alhama de Murcia, Murcia, España). Estos ovarios fueron transportados al laboratorio en un recipiente isotérmico a una temperatura de 38°C, sumergidos en SSF. Se seleccionaron aquellos ovarios que presentaban un desarrollo folicular adecuado (foliculos de 3-6 mm), eliminando aquellos que tenían cuerpos lúteos o formas anómalas. Al llegar al laboratorio, los ovarios fueron lavados con CETAB al 0.04% y con SSF.

La extracción de los ovocitos del foliculo se llevó a cabo mediante aspiración utilizando una jeringa de 10 ml. El fluido folicular y los COCs obtenidos se transfirieron a tubos de 10 ml previamente calentados a 38.5°C. Estos tubos se dejaron sedimentar durante 5 minutos, y parte del fluido folicular fue eliminado. El sedimento se mezcló con 5 ml de PBS-PVA y el contenido se distribuyó en dos placas de 90 mm.

Los COCs fueron examinados utilizando un estereomicroscopio en una mesa calefactada a 38,5°C. Se aspiraron mediante una pipeta Pasteur de vidrio adelgazada por calor, acoplada a una cánula de silicona. Se seleccionaron los COCs que presentaban un cumulus oophorus compacto y uniforme, acompañado de un citoplasma oscuro y granuloso.

Una vez seleccionados, los COCs fueron lavados en medio de maduración NCSU-37 suplementado. Posteriormente, en grupos de 50 COCs, se introdujeron en una placa de cuatro pocillos que contenía 500 µl de medio NCSU-37 A en cada pocillo. Esta placa se dejó incubar durante un periodo de 20 a 22 horas, manteniendo una temperatura de

38,5°C, un 5% de CO₂, un 7% de O₂ y una atmósfera saturada en humedad. Posteriormente, los ovocitos fueron transferidos nuevamente a una placa de 4 pocillos con 500 µl de medio NCSU 37-B y se mantuvieron por un periodo adicional de 22-24 horas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

6.5.2 Fecundación *in vitro* (FIV)

La FIV se realizó siguiendo el protocolo descrito por Funahashi et al., (2001). Tras la maduración de los complejos cúmulo-ovocito, los ovocitos fueron separados de las células del cúmulo mediante pases a través de una pipeta automática. Finalmente, grupos de 50 ovocitos fueron transferidos a placas de cuatro pocillos, con volumen de 500 µl de TALP. Los ovocitos fueron inseminados con 125000 spz/ml. Durante 16-18 horas los gametos fueron cocultivados en un incubador a 38,5°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación.

6.5.3 Evaluación de los parámetros de fecundación: fijación y tinción de gametos

Al finalizar el periodo de cocultivo, los ovocitos se lavaron en PBS-PVA y se liberaron del exceso de espermatozoides adheridos mediante sucesivos pases a través de una pipeta. Posteriormente, fueron transferidos a una nueva placa con 500 µl de PBS-PVA para terminar el lavado e iniciar la fijación. Para ello, los ovocitos fueron depositados en 500 µl de PBS-PVA suplementado con 10 µl de glutaraldehído. Transcurridos 30 min, los ovocitos se lavaron de nuevo en PBS-PVA y finalmente se depositaron en 500 µl de medio de tinción fluorescente Hoechst durante 30 minutos. Finalmente, para eliminar restos del fluorocromo, los ovocitos se lavaron nuevamente con PBS-PVA y se transfirieron a un portaobjetos con 5 µl de medio de montaje. Las muestras fueron evaluadas en el microscopio de fluorescencia a 40X.

Los parámetros evaluados fueron el porcentaje de ovocitos penetrados (Pen %), el número de espermatozoides penetraron en el ovocito (Spz/Ovo) y el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida (Spz/ZP) (figura 2).

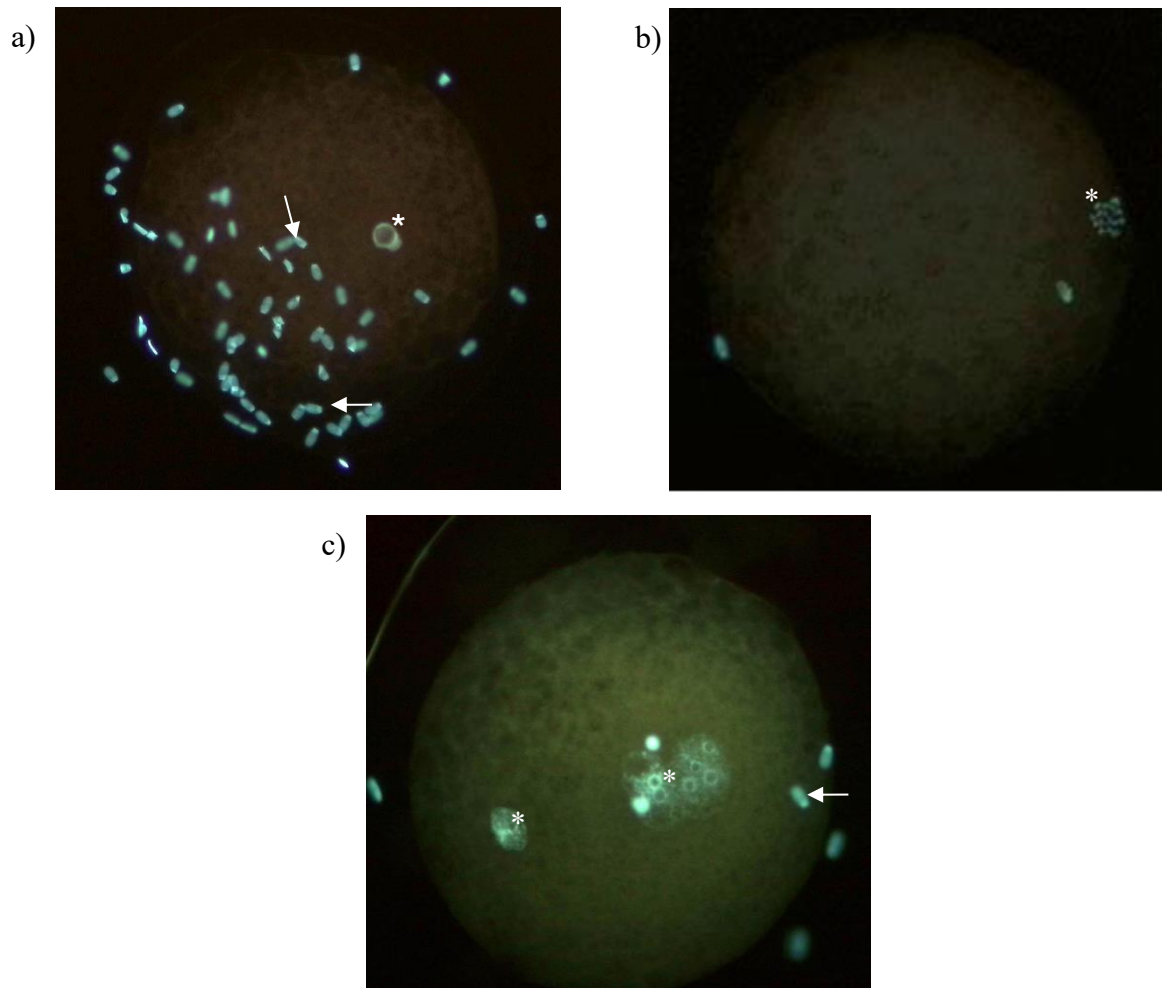


Figura 2: Imagen al microscopio de fluorescencia de ovocitos y espermatozoides teñidos mediante Hoechst. a) Ovocito inmaduro en vesícula germinal (*) con espermatozoides adheridos a la zona pelúcida (flechas). b) Ovocito maduro en metafase II (*) sin fecundar. c) Ovocito maduro fecundado con varios pronúcleos (*) y espermatozoides (flecha) unidos a la zona pelúcida.

6.5.4 Obtención de las vesículas extracelulares del plasma seminal

6.5.4.1 Aislamiento de las VEs

El eyaculado fue centrifugado a 1500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma seminal del componente celular. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se sometió a una segunda centrifugación en las mismas condiciones, el sobrenadante obtenido se centrifugó a 10000 g durante 30 minutos a 4°C para eliminar posibles residuos celulares. Para aislar las PS-VEs, se procedió a la realización de centrifugaciones seriadas según el método descrito por Théry et al., (2006). Este método consistió en la realización de una ultracentrifugación a 100000 g durante 70 minutos a 4°C (ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-100 XP con rotor 70ti) para obtener un

pellet que contenía las VEs. Este pellet se resuspendió en 3.5 ml de PBS y se sometió a una nueva centrifugación en las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en un volumen final de 300 μ l y alicuotado en volúmenes de 50 μ l. Una de las alícuotas se utilizó para analizar la concentración de proteínas mediante el Kit Coomassie Plus Bradford assay (23238, Fisher Scientific™, Waltham, MA, Estados Unidos) siguiendo el protocolo del fabricante, utilizando la misma cantidad de proteína en cada muestra. Se estableció que una concentración de proteínas de 2 μ g/ μ l se corresponde con 1×10^7 VEs/ μ l (EXOCET, Exosome Quantitation Kit). Las alícuotas restantes se almacenaron a -80°C para su uso posterior.

6.5.4.2 *Identificación y caracterización de las VEs*

a. Medición del tamaño de las VEs

La distribución de tamaños de las VEs se evaluó mediante DLS. Para el DLS se utilizó el equipo Malvern Autosizer 4800 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Este sistema está equipado con un láser He-Ne de estado sólido con una longitud de onda de 488nm, una intensidad láser de 40 mW, temperatura de 25°C y un pinhole de 300. Una alícuota de 50 μ L de PBS con vesículas suspendidas fue utilizada para realizar el análisis. Los datos fueron analizados utilizando el software PCS (versión 1.61, Rev. 1, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) en modo automático. Se utilizaron los valores de intensidad que representan a los de la muestra pura, ya que implican un menor error (según el criterio establecido por Malvern Instruments INC). Además, se realizó una clasificación de la intensidad de las partículas para proporcionar datos más precisos sobre el tamaño de las VEs.

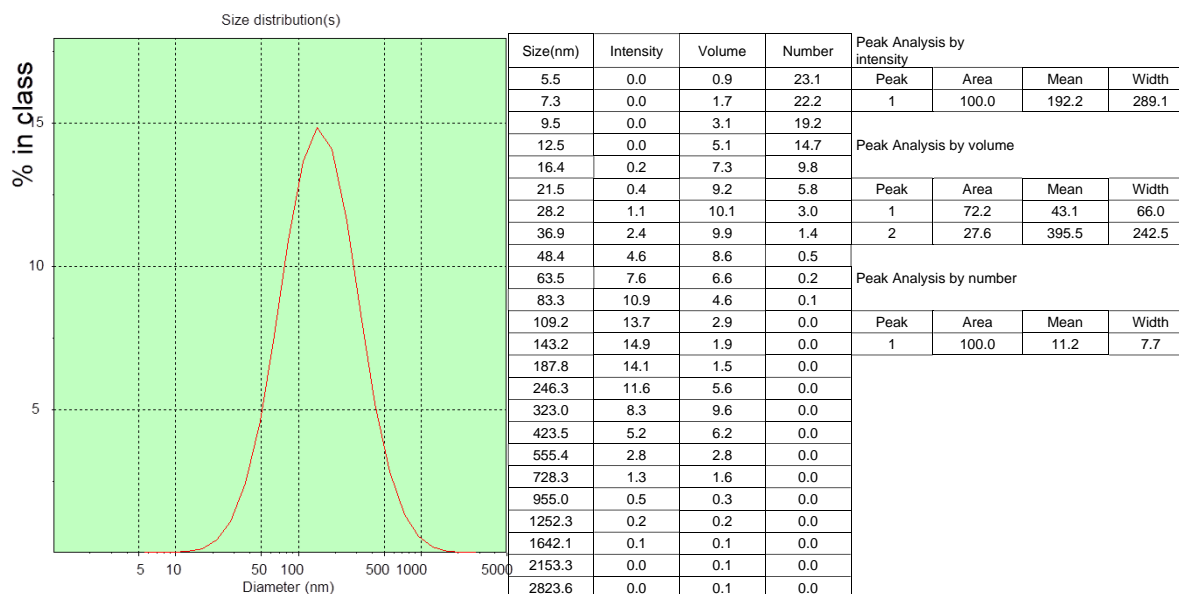


Figura 3: Gráfica del porcentaje de partículas entre 50-500 nm. Las tablas indican la intensidad, el volumen y el número de partículas según en tamaño en nm y sus valores medios.

b. Identificación de tetraspaninas y contaminación por albúmina mediante citometría de flujo

La concentración y la composición proteica de las VEs se examinaron utilizando un citómetro de flujo de alta resolución (CytoFLEX S; Beckman Coulter, División de Ciencias Biológicas, Indianápolis, EE. UU.). Para garantizar la precisión del citómetro en la entrada y en el conteo de VEs, se emplearon nanosferas fluorescentes de 50-100 nm de diámetro (Nanobead Calibration Kit, Bang Laboratories Inc. Drive Fisher, Indiana, EE. UU.). El análisis se centró en la detección de eventos con características de tamaño específicas de las VEs (Dispersión directa, FSC) y complejidad (dispersión lateral violeta (SSC)-A). Las muestras se analizaron utilizando un flujo bajo (5-10 μ l/min) y se adquirieron al menos 10,000 eventos por muestra. Se incubó una alícuota de 10 μ l de cada muestra de VEs con CellTrace™ CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína; Thermo Fisher Scientific) para identificar las VEs intactas y distinguirlas de estructuras que no eran VEs, incluidos fragmentos de membrana. La concentración de VEs se calculó a partir de los eventos positivos de CFSE y la tasa de dilución. Los anticuerpos utilizados fueron anti-HSP70 β -PE (ADI-SPA-844PE-050, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, EE. UU), anti-CD81-aloficocianina (BD Bioscience, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE.

UU), anti-CD63-FITC (clon REA1055, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), y anti-Albúmina-FITC (CLFAG16140, Cedarlane, Burlington, Canadá, EE. UU.).

c. Identificación de las VEs mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La visualización de las VEs se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello, se depositó una alícuota de 10 μ l en una membrana de rejilla recubierta de carbono Formvar y se dejó que se secase durante 1 minuto. Posteriormente se añadieron 10 μ L de acetato de uranilo al 2% y se dejó durante 1 minuto para lograr un contraste negativo; luego, se lavó la membrana y se dejó secar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes fueron capturadas utilizando una platina de microscopio electrónico JEOL1011 a 80kV (Jeol, Japón). Las fotografías se tomaron a una ampliación de 59000-97000 aumentos.

6.6 Diseño experimental

Se utilizaron 5 muestras de plasma para la extracción de PS-VEs, se realizó un pool y se congeló a -80°C para su uso posterior. Para analizar el efecto de las vesículas extracelulares del plasma seminal sobre los espermatozoides de epidídimo se planteó el siguiente diseño experimental:

6.6.1 Experimento 1. Efecto de las VEs del plasma seminal sobre la conservación de espermatozoides de epidídimo durante 0, 24, 48 72 h a 15°C .

30×10^6 spz/mL se suplementaron (**EP+**) o no (**EP-**) con 400×10^6 de VEs/ml, se conservaron a una temperatura de 15°C hasta 72 horas. A las 0, 24, 48 y 72 horas se realizaron los siguientes análisis (figura 4):

- Motilidad, evaluada mediante el sistema de análisis computerizado (CASA). Los parámetros analizados fueron la motilidad total, la motilidad progresiva, espermatozoides rápidos, medios, lentos, VCL, VSL, VAP, ALH, WOB, STR, LIN, BCF.
- Viabilidad, evaluada con el fluorocromo IP.
- Integridad del acrosoma, evaluada con la lectina PNA unida a fluoresceína
- Actividad metabólica mitocondrial, evaluada con Rh123.
- Resistencia térmica. Pasados los tiempos de conservación 24 y 72 horas, las muestras sometieron a una incubación durante 5 horas a 38.5°C . Transcurrido

este tiempo de determinó la motilidad, la viabilidad, integridad del acrosoma, y la actividad mitocondrial.

- Se realizaron 10 replicados para llevar a cabo la prueba de conservación.

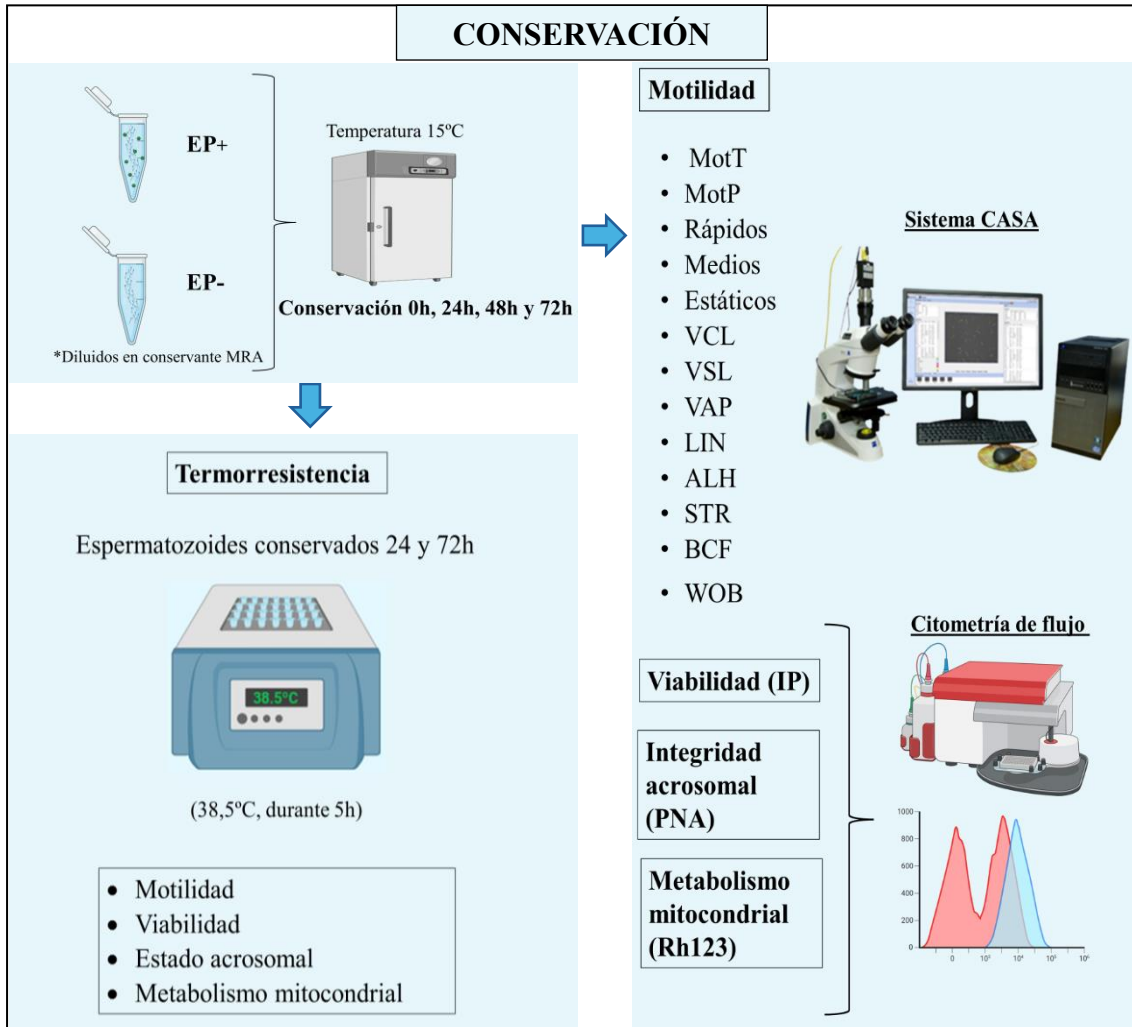


Figura 4: Diseño experimental para el estudio de conservación espermática.

6.6.2 Experimento 2. Efecto de las VEs del plasma seminal sobre la funcionalidad espermática

6.6.2.1 Efecto de las PS-VEs sobre la capacitación espermática

EP+ y EP- fueron diluidos en medio de capacitación TALP (3×10^6 spz/mL) e incubados durante 2 y 4 horas en a una temperatura de 38.5°C, 5% de CO₂ y humedad 100%. Como control se utilizaron EP+ y EP- diluidos en MRA e incubados en las mismas condiciones, aunque sin 5% de CO₂. Transcurridas las incubaciones, se procedió a la extracción de las proteínas para realizar el análisis de la actividad de la PKA y la fosforilación de tirosina mediante WB (figura 5). Se realizaron 5 replicados.

6.6.2.2 Efecto de las PS-VEs sobre la interacción de gametos y penetración espermática.

Ovocitos madurados in vitro y libres del *cumulus oophorus*. fueron inseminados con 125000 spz/mL procesados de la siguiente manera (figura 5):

- i. **EP+ y EP-** incubados durante 2 h en medio TALP (38.5°C, 5% de CO₂ y humedad 100%).
- ii. **EP+ y EP-** conservados en medio MRA durante 48 h.

Tras 16-18 de cocultivo se evaluaron los siguientes parámetros de fecundación: % de ovocitos penetrados, número de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida y número de espermatozoides por ovocito. Se realizaron 7 replicados.

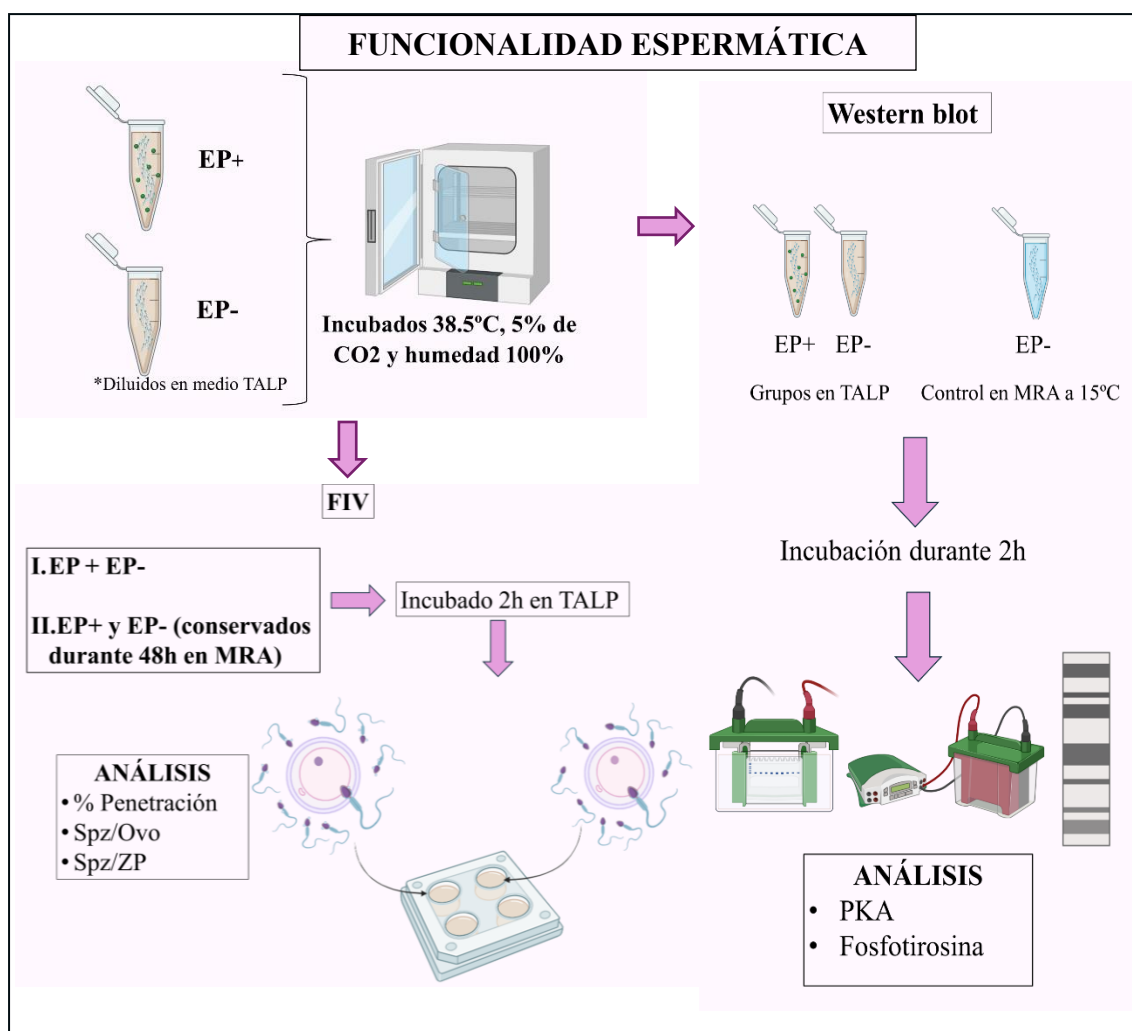


Figura 5: Diseño experimental para el estudio funcional de los espermatozoides.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software estadístico SPSS Statistics (licencia 2021, versión 28). En las pruebas de conservación, se utilizó la prueba *Anova de una vía*. Para los resultados de la FIV se utilizó la prueba *T de student* para muestras independientes. Se asumieron diferencias significativas cuando aparecía un p valor <0.05. Los datos se expresaron con la media del error estándar de la media \pm SEM.

7. Resultados

7.1 Caracterización de las PS-VEs

Las observaciones de microscopía electrónica de transmisión confirmaron la presencia de VEs (figura 6). Estas son redondeadas y se rodean de una doble membrana. El análisis por DLS detectó un tamaño de partícula de la muestra que rondaba 50-500 nm encontrándose partículas de mayor concentración con un tamaño de 200 nm. El porcentaje de los marcadores analizados para la presencia de VEs en las PS-VEs fue para CD63 de 21,7%; CD81 de 22,10%; HSP70 de 63,8%. Además, se confirmó la alta pureza de las muestras tras el análisis de detección de contaminación de albúmina (1,29%).

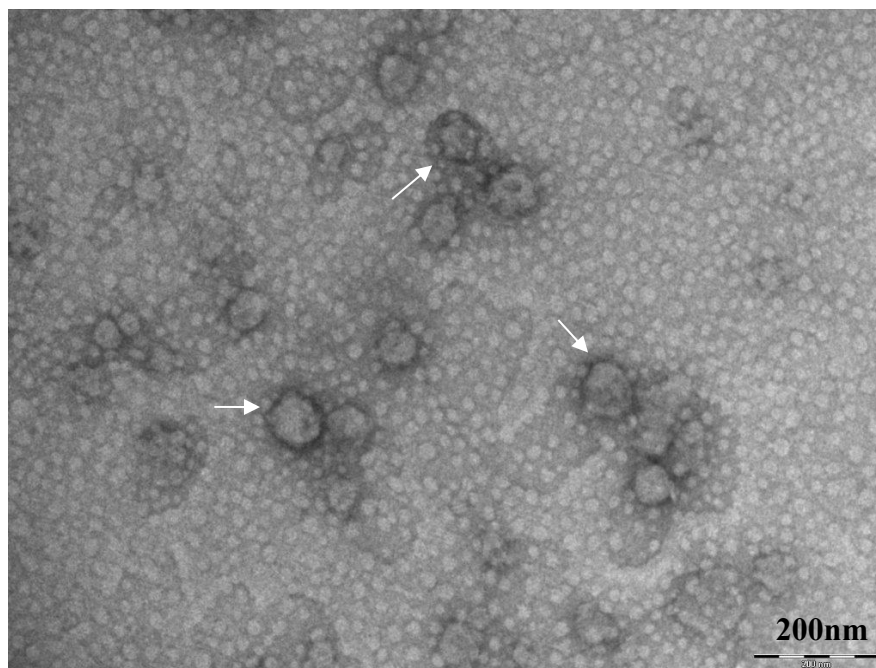


Figura 6: Detección de PS-VEs porcinos mediante TEM. Las flechas indican la morfología de las PS-VEs.

7.2 Pruebas de conservación

7.2.1 Motilidad espermática

Los resultados de motilidad total y progresiva en espermatozoides de epidídimo conservados a 15°C se muestran en la tabla 12. Se puede observar que la presencia de PS-VEs durante la conservación afectó a los parámetros de motilidad. Tanto la motilidad total como la progresiva se mantuvieron superiores a lo largo del tiempo cuando en el medio había PS-VEs. No obstante, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas para los tiempos de conservación 24 y 48 h, y para la motilidad progresiva las diferencias solo se observaron a las 48 h.

Tabla 12: Motilidad total y motilidad progresiva de espermatozoides de epidídimo conservados suplementados o no con PS-VEs durante 72 h a 15°C. Los resultados se presentan como media±SEM.

| Tiempo (h) | %Mot T | | %Mot P | |
|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| | EP+ | EP- | EP+ | EP- |
| 0 | 75,6±3,5 | 68,4±4,6 | 42,3±2,2 | 43,29±4,9 |
| 24 | 62,4±4,1 ^a | 46,7±4,9 ^b | 27,3±2,3 | 21,6±4,1 |
| 48 | 35,1±5,8 ^a | 17,3±5,6 ^b | 11,4±2,5 ^a | 4,1±2,5 ^b |
| 72 | 12,4±3,8 | 5,4±2,3 | 3,7±2,3 | 0,6±0,3 |

EP+: espermatozoides de epidídimo suplementados con PS-VEs, EP-: espermatozoides de epidídimo sin suplementar, %Mot T, porcentaje de motilidad total, %Mot P: porcentaje de motilidad progresiva. ^a y ^b en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al analizar la velocidad con la que se movían los espermatozoides comprobamos que estaba afectada por la presencia de vesículas en el medio de conservación (Figura 7 a, b y c). Se observó un incremento en el porcentaje de espermatozoides con velocidad media a las 0, 24, y 48 h cuando el medio es suplementado con PS-VEs. Por el contrario, a las 48h, el porcentaje de espermatozoides con velocidad lenta se vio incrementado. La presencia de PS-VEs no afectó al porcentaje de espermatozoides rápidos en los tiempos estudiados.

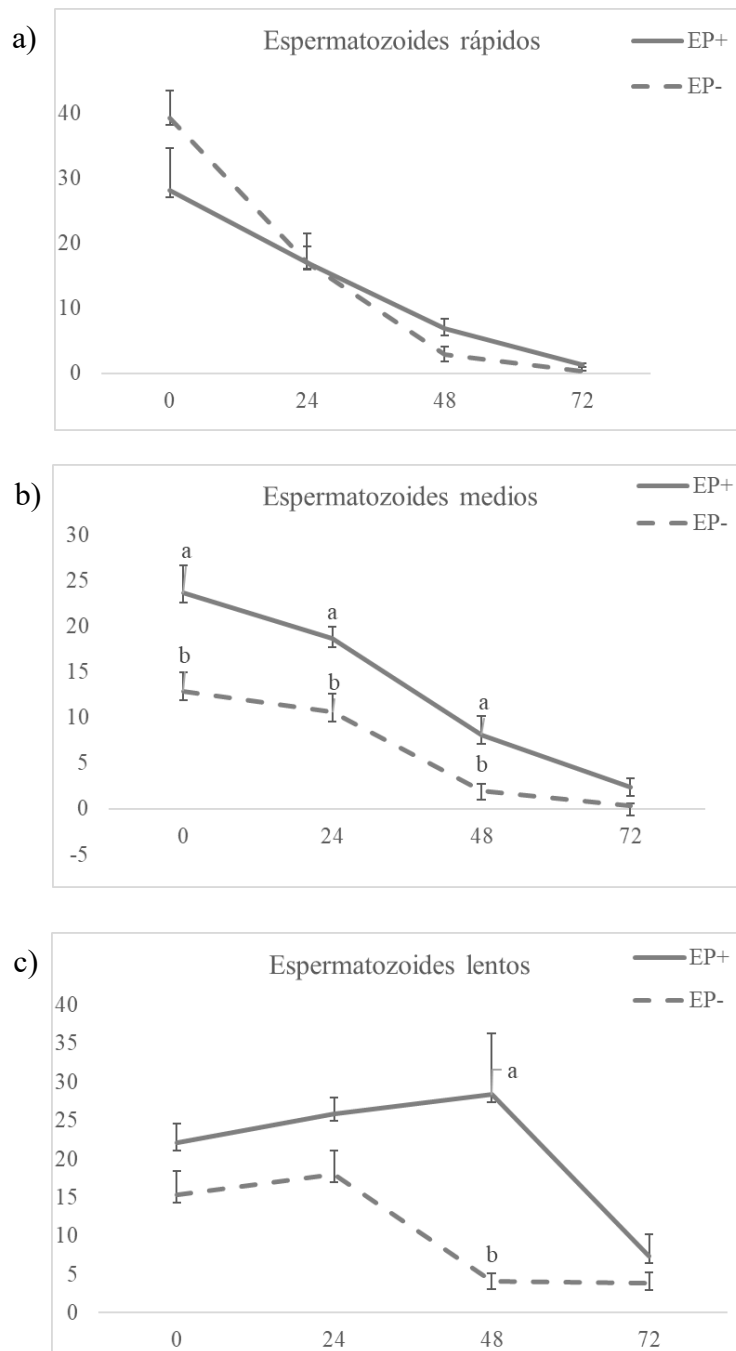


Figura 7: Porcentaje de espermatozoides con velocidad rápida (a), media (b) y lenta (c) durante 72 h de conservación y suplementados (EP+) o no (EP-) con PS-VEs. ^ay ^b indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Los resultados se presentan como media \pm SEM.

En la tabla 13 y tabla 14 se muestran los resultados de los parámetros de motilidad VCL, VSL, VAP, ALH, LIN, WOB, STR y BCF. En ella se puede observar que la velocidad de desplazamiento rectilínea y la velocidad de trayectoria fue significativamente inferior en espermatozoides suplementados a las 0 h respecto de en los no suplementados. Sin embargo, a las 72 h el parámetro desplazamiento lateral de la cabeza fue superior en espermatozoides suplementados con PS-VEs.

Tabla 13: Parámetros de motilidad (VCL, VSL, VAP y ALH) de espermatozoides de epidídimo suplementados o no con PS-VEs conservados a 15°C hasta 72 h. Los resultados se expresan en porcentaje. Los resultados se presentan como media±SEM.

| Tiempo (h) | VCL(μm/s) | | VSL(μm/s) | | VAP(μm/s) | | ALH(μm) | |
|------------|-----------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| | EP+ | EP- | EP+ | EP- | EP+ | EP- | EP+ | EP- |
| 0 | 90,9±5,6 | 105±5,7 | 29,6±1,8 ^a | 38,6±3,5 ^b | 40,7±2,4 ^a | 50,9±3,4 ^b | 3,6±0,2 | 4±0 |
| 24 | 78,3±4,3 | 89,9±4,7 | 21,4±1,2 | 24±3,1 | 33±1,8 | 36,4±3,5 | 3,4±0,3 | 3,9±0,3 |
| 48 | 67,9±2,7 | 63,1±7,2 | 17,1±1 | 16,3±3,1 | 27,7±1,5 | 25,6±4,2 | 3,1±0,3 | 2,6±0,5 |
| 72 | 64,7±19,2 | 39,7±8,6 | 12±1,4 | 8,7±0,9 | 21±2,3 | 17,4±2,2 | 2,1±0,6 ^a | 0,4±0,2 ^b |

EP+: espermatozoides de epidídimo suplementados con PS-VEs, EP-: espermatozoides de epidídimo sin suplementar, VCL: Velocidad de desplazamiento curvilínea, VSL: Velocidad de desplazamiento rectilínea, VAP: Velocidad de trayectoria, ALH: Desplazamientos laterales de la cabeza. ^a y ^b en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 14: Parámetros de motilidad (LIN, STR, WOB y BCF) de espermatozoides de epidídimo suplementados o no con PS-VEs conservados a 15°C hasta 72 h. Los resultados se presentan como media±SEM.

| Tiempo (h) | LIN(%) | | STR(%) | | WOB(%) | | BCF(Hz) | |
|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|-------|
| | EP+ | EP- | EP+ | EP- | EP+ | EP- | EP+ | EP- |
| 0 | 31,9±1,7 | 34,6±2,1 | 723±2,8 | 73,7±3,3 | 44,3±1 | 40,4±6 | 6,6±0,3 | 7±0,4 |
| 24 | 28,9±2,4 | 27,9±3,4 | 65,6±2,7 | 65,7±2,9 | 43,4±2,2 | 41,9±3,5 | 6±0,4 | 6±0,4 |
| 48 | 25,3±1,4 | 25,1±2,4 | 62,3±1,9 | 67,6±7,4 | 40,7±2,1 | 39,6±3,9 | 6±0,4 | 4,9±1 |
| 72 | 24,6±4,8 | 25,9±3,5 | 59,6±3,6 | 52,1±4,3 | 45,4±2,4 | 48,3±3,7 | 4±1,1 | 2±1 |

EP+: espermatozoides de epidídimo suplementados con PS-VEs, EP-: espermatozoides de epidídimo sin suplementar, LIN: Linealidad espermática, STR: Índice de rectitud espermática, WOB: Oscilación lateral de la cabeza, BCF: Frecuencia de cruzamiento.

En la tabla 15 se muestran los resultados de los parámetros motilidad total y progresiva tras la prueba de termorresistencia a las 24 y 72 horas. Aunque no se observaron diferencias significativas, el porcentaje de espermatozoides con motilidad total y progresiva fue superior cuando eran conservados con PS-VEs tanto a las 24 como a las 72 h.

Tabla 15: Motilidad total y motilidad progresiva de espermatozoides sometidos a una prueba de termorresistencia tras 24 y 72 h de conservación en presencia o no de PS-VEs. Los resultados se presentan como la media±SEM.

| Tiempo (h) | %Mot T | | %Mot P | |
|------------|------------|-----------|----------|----------|
| | EP+ | EP- | EP+ | EP- |
| 24 | 61,43±10,6 | 51,3±11,6 | 39,3±7,3 | 29,4±7,3 |
| 72 | 26,7±11,5 | 22,17±10 | 13,6±8,3 | 9,3±4,7 |

EP+: espermatozoides de epidídimo suplementados con PS-VEs, EP-: espermatozoides de epidídimo sin suplementar, %Mot T, porcentaje de motilidad total, %Mot P: porcentaje de motilidad progresiva.

7.2.2 Evaluación de viabilidad y daño acrosomal

Los resultados de viabilidad y daño acrosomal de los espermatozoides conservados a 15°C a las 0, 24, 48 y 72 horas se muestran en la figura 8 a y b respectivamente. A las 48 horas se observó que el porcentaje de espermatozoides vivos era significativamente menor en el grupo de espermatozoides incubados con PS-VEs. El porcentaje de espermatozoides que presentan el acrosoma intacto se mantuvo significativamente menor a lo largo del tiempo a partir de las 24 h hasta las 72 h en los espermatozoides suplementados con PS-VEs.

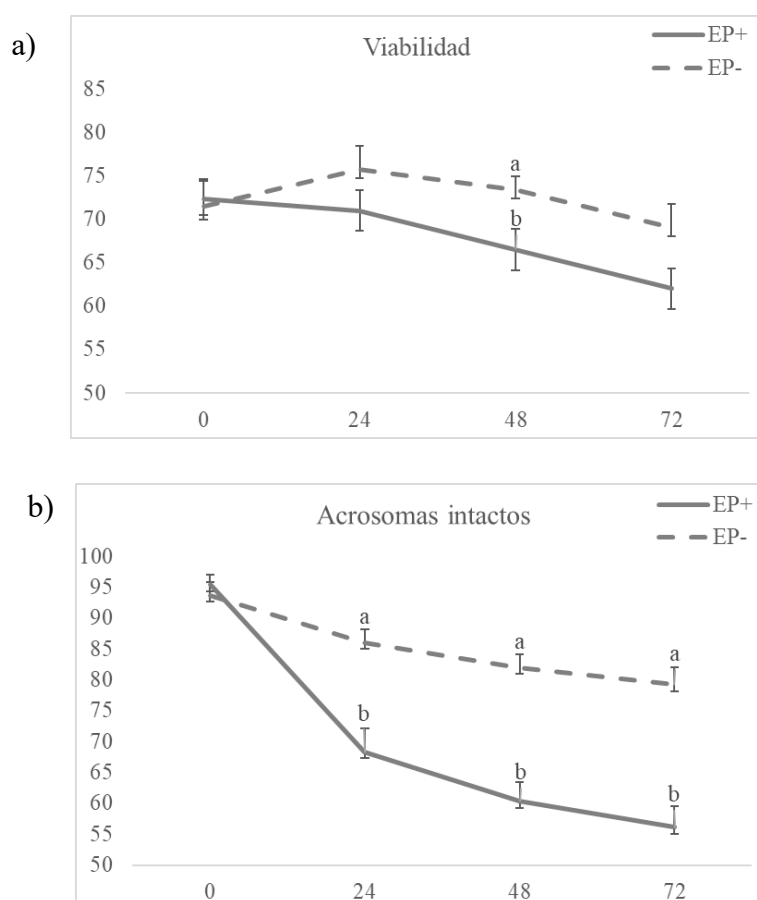


Figura 8: a) Vitalidad espermática durante las 72 h de conservación a 15°C. b) Daño acrosomal espermática durante las 72 h de conservación a 15°C. ^a y ^b en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los resultados se presentan como media \pm SEM.

En la tabla 16 se muestran los resultados de viabilidad y acrosomas intactos tras la prueba de termorresistencia. El porcentaje de acrosomas intactos fue superior a lo largo del tiempo en el grupo espermatozoides no suplementados, observándose diferencias significativas a las 72 h. No hubo diferencias significativas en viabilidad.

Tabla 16: Viabilidad, acrosomas intactos en espermatozoides conservados durante 24 y 72 h tras la prueba de termorresistencia. Los resultados se expresan como media±SEM.

| Tiempo (h) | Viabilidad | | Acrosomas intactos | |
|------------|------------|----------|-----------------------|-----------------------|
| | EP+ | EP- | EP+ | EP- |
| 24 | 66±2,5 | 68,6±3,5 | 64,7±3,3 ^a | 83,3±3,2 ^b |
| 72 | 56,3±4,2 | 61,3±5 | 48,2±1,2 ^a | 73,3±4,7 ^b |

EP+: espermatozoides de epidídimo suplementados con PS-VEs, EP-: espermatozoides de epidídimo sin suplementar. ^a y ^b en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

7.2.3 Evaluación de la actividad metabólica

En la figura 9a se muestran los resultados de la actividad metabólica mitocondrial de los espermatozoides epididimarios conservados durante 72 h a 15°C. No se observaron diferencias a lo largo del tiempo entre grupos. En la figura 9 b se muestran los resultados de actividad metabólica de los espermatozoides epididimarios tras la prueba de termorresistencia a las 24 y 72 h. Tampoco se observaron diferencias entre grupos a lo largo del tiempo.

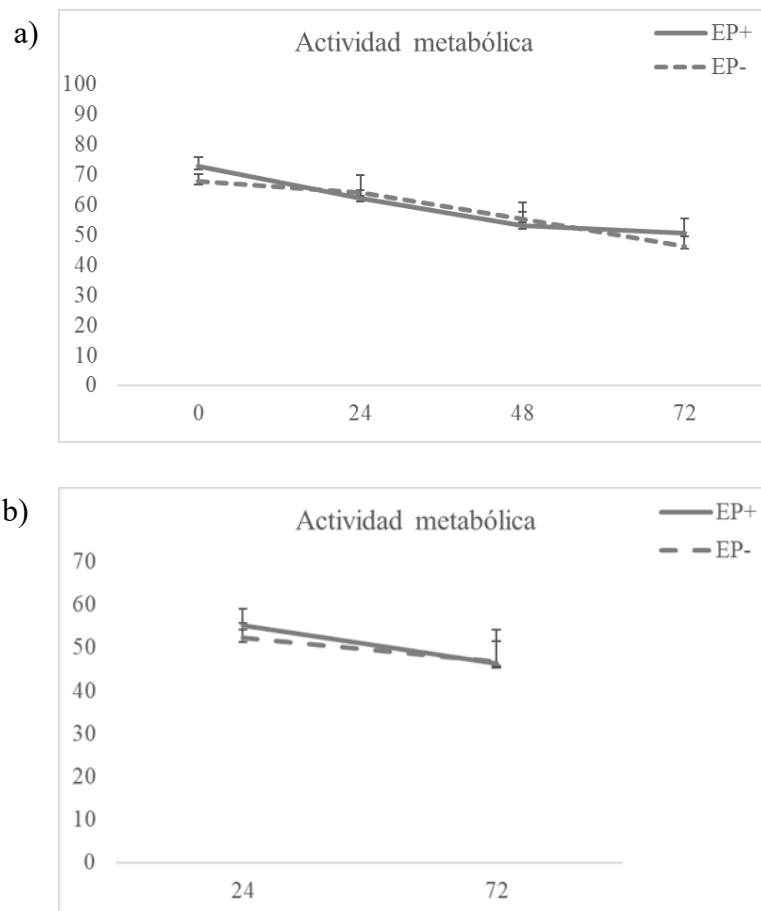


Figura 9: a) Actividad metabólica durante 72 h de conservación a 15°C. b) Actividad metabólica tras la prueba de termorresistencia a las 24 y 72 h. Los resultados se presentan como $\text{media} \pm \text{SEM}$.

7.2.4 Actividad de PKA y fosforilación de tirosina

Los resultados de actividad de PKA, fosfotirosina y tubulina se encuentran representados en la figura 10. Con respecto a la PKA, (figura 10 a) los resultados mostraron diferencias en los patrones actividad de PKA y en la intensidad de bandas entre los grupos experimentales. En el grupo de espermatozoides capacitados suplementados con PS-VEs se observó una disminución estadísticamente significativa de la intensidad de bandas en comparación con los capacitados no suplementados (Figura 10 c).

Con relación a la fosfotirosina, los westerns blot mostraron dos bandas entre los 50 y 37 kDa de similar intensidad en todos los grupos experimentales. También la aparición de una banda de aproximadamente 25 kDa que únicamente aparecía en los dos grupos experimentales de espermatozoides capacitados (Figura 10 b). Además, se observa la aparición de una banda de 20kDa que únicamente aparece en el grupo de espermatozoides

capacitados incubados sin PS-VEs. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos al analizar la densidad óptica total por calle (Figura 10 d).

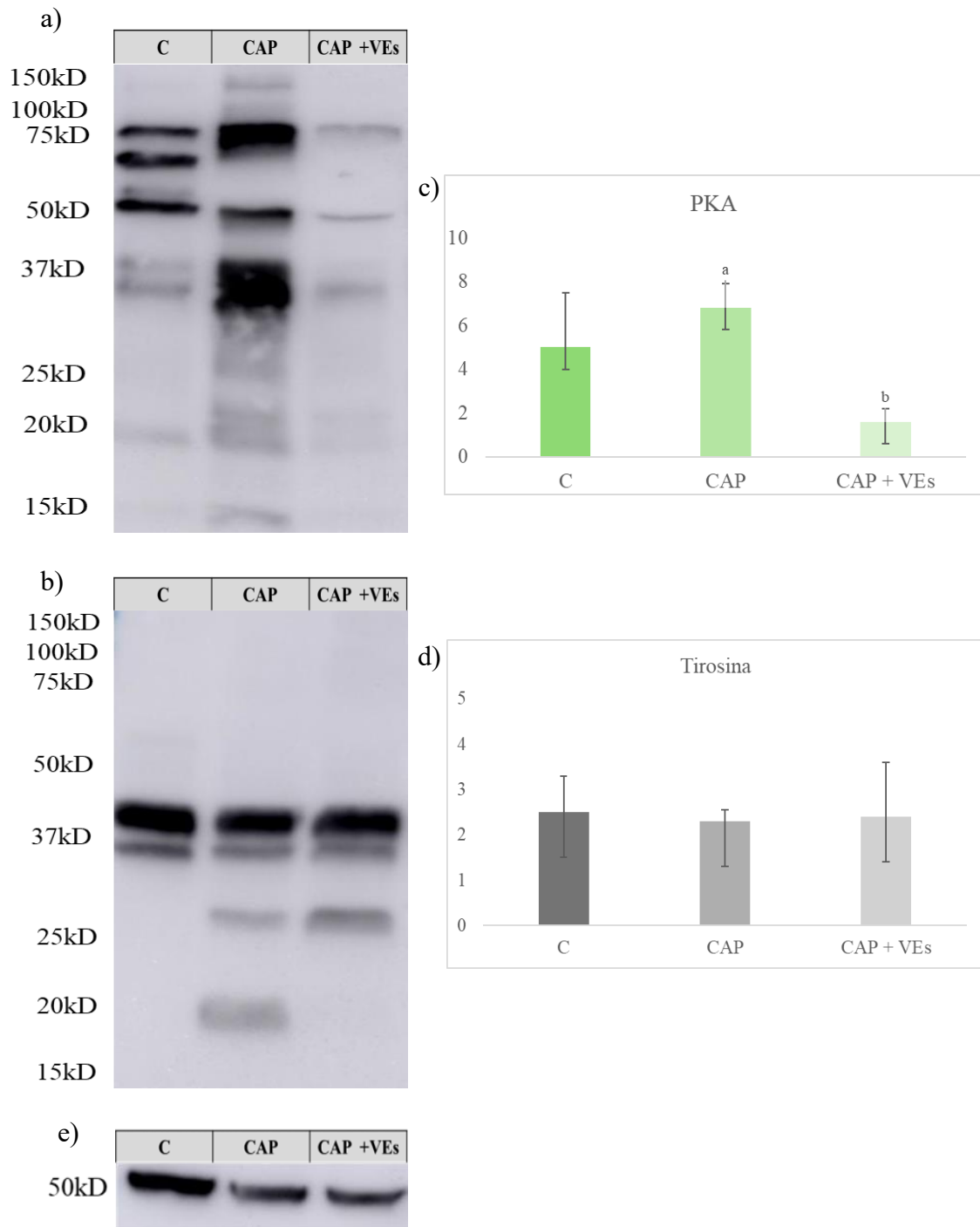


Figura 10: Western blot en espermatozoides de epidídimo bajo condiciones capacitantes (CAP) y no capacitantes (Control) incubados con (PS-VEs) o sin vesículas. a) Inmunodetección de PKA b) Inmunodetección de fosforilación en tirosina. c) Densidad óptica PKA evaluada por calle. d) Densidad óptica de fosforilación de tirosina total evaluada por calle. e) Inmunodetección de tubulina (control de carga). ^a y ^b indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

7.2.5 Fecundación in vitro (FIV)

Los resultados de FIV tras 2 horas de incubación espermática se muestran en la tabla 17. Se observó que el porcentaje de ovocitos penetrados, número de espermatozoides por ovocito penetrado y espermatozoides unidos a la zona pelúcida disminuyó de forma significativa al inseminar con espermatozoides preincubados con PS-VEs.

Tabla 17: Efecto de la presencia de PS-VEs durante la FIV con espermatozoides de epidídimo. Los resultados se presentan como media±SEM.

| Tratamiento | Nº ovocitos | Pen (%) | Spz/Ovo | Spz/ZP |
|-------------|-------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| EP+ | 217 | 30,0±3,1 ^b | 0,7±0,1 ^b | 6,9±0,5 ^b |
| EP- | 223 | 67,3±3,2 ^a | 5,1±0,4 ^a | 16,8±1,5 ^a |

EP+: espermatozoides de epidídimo suplementados con PS-VEs, EP-: espermatozoides de epidídimo sin suplementar, Pen %: Porcentaje de ovocitos penetrados, Spz/Ovo: Espermatozoides que han penetrado por cada ovocito, Spz/ ZP: Número de espermatozoides por zona pelúcida. ^a y ^b en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

Al igual que ocurrió con los espermatozoides sin conservar, los parámetros porcentaje de ovocitos penetrados, número de espermatozoides por ovocito penetrado y espermatozoides unidos a la zona pelúcida, fue menor al inseminar con espermatozoides de epidídimo incubados con PS-VEs y conservados durante 48 h (tabla 18).

Tabla 18: Efectos de la presencia de las PS-VEs sobre la FIV usando espermatozoides de epidídimos conservados durante 48h con o sin vesículas. Los resultados se presentan como media±SEM.

| Tratamiento | N ovocitos | Pen (%) | Spz/Ovo | Spz/ZP |
|-------------|------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| EP+ | 185 | 21,6±3 ^a | 0,38±0,1 ^a | 10,8±1 ^a |
| EP- | 217 | 97,7±1 ^b | 6,5±0,3 ^b | 41,8±2,9 ^b |

EP+: espermatozoides de epidídimo suplementados con PS-VEs, EP-: espermatozoides de epidídimo sin suplementar, Pen %: Porcentaje de ovocitos penetrados, Spz/Ovo: Espermatozoides que han penetrado por cada ovocito, Spz/ ZP: Número de espermatozoides por zona pelúcida. ^a y ^b en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

8. Discusión

Los espermatozoides almacenados en la cola de epidídimo solamente han estado en contacto con las secreciones y VEs del epidídimo. En el momento de la eyaculación, se mezclarán con las secreciones y VEs de las glándulas accesorias. La mayor parte de estudios realizados se han centrado en observar el papel de las PS-VEs sobre los espermatozoides eyaculados, sin embargo, estos ya han estado previamente expuestos a las secreciones de las glándulas accesorias y podría enmascarar la función que hacen

exclusivamente las PS-VEs sobre ellos. Por tanto, sería interesante analizar el efecto de las PS-VEs sobre espermatozoides epididimarios

Los espermatozoides de verraco tienen la ventaja de poder conservarse diluidos a una temperatura aproximada de 15°C lo que ha permitido la gran difusión de la inseminación artificial en esta especie. Sin embargo, la calidad seminal disminuye a lo largo del tiempo de conservación. Se sabe que el plasma seminal ayuda al mantenimiento de las funciones de los espermatozoides y evitan su capacitación prematura y, probablemente, las PS-VEs podrían estar implicadas en este hecho. Por ello, en este estudio se ha planteado evaluar el papel de las PS-VEs sobre la conservación en los espermatozoides de epidídimo.

Los resultados del estudio han mostrado que la suplementación al medio de conservación espermático con PS-VEs mejoró la motilidad, tanto la total como la progresiva a lo largo del tiempo. No obstante, a pesar de que los efectos en la motilidad total se hacen visibles a las 0h, no fueron estadísticamente significativos hasta las 24 h. Estos resultados son similares a otros realizados sobre conservación en eyaculado en los que también se observó una mejoría en la motilidad del espermatozoide cuando se suplementaban a unas condiciones óptimas con exosomas (Du et al., 2016; Wang et al., 2024). Otros estudios como el realizado por Guo et al., (2019), en el que trabajaron en condiciones no capacitantes o el realizado por Lange-Consiglio et al., (2022), en el que incubaron en medio de capacitación (TALP) pusieron de manifiesto que las PS-VEs solo mejoraban la motilidad progresiva. Estos resultados demuestran por tanto que las PS-VEs afectaban a la motilidad de los espermatozoides en ambas condiciones funcionales. El mecanismo por el que esto ocurre podría explicarse con los estudios realizados por Park et al., (2011) en el que observaron que los prostasomas contienen Ca^{2+} y la maquinaria necesaria para regular esta vía de señalización, la cual es fundamental para el mantenimiento de la motilidad. En cuanto a la velocidad se vio que la velocidad media y lenta estaba influida por las PS-VEs. Se observó una bajada menos acusada de la velocidad media y un aumento de la velocidad lenta significativa a las 48 h cuando los espermatozoides se encontraban suplementados. La explicación podría deberse a que la suplementación con PS-VEs afecta a la disminución de la velocidad, siendo menos acusada. Con respecto al resto de parámetros de motilidad, se observó que a las 0 h se producía una disminución en la velocidad de desplazamiento rectilínea y en la velocidad de trayectoria en el grupo suplementado. A lo largo del tiempo se observó que estos valores cambiaban, aunque no llegaron a ser significativos. Esto puede deberse a un efecto asociado con el diluyente ya

que, basándonos en el estudio de Lange-Consiglio et al., (2022) la mayor adhesión de PS-VEs a los espermatozoides ocurre a partir de 1 h y nuestro estudio evaluó estos parámetros a las 0 h. Además, se vio que las PS-VEs mantenían el desplazamiento lateral de la cabeza a las 72 h. Sin embargo, no existen otros estudios en la bibliografía relacionados con los que poder comparar nuestros resultados.

Con respecto a la viabilidad se observó que la suplementación con PS-VEs la disminuía al igual que ocurrió con la integridad acrosomal durante el tiempo de conservación analizado. Estos resultados son contradictorios con los obtenidos en espermatozoides eyaculados, en los que la suplementación con PS-VEs mejoraba la integridad de membrana plasmática de los espermatozoides almacenados, hecho atribuido probablemente, a las propiedades antioxidantes que poseen las PS-VEs (Du et al., 2016; Wang et al., 2024). Sin embargo, no hemos encontrado en la literatura consultada ningún estudio que evalúe la integridad acrosomal y la viabilidad de los espermatozoides epididimarios.

Un resultado curioso encontrado en este trabajo fue que, a pesar de que la motilidad se viese modificada, no hubo diferencias entre grupos en cuanto a la actividad metabólica. Hay estudios que han puesto de manifiesto que las PS-VEs aumentan la actividad metabólica ya que las transportan ATP activando la glucólisis y la producción de energía en las mitocondrias de los espermatozoides manteniendo diversas funciones, entre ellas, la motilidad (Guo et al., 2019; Wang et al., 2024). No obstante, no hemos hallado otros estudios que evalúen la influencia de las PS-VEs sobre la actividad metabólica y la producción de ATP en los espermatozoides de epidídimo que apoyen o no los resultados obtenidos en este trabajo.

Los espermatozoides hasta que llegan al lugar de fecundación van a estar sometidos a cambios de temperatura. Por ello, nos planteamos ver que efecto producían las PS-VEs en los espermatozoides cuando eran sometidos a un estrés térmico. Los resultados no mostraron diferencias ni en motilidad ni en viabilidad, pero sí que se observó que el grupo de espermatozoides suplementados con PS-VEs aumentaba significativamente el porcentaje de espermatozoides con daño en el acrosoma en ambos tiempos. La explicación pudiera ser por el propio efecto negativo que tienen las PS-VEs en el acrosoma de los espermatozoides epididimarios.

Posiblemente los estudios sobre capacitación o fecundación in vitro sean los que más información aporten sobre la funcionalidad espermática. Por ello, como primer paso, decidimos estudiar la capacitación evaluando la actividad de la PKA y la fosforilación de la tirosina de los espermatozoides mediante WB. Observamos que las PS-VEs disminuían la actividad de la PKA. Soriano-Úbeda et al., (2021) compararon la actividad de la PKA entre espermatozoides capacitados de epidídimo y de eyaculado y observaron que los espermatozoides eyaculados mostraban una actividad de PKA reducida respecto de los espermatozoides de epidídimo. Basándonos en nuestros resultados, podríamos atribuir que gran parte del efecto del PS sobre la capacitación sea debida a la acción de PS-VEs presentes en el plasma. Con respecto a los resultados de la fosforilación de tirosina se observó la desaparición de una banda de unos 20 kDa cuando los espermatozoides fueron incubados con PS-VEs, indicando que la adición de PS-VEs en el medio inhibe la fosforilación de la tirosina de proteínas con este peso. Otros estudios han mostrado diferencias significativas en la intensidad de bandas y, además, se relacionó la presencia de exosomas con la inhibición de la pérdida de colesterol y el aumento de fluidez de membrana y la desaparición de una banda de 14 kDa en la fosforilación de tirosina (Piehl et al., 2013.). Cabe destacar que estos autores trabajaron con espermatozoides de eyaculado que tienen un patrón de fosforilación diferente a los espermatozoides de epidídimo (Soriano-Úbeda et al., 2021).

Finalmente, los resultados de la FIV utilizando espermatozoides incubados 2 horas con PS-VEs o tras 48h de conservación mostraron un descenso en los parámetros de fecundación, reduciendo el porcentaje de penetración de los ovocitos, el número de espermatozoides por ovocito, así como los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida. Esto parece indicar que las PS-VEs participan en la regulación de la capacitación y por tanto en la fecundación de los ovocitos y que, además, estos efectos se mantienen a lo largo del tiempo. Sin embargo, al igual que ocurrió con los experimentos realizados anteriormente, tampoco hemos encontrado estudios similares con espermatozoides de epidídimo donde poder contrastar los resultados obtenidos en este trabajo. Barranco et al., (2024) y Xu et al., (2024), en estudios realizados con espermatozoides eyaculados observaron también que las PS-VEs disminuyen la reacción acrosomal y la fertilidad in vitro (Barranco et al., 2024; Xu et al., 2024). Además, han mostrado que las PS-VEs son capaces de reducir la capacidad de los espermatozoides para adherirse a la zona pelúcida, algo que también hemos observado en nuestro trabajo. Estos autores pensaron que este

hecho era debido a la influencia de las PS-VEs sobre la espermadhesinas ya que en estudios in vitro se ha demostrado que estas alteran la capacidad de los espermatozoides porcinos para unirse a la zona pelúcida de los ovocitos (Caballero et al., 2005).

Los resultados obtenidos concuerdan con la función principal a la que se asocia al plasma seminal, y en concreto a las PS-VEs, que son la de proteger a los espermatozoides evitando la capacitación prematura y manteniéndolos en un metabolismo bajo, con el fin de sobrevivir el mayor tiempo posible para que una vez que entren en el tracto reproductivo femenino hiperactivarse y prepararse para la fertilización (Xu et al., 2024). Por ello, puede que sean las PS-VEs las relacionadas con estas funciones.

No obstante, son necesarios más estudios sobre los distintos efectos que presentan las PS-VEs sobre los espermatozoides de epidídimo, ya que, como hemos comentado a lo largo de la presente discusión, no hemos encontrado referencias bibliográficas que apoyen nuestros resultados.

9. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas de este trabajo fueron:

- Las PS-VEs mejoran la conservación espermática, aunque no la viabilidad ni la integridad acrosomal en espermatozoides de epidídimo.
- Las PS-VEs no mejoran la calidad espermática tras un estrés térmico.
- La capacitación espermática evaluada a través de la actividad de la PKA disminuye en presencia de las PS-VEs.
- Las PS-VEs inhiben la fosforilación en tirosina de proteínas con pesos próximos 20 kDa.
- Los parámetros de FIV se reducen al fecundar con espermatozoides incubados con PS-VEs.

10. Bibliografía

- Aalberts, M., Stout, T., & Stoorvogel, W. (2014). Prostatosomes: extracellular vesicles from the prostate. *Reproduction*, 147(1), R1-14.
<https://rep.bioscientifica.com/downloadpdf/view/journals/rep/147/1/R1.pdf>
- Agrawal, Y., & Vanha-Perttula, T. (1986a). Alanine aminopeptidase of bovine seminal vesicle secretion. *The International Journal of Biochemistry*, 18(8), 725–729.
[https://doi.org/10.1016/0020-711X\(86\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0020-711X(86)90396-4)

- Agrawal, Y., & Vanha-Perttula, T. (1986b). Studies on the multiple forms of aminopeptidase A in bovine seminal vesicle secretion. *The International Journal of Biochemistry*, 18(5), 465–471. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(86\)90190-4](https://doi.org/10.1016/0020-711X(86)90190-4)
- Arcântara-Neto, A. S., Schmaltz, L., Caldas, E., Blache, M. C., Mermillod, P., & Almiñana, C. (2020). Porcine oviductal extracellular vesicles interact with gametes and regulate sperm motility and survival. *Theriogenology*, 155, 240–255. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.05.043>
- Álvarez-Rodríguez, M., Vicente-Carrillo, A., & Rodríguez-Martínez, H. (2018). Hyaluronan improves neither the long-term storage nor the cryosurvival of liquid-stored CD44-bearing AI boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 64(4), 351–360. <https://doi.org/10.1262/JRD.2017-141>
- Arienti, G., Carlini, E., De Cosmo, A. M., Di Profio, P., & Palmerini, C. A. (1998). Prostate-like particles in stallion semen. *Biology of Reproduction*, 59(2), 309–313. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD59.2.309>
- Badia Brea, M. E. (2003). Estudi estructural, ultraestructural i histoquímic de les glàndules sexuals accessòries del mascle reproductor porcí (*Sus domesticus*). Universitat de Girona. <https://dugi-doc.udg.edu/handle/10256/4554>
- Badia, E., Badia, E., Pinart, E., Briz, M., Pastor, L. M., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Bassols, J., Kádár, E., Pruneda, A., Bussalleu, E., Yeste, M., & Bonet, S. (2004). Lectin histochemistry of the boar bulbourethral glands. *Dugi-Doc.Udg.Edu*, 49(2), 25–32. <https://dugi-doc.udg.edu/handle/10256/8301>
- Bai, R., Latifi, Z., Kusama, K., Nakamura, K., Shimada, M., & Imakawa, K. (2018). Induction of immune-related gene expression by seminal exosomes in the porcine endometrium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 1094–1101. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.11.100>
- Barceló, M., Mata, A., Bassas, L., & Larriba, S. (2018). Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. *Human Reproduction*, 33(6), 1087–1098. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEY072>
- Barranco, I., Padilla, L., Parrilla, I., Álvarez-Barrientos, A., Pérez-Patiño, C., Peña, F. J., Martínez, E. A., Rodríguez-Martínez, H., & Roca, J. (2019). Extracellular vesicles isolated from porcine seminal plasma exhibit different tetraspanin expression profiles. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48095-3>
- Barranco, I., Sanchez-López, C. M., Bucci, D., Alvarez-Barrientos, A., Rodríguez-Martínez, H., Marcilla, A., & Roca, J. (2023). The Proteome of Large or Small Extracellular Vesicles in Pig Seminal Plasma Differs, Defining Sources and Biological Functions. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 22(4), 100514. <https://doi.org/10.1016/J.MCPRO.2023.100514>
- Barranco, I., Spinaci, M., Nesci, S., Mateo-Otero, Y., Baldassarro, V. A., Algieri, C., Bucci, D., & Roca, J. (2024). Seminal extracellular vesicles alter porcine in vitro fertilization outcome by modulating sperm metabolism. *Theriogenology*, 219, 167–179. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2024.02.024>
- Bechoua, S., Rieu, I., Sion, B., & Grizard, G. (2011). Prostate-like particles as Potential Modulators of Tyrosine Phosphorylation in Human Spermatozoa. *Systems Biology in*

- Reproductive Medicine, 57(3), 139–148.
<https://doi.org/10.3109/19396368.2010.549538>
- Belleannée, C., Calvo, É., Caballero, J., & Sullivan, R. (2013). Epididymosomes convey different repertoires of micrnas throughout the bovine epididymis. *Biology of Reproduction*, 89(2), 30–31.
<https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.113.110486/2513985>
- Bonet, S., Garcia, E., & Sepúlveda, L. (2013). The boar reproductive system. *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*, 9783642350498, 65–107. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8_3
- Breitbart, H., & Rubinstein, S. (1982). Characterization of Mg²⁺- and Ca²⁺-ATPase activity in membrane vesicles from ejaculated ram seminal plasma. *Archives of Andrology*, 9(2), 147–157. <https://doi.org/10.3109/01485018208990233>
- Breitbart, H., Stern, B., & Rubinstein, S. (1983). Calcium transport and Ca²⁺-ATPase activity in ram spermatozoa plasma membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 728(3), 349–355. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90505-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90505-9)
- Breton, S., Nair, A. V., & Battistone, M. A. (2019). Epithelial dynamics in the epididymis: role in the maturation, protection, and storage of spermatozoa. *Andrology*, 7(5), 631–643. <https://doi.org/10.1111/ANDR.12632>
- Breton, S., Ruan, Y. C., Park, Y. J., & Kim, B. (2016). Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian Journal of Andrology*, 18(1), 3–9. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.165946>
- Bromfield, J. J. (2014). Seminal fluid and reproduction: Much more than previously thought. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(6), 627–636.
<https://doi.org/10.1007/S10815-014-0243-Y/FIGURES/1>
- Caballero, I., Vázquez, J. M., Rodríguez-Martínez, H., Gil, M. A., Calvete, J. J., Sanz, L., ... & Martínez, E. A. (2005). Influence of seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin on pig gamete interaction. *Zygote*, 13(1), 11-16. doi:10.1017/S0967199405003072
- Candenas, L., & Chianese, R. (2020). Exosome Composition and Seminal Plasma Proteome: A Promising Source of Biomarkers of Male Infertility. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 7022, 21(19), 7022.
<https://doi.org/10.3390/IJMS21197022>
- Cheng, Q., Li, L., Jiang, M., Liu, B., Xian, Y., Liu, S., Liu, X., Zhao, W., & Li, F. (2022). Extend the Survival of Human Sperm In Vitro in Non-Freezing Conditions: Damage Mechanisms, Preservation Technologies, and Clinical Applications. *Cells* 2022, Vol. 11, Page 2845, 11(18), 2845. <https://doi.org/10.3390/CELLS11182845>
- Cordeiro, L., Lin, H. L. H., Carvalho, A. V., Grasseau, I., Uzbekov, R., & Blesbois, E. (2021). First insights on seminal extracellular vesicles in chickens of contrasted fertility. *Reproduction*, 161(5), 489–498. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0462>
- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., Buzás, E. I., & Lötvall, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1), 20677. <https://doi.org/10.3402/JEV.V2I0.20677>

- Druart, X., Rickard, J. P., Tsikis, G., & de Graaf, S. P. (2019). Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology*, 137, 30–35. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.05.034>
- Du, J., Shen, J., Wang, Y., Pan, C., Pang, W., Diao, H., & Dong, W. (2016). Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget*, 7(37), 58832. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.11315>
- Dyce, K., Sack, W., & Wensing, C. (2012). *Anatomía veterinaria*. <https://apunteca.usal.edu.ar/id/eprint/2969/>
- El-Hajj Ghaoui, R., Thomson, P. C., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2004). Characterization and localization of membrane vesicles in ejaculate fractions from the ram, boar and stallion. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 39(3), 173–180. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2004.00499.X>
- Funahashi, H., & Nagai, T. (2001). Regulation of in vitro penetration of frozen–thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 58(4), 424–431
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, 5(2), 204–218. <https://doi.org/10.1111/ANDR.12320>
- Guo, H., Chang, Z., Zhang, Z., Zhao, Y., Jiang, X., Yu, H., Zhang, Y., Zhao, R., & He, B. (2019). Extracellular ATPs produced in seminal plasma exosomes regulate boar sperm motility and mitochondrial metabolism. *Theriogenology*, 139, 113–120. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.08.003>
- Guyonnet, B., Dacheux, F., Dacheux, J. L., & Gatti, J. L. (2011). The Epididymal Transcriptome and Proteome Provide Some Insights Into New Epididymal Regulations. *Journal of Andrology*, 32(6), 651–664. <https://doi.org/10.2164/JANDROL.111.013086>
- Hasan, M. M., Reshi, Q. U. A., Lättekivi, F., Viil, J., Godakumara, K., Dissanayake, K., Andronowska, A., Jaakma, Ü., & Fazeli, A. (2021). Bovine follicular fluid derived extracellular vesicles modulate the viability, capacitation and acrosome reaction of bull spermatozoa. *Biology*, 10(11), 1154. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10111154/S1>
- Hristov, M., Erl, W., Linder, S., & Weber, P. C. (2004). Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, 104(9), 2761–2766. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-10-3614>
- Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W. H., Patton, J. G., Rome, L. H., Burnette, D. T., & Coffey, R. J. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, 177(2), 428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.02.029>
- Jiang, X., Zhang, J., & Huang, Y. (2015). Tetraspanins in Cell Migration. *Cell Adhesion & Migration*, 9(5), 406–415. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1005465>
- Lange-Consiglio, A., Capra, E., Monferini, N., Canesi, S., Bosi, G., Cretich, M., ... & Gasparrini, B. (2022). Extracellular vesicles from seminal plasma to improve

- fertilizing capacity of bulls. *Reproduction and Fertility*, 3(4), 313-327.
<https://doi.org/10.1530/>
- Lozano Ramos, S. I., Borràs i Serres, F. E., Jaraquemada, D., & Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia. (2019). Perfil transcriptómico y proteómico de las vesículas extracelulares de orina: diferencias entre donante renal y paciente trasplantado normo-funcional.
<https://ddd.uab.cat/record/203805>
- Ma, Y., Wang, J., Qiao, F., & Wang, Y. (2022). Extracellular vesicles from seminal plasma improved development of in vitro-fertilized mouse embryos. *Zygote*, 30(5), 619–624.
<https://doi.org/10.1017/S0967199422000041>
- Machtinger, R., Laurent, L. C., & Baccarelli, A. A. (2016). Extracellular vesicles: Roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Human Reproduction Update*, 22(2), 182–193. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMV055>
- Mateo-Otero, Y., Yeste, M., Roca, J., Llanera, M., Bucci, D., Galeati, G., Spinaci, M., & Barranco, I. (2022). Seminal extracellular vesicles subsets modulate gene expression in cumulus cells of porcine in vitro matured oocytes. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22004-7>
- Metz, C. B., Hinsch, G. W., & Anika, J. L. (1968). Ultrastructure and antigens of particles from rabbit semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17(1), 195–198.
<https://doi.org/10.1530/JRF.0.0170195>
- Minelli, A., Moroni, M., Martínez, E., Mezzasoma, I., & Ronquist, G. (1998). Occurrence of prostasome-like membrane vesicles in equine seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*, 114(2), 237–243. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.1140237>
- Mogielnicka-Brzozowska, M., Strzeżek, R., Wasilewska-Sakowska, K., Kordan, W., Mogielnicka-Brzozowska, M., Strzeżek, R., Wasilewska, K., & Kordan, W. (2015). Prostatosomes of Canine Seminal Plasma—Zinc-Binding Ability and Effects on Motility Characteristics and Plasma Membrane Integrity of Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(3), 484–491. <https://doi.org/10.1111/rda.12516>
- Moreno-Gonzalo, O., Fernandez-Delgado, I., & Sanchez-Madrid, F. (2017). Post-translational add-ons mark the path in exosomal protein sorting. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2017 75:1, 75(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/S00018-017-2690-Y>
- Murdica, V., Giacomini, E., Alteri, A., Bartolacci, A., Cermisoni, G. C., Zarovni, N., Papaleo, E., Montorsi, F., Salonia, A., Viganò, P., & Vago, R. (2019). Seminal plasma of men with severe asthenozoospermia contain exosomes that affect spermatozoa motility and capacitation. *Fertility and Sterility*, 111(5), 897-908.e2.
<https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2019.01.030>
- Navarrete, F. A., García-Vázquez, F. A., Alvau, A., Escoffier, J., Krapf, D., Sánchez-Cárdenas, C., ... & Visconti, P. E. (2015). Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways. *Journal of cellular physiology*, 230(8), 1758-1769.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24873>
- Nixon, B., Stanger, S. J., Mihalas, B. P., Reilly, J. N., Anderson, A. L., Tyagi, S., Holt, J. E., & McLaughlin, E. A. (2015). The microRNA signature of mouse spermatozoa is

- substantially modified during epididymal maturation. *Biology of Reproduction*, 93(4). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.115.132209>
- Park, K. H., Kim, B. J., Kang, J., Nam, T. S., Lim, J. M., Kim, H. T., Park, J. K., Kim, Y. G., Chae, S. W., & Kim, U. H. (2011). Ca²⁺ signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. *Science Signaling*, 4(173). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2001595>
- Parra, A., Padilla, L., Lucas, X., Rodriguez-Martinez, H., Barranco, I., & Roca, J. (2023). Seminal Extracellular Vesicles and Their Involvement in Male (In)Fertility: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4818. <https://doi.org/10.3390/IJMS24054818/S1>
- Petters, R. M., Wells, K. D., Petters, R. M., & Wells, K. D. (2020). Culture of pig embryos. *Researchgate.Net*, 48, 61–73. <https://doi.org/10.1530/biosciprocs.14.005>
- Piehl, L. L., Cisale, H., Torres, N., Capani, F., Sterin-Speziale, N., & Hager, A. (2006). Biochemical characterization and membrane fluidity of membranous vesicles isolated from boar seminal plasma. *Animal Reproduction Science*, 92(3–4), 401–410. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2005.06.005>
- Piehl, L. L., Fischman, M. L., Hellman, U., Cisale, H., & Miranda, P. V. (2013). Boar seminal plasma exosomes: Effect on sperm function and protein identification by sequencing. *Theriogenology*, 79(7), 1071–1082. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.01.028>
- Purohit, S., Laloraya, M., & Kumar, P. G. (1999). Role of ions and ion channels in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa. Article in *Asian Journal of Andrology*. <https://www.researchgate.net/publication/12081258>
- Roca, J., Rodriguez-Martinez, H., Padilla, L., Lucas, X., & Barranco, I. (2022). Extracellular vesicles in seminal fluid and effects on male reproduction. An overview in farm animals and pets. *Animal Reproduction Science*, 246, 106853. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2021.106853>
- Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A., Calvete, J. J., Pena Vega, F. J., & Roca, J. (2021). Seminal plasma: relevant for fertility?. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4368. <https://doi.org/10.3390/ijms22094368>
- Ronquist, G., Brody, I., Gottfries, A., & Stegmayr, B. (1978). An Mg²⁺ and Ca²⁺-stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid--part II. *Andrologia*, 10(6), 427–433. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0272.1978.TB03064.X>
- Setchell, B. P. (1994). Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of male reproductive tract. *The physiology of reproduction*, 1063-1175.
- Simon, C., Greening, D. W., Bolumar, D., Balaguer, N., Salamonsen, L. A., & Vilella, F. (2018). Extracellular vesicles in human reproduction in health and disease. *Endocrine reviews*, 39(3), 292-332. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00229>
- Soriano-Úbeda, C., Avilés-López, K., García-Vázquez, F. A., Romero-Aguirregomezcorta, J., & Matás, C. (2021). Epididymal and ejaculated sperm functionality is regulated differently by periovarian oviductal fluid in pigs. *Andrology*, 9(1), 426-439. <https://doi.org/10.1111/andr.12902>

- Stahl, P. D., & Raposo, G. (2019). Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. *Physiology* (Bethesda, Md.), 34(3), 169–177. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00045.2018/ASSET/IMAGES/LARGE/PHY0021904640004.JPEG>
- Strzezek, J. (2002). Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reproductive Biology*, 2(3), 243–266. <https://europepmc.org/article/med/14666148>
- Tamessar, C. T., Trigg, N. A., Nixon, B., Skerrett-Byrne, D. A., Sharkey, D. J., Robertson, S. A., Bromfield, E. G., & Schjenken, J. E. (2021). Roles of male reproductive tract extracellular vesicles in reproduction. *American Journal of Reproductive Immunology*, 85(2), e13338. <https://doi.org/10.1111/AJI.13338>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.CB0322S30>
- Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitze, K. F., & Johnson, L. (2019). Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*, 137, 2–7. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.05.030>
- Wang, Y., Liu, Q., Sun, Q., Zheng, L., Jin, T., Cao, H., Zhu, C., Li, L., Gong, Y., Yang, F., & Dong, W. (2024). Exosomes from porcine serum as endogenous additive maintain function of boar sperm during liquid preservation at 17 °C in vitro. *Theriogenology*, 219, 147–156. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2024.02.015>
- Weinbauer, G. F., Gromoll, J., Simoni, M., & Nieschlag, E. (2001). Physiology of Testicular Function. *Andrology*, 23–61. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04491-9_3
- Xu, Z., Xie, Y., Zhou, C., Hu, Q., Gu, T., Yang, J., Zheng, E., Huang, S., Xu, Z., Cai, G., Liu, D., Wu, Z., & Hong, L. (2020). Expression Pattern of Seminal Plasma Extracellular Vesicle Small RNAs in Boar Semen. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.585276>

11. Anexos

Abreviaturas y siglas

AC= Adenilato ciclasa

ADN=Ácido desoxirribonucleico

ALH= Desplazamientos laterales de la cabeza

AMPc= Monofosfato de adenosina cíclico

ARN=Ácido ribonucleico

ATP= Trifosfato de adenosina

BCF= Frecuencia de cruzamiento

BSA= Albúmina sérica bovina

C.A.S.A = Computer-Assisted Sperm Analysis
CD9= Antígeno CD9
CD63= Antígeno CD63
CD81= Antígeno CD81
CIV= Cultivo in vitro
COCs= Complejo cúmulo-ovocito
DLS= Dispersión de luz dinámica
ECL= Sustrato de quimioluminiscencia
ELSPBP1= Proteína 1 de unión a espermatozoides de epidídimo
FICT= Isotiocianato de fluoresceína
FIV= Fecundación in vitro
HSP70= Proteína de choque térmico-70
IP= Yoduro de propidio
kDa= Kilodalton
LIN= Linealidad espermática
miARN = micro ARN
MISEV= Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares
MIV= Maduración *in vitro*
MotP= Motilidad progresiva
MotT= Motilidad total
NCSU= Medio North Carolina State Universit
PBS= Tampón fosfato salino
PFF= Fluido folicular porcino
piRNA= ARN de silenciamiento
PKA= Proteína Kinasa A
PMSG/hCG =Hormona coriónica humana
PNA= Lectina *Arachis hypogaea* (Peanut agglutinin)
PS-VEs = Vesículas extracelulares del plasma seminal
PVDF= Fluoruro de polivinilideno
SSF= Solución salina fisiológica

STR= Índice de rectitud espermática

TALP= Medio albúmina-lactato-piruvato de Tyrode.

TBS= Solución salina tamponada

TEM = Microscopio electrónico de transmisión

TPBS= Solución tampón salino fosfato de Tris

TTBS= Solución salina tamponada de Tris

VAP= Velocidad de trayectoria

VCL= Velocidad de desplazamiento curvilínea

VEs = Vesículas extracelulares

VSL= Velocidad de desplazamiento rectilínea

WB= Western blot

WOB= Oscilación lateral de la cabeza